

Adriana Michelle
Quintero García

“Desarrollo de microesferas elaboradas a partir de lactosuero y polisacáridos del mucílago de *opuntia ficus indica* y determinación de su cinética de liberación de calcio en un modelo *in vitro*”

2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Desarrollo de microesferas elaboradas a partir de lactosuero y polisacáridos del mucílago de *opuntia ficus indica* y determinación de su cinética de liberación de calcio en un modelo *in vitro*”

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

M. en C. Adriana Michelle Quintero García

Dirigido por:

Dra. Juana Isela Rojas Molina

CoDirectora:

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez

Querétaro, Qro. a Abril, 2022



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO
BIOLÓGICAS**

**“DESARROLLO DE MICROESFERAS ELABORADAS A PARTIR DE
LACTOSUERO Y POLISACÁRIDOS DEL MUCÍLAGO DE *Opuntia
ficus indica* Y DETERMINACIÓN DE SU CINÉTICA DE
LIBERACIÓN DE CALCIO EN UN MODELO *in vitro*”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. en C. ADRIANA MICHELLE QUINTERO GARCÍA

DIRIGIDA POR:

DRA. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

CO-DIRIGIDA POR:

DRA. ELSA GUTIÉRREZ CORTEZ

QUERÉTARO
ABRIL DE 2022
MÉXICO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“DESARROLLO DE MICROESFERAS ELABORADAS A PARTIR DE
LACTOSUERO Y POLISACÁRIDOS DEL MUCÍLAGO DE *Opuntia ficus indica*
Y DETERMINACIÓN DE SU CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE CALCIO EN UN
MODELO *in vitro*”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. en C. ADRIANA MICHELLE QUINTERO GARCÍA

DIRIGIDA POR:

DRA. JUANA ISELA ROJAS MOLINA

CO-DIRIGIDA POR:

DRA. ELSA GUTIÉRREZ CORTEZ

COMITÉ TUTORAL

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Presidente

Dra. Elsa Gutiérrez Cortez

Secretario

Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda

Vocal

Dra. Ma. Alejandra Rojas Molina

Suplente

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Suplente

Centro Universitario
Santiago de Querétaro
Abril de 2022

RESUMEN

En México, la población de mujeres mayores de 45 años es más propensa a desarrollar osteoporosis con respecto a los varones a consecuencia del hipoestrogenismo, lo cual activa a las células osteoclásticas responsables de la destrucción del hueso aunado a una baja ingesta de calcio en la dieta. Por lo anterior, se recomienda una dieta de calcio que cubra 1200 mg/día o que al menos, se cumpla este requerimiento a través de suplementos de este mineral. Sin embargo, algunos suplementos, así como otros tipos de tratamientos para la osteoporosis presentan efectos secundarios, entre los que destaca el riesgo de padecer cáncer ovárico y de mama. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización del mucílago de nopal (MN) como fuente natural de calcio, extraído de cladodios de *O ficus indica* deshidratados (MND) y frescos (MNF), así como desarrollar microesferas biopoliméricas (MB) de MND y proteínas de lactosuero (L) como fuente adicional de calcio; pretendiendo con ello obtener un nutraceutico microparticulado que demostrara en un modelo *in vitro*, una liberación prolongada de calcio. Se prepararon suspensiones de cladodios frescos y deshidratados (4 % m/m) para la extracción del mucílago utilizando un proceso de separación mecánica. El mucílago separado se precipitó con alcohol etílico (1:2 v/v), determinándose el rendimiento y la eficiencia de separación. El mucílago sólido y en dispersión coloidal se caracterizó evaluando: potencial Z, viscosidad, color y textura, así como su composición nutrimental (AQP), microestructura por microscopía electrónica de barrido (MEB) y análisis térmicos (TGA y DSC). Por otra parte, se prepararon soluciones coloidales de lactosuero (1 % m/m) y mucílago (MND) (0.0625 % m/m), evaluándose su tamaño de partícula y potencial Z a diferentes condiciones de pH. Posteriormente, se aplicó el método de coacervación compleja para el desarrollo de las microesferas, mezclando los dos biopolímeros (M:L) en una relación 1:2 (mucílago:lactosuero v/v) y ajustando el pH del sistema a un valor de 2.0. La caracterización de las MB consistió en la determinación del potencial Z, tamaño de partícula, microestructura por MEB y contenido de calcio. En el estudio de cinética de liberación de calcio *in vitro*, se prepararon disoluciones con MB a pH ácido y básico. Se utilizaron membranas de diálisis en cuyo interior se colocaron las MB y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, tanto de las disoluciones a pH ácido como básico. Finalmente, se aplicó un ajuste de modelos matemáticos para determinar la cinética de liberación de calcio. El análisis de los resultados para la caracterización del mucílago, se llevó a cabo con un ANOVA y se aplicó la prueba de Tukey para detectar diferencias estadísticas utilizando el programa estadístico GraphPad Prism® (USA) versión 6. Con los resultados de liberación de calcio *in vitro* se evaluó el modelo matemático cinético de mejor ajuste utilizando el software Microsoft® Excel® 2016 versión 2110. Con toda la información obtenida se puede concluir que se logró desarrollar un método de extracción sustentable para la obtención de mucílago a partir de *O. ficus indica*, reportándose por primera vez, una eficiencia de separación cercana al 100 %; no habiéndose obtenido diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el rendimiento y eficiencia de separación entre MND *versus* MNF. Además, el proceso de deshidratación de los cladodios aumentó el contenido de proteínas, cenizas, extracto libre de nitrógeno y calcio. Así mismo, la viscosidad de la dispersión coloidal fue mayor en MND que en MNF; habiéndose revelado mediante los estudios de TGA y DSC un comportamiento térmico diferente entre el MND y MNF. El MND mostró valores más bajos de cohesión, adhesividad, elasticidad y L (color) que el MNF. Las diferencias entre las propiedades químicas y fisicoquímicas del MND y el MNF determinan las posibles aplicaciones del mucílago de *O. ficus indica* en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. Por otra parte, se obtuvieron por primera vez, micro y nano esferas biopoliméricas conteniendo calcio, a partir de la coacervación compleja de lactosuero y mucílago de *O. ficus indica*, cuya cinética de liberación de calcio *in vitro* se ajustó al modelo matemático de Higuchi; lo cual sugiere que la liberación del calcio en estas estructuras ocurre por difusión a una velocidad dependiente de la raíz cuadrada del tiempo, pero que es menor a un pH que semeja el del estómago, con respecto al pH intestinal simulado; con lo cual es factible que se prolongue su absorción en el tracto gastrointestinal. Por lo anterior, las microesferas biopoliméricas desarrolladas de lactosuero y mucílago de *O. ficus indica* calcio presentan un alto potencial nutraceutico (aún por comprobar mediante estudios *in vivo*), para prevenir y tratar la osteoporosis.

Palabras clave: *Opuntia ficus indica*, mucílago, lactosuero, separación mecánica, microesferas biopoliméricas, cinética de liberación de calcio.

ABSTRACT

In Mexico, the female population over 45 years of age is more likely to develop osteoporosis than men as a result of hypoestrogenism, which activates the osteoclastic cells responsible for bone destruction in addition to a low intake of calcium in the diet. Therefore, the calcium in diet that covers 1200 mg/day is recommended or that at least, this requirement is met through supplements of this mineral. However, some supplements, as well as other types of osteoporosis treatments have side effects, including the risk of ovarian and breast cancer. Therefore, the objective of this work was to characterize the nopal mucilage (MN) as a natural source of calcium, extracted from cladodes of *O ficus indica* dehydrated (MND) and fresh (MNF), and to develop biopolymeric microspheres (MB) of MND and whey (L) as an additional source of calcium; intending thereby to obtain a microparticulate nutraceutical that will demonstrate in an *in vitro* model, a prolonged release of calcium. Fresh and dehydrated cladode suspensions (4% m/m) were prepared for mucilage extraction using a mechanical separation process. The separated mucilage was precipitated with ethyl alcohol (1: 2 v/v), determining the yield and the separation efficiency. The solid and dispersed colloidal mucilage was characterized by evaluating: Z potential, viscosity, color and texture, as well as its nutritional composition (AQP), microstructure by scanning electron microscopy (SEM) and thermal analysis (TGA and DSC). On the other hand, colloidal solutions of whey (1% m/m) and mucilage (MND) (0.0625% m/m) were prepared, evaluating their particle size and Z potential at different pH conditions. Subsequently, the complex coacervation method was applied for the development of the microspheres, mixing the two biopolymers (M:L) in a 1:2 ratio (mucilage: whey v/v) and adjusting the pH of the system to a value of 2.0. The characterization of the MB consisted of determining the Z potential, particle size, SEM microstructure and calcium content. In the study of calcium release kinetics *in vitro*, solutions were prepared with MB at acidic and basic pH. Dialysis membranes were used inside which the MB were placed and aliquots were taken at different times, both of the solutions at acidic and basic pH. Finally, an adjustment of mathematical models was applied to determine the calcium release kinetics. The analysis of the results for the characterization of the mucilage was carried out with an ANOVA and the Tukey test was applied to detect statistical differences using the statistical program GraphPad Prism® (USA) version 6. With the results of calcium release *in vitro*, the best fit kinetic mathematical model was evaluated using Microsoft® Excel® 2016 version 2110 software. With all the information obtained, it can be concluded that it was possible to develop a sustainable extraction method to obtain mucilage from *O. ficus indica*, reporting for the first time, a separation efficiency close to 100 %; not having obtained statistically significant differences ($p < 0.05$) in the performance and separation efficiency between MND versus MNF. In addition, the dehydration process of the cladodes increased the content of proteins, ash, nitrogen-free extract and calcium. Likewise, the viscosity of the colloidal dispersion was higher in MND than in MNF; having revealed by means of the TGA and DSC studies a different thermal behavior between MND and MNF. The MND showed lower values of cohesion, adhesiveness, elasticity and L (color) than the MNF. Differences found between the chemical and physicochemical properties of MND and MNF will determine the possible applications of the mucilage of *O. ficus indica* in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. On the other hand, biopolymeric micro and nano spheres containing calcium were obtained for the first time, from the complex coacervation of whey and mucilage of *O. ficus indica*, whose *in vitro* calcium release kinetics was adjusted to the mathematical model of Higuchi; which suggests that the release of calcium in these structures occurs by diffusion at a rate dependent on the square root of time, but that it is lower at a pH similar to that of the stomach, with respect to the simulated intestinal pH; with which it is feasible that its absorption in the gastrointestinal tract is prolonged. Therefore, the biopolymeric microspheres developed from whey and mucilage of *O. ficus indica* calcium have a high nutraceutical potential (yet to be verified by *in vivo* studies), to prevent and treat osteoporosis.

Key words: *Opuntia ficus indica*, mucilage, whey, mechanical separation, biopolymeric microspheres, kinetic of calcium release.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, en este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Agradecimientos

A Dios, por haberme permitido continuar con mis estudios de doctorado.

A mi mamá, por todas las veces que necesité consuelo y apoyo, consejos, apapachos y ser mi más grande fortaleza. Toda mi admiración para mi mamá.

A mi papá, por siempre saber guiarme ante los momentos más difíciles.

A mi hermana que me apoya y escucha en todo momento, siendo una verdadera inspiración para mí. Eres la mejor hermana del mundo.

A mis amigos Fito, Cristian, Jessica, por todas las reuniones que tuvimos para distraernos y platicar de cualquier acontecimiento, sea grande o pequeño, pero siempre importante. Por todas las veces que jugamos, nos divertimos y reímos para pasar un momento muy agradable.

A mi directora de tesis la Dra. Isela Rojas Molina por siempre y comprometida con su trabajo. Ser una persona tolerante y enseñarme a realizar una excelente investigación y escritura de tesis.

A mis sinodales, por sus sugerencias en los tutorales, para mejorar mi trabajo y mi formación académica.

A mis profesores del Doctorado por conducirme en el proceso de un proyecto de investigación, por ayudarme a comprender con profundidad los conocimientos y a tener una madurez en esta nueva etapa de mi vida.

A Danny, por escucharme a cada momento y aunque en este tiempo no nos vimos tan seguido, se que en todo momento voy a contar contigo. Gracias por tu amistad.

A Fabiola, por ayudarme a ser paciente y saber escucharme en todo momento que sentía que ya no podía más. Ser mi fortaleza, creyendo siempre en mí, teniendo tanta fe en que podía concluir este Doctorado, superarme profesional y personalmente. Gracias por siempre estar ahí.

¡¡¡A Mons, por siempre estar presente!!! Amiga, ¿qué te puedo decir? En esta Tesis está una parte de ti. Por ayudarme a estudiar teniendo mini seminarios solamente tu y yo para entender mejor nuestro proyecto. Por esas risas que nos hacían doler el estómago de tanta ocurrencia, Por caminar juntas, siempre apoyándonos en todos los momentos, viendo crecer nuestra fuerza, tolerancia, resistencia a cualquier percance que tuviéramos, Por rifártela conmigo en la estancia doctoral, e impartir nuestro seminario como todas unas rockstars. Por esos desvelos de entrega

a nuestro trabajo frente a la computadora, y llenarnos de café para resistir aún más. Simplemente gracias por ser una amiga incondicional.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de continuar mis estudios de posgrado y ayudarme a crecer como la profesionista que soy el día de hoy.

Al CFATA-UNAM y a CGEO-UNAM Campus Querétaro por permitirme realizar algunos de los experimentos necesarios para poder llevar a cabo este proyecto de investigación.

Agradecimientos Institucionales

El presente trabajo se realizó en los siguientes laboratorios: Laboratorio de Química Medicinal y Laboratorio de Bioquímica del Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), Laboratorio de Microscopia Electrónica y Rayos X del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México (CFATA-UNAM, Campus Juriquilla), Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Centro de Geociencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (CGEO-UNAM, Campus Juriquilla), Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Alimentos y en los Laboratorios de la Unidad Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán (FES-Cuatutitlán, UNAM).

Con un especial agradecimiento a:

Dr. Abraham Faustino Vega, Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón, M. en N.H. Frida Rosalía Cornejo García, M. en C.F. César Gazga Urioste, Dr. Javier Águila Rosas y Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda, del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (LFMLC), Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAMX); por el apoyo científico-técnico, uso de recursos e infraestructura de laboratorio para caracterizar hidrocoloides y obtener microesferas, soportados mediante los proyectos: 34601029 -Hidrocoloides naturales y distintas nanoestructuras para el tratamiento de diabetes, osteoporosis e infecciones, y 34602039 -Modificaciones físicas de fármacos y diseño de medicamentos.

De manera semejante, se agradece a las autoridades de Rectoría, Secretaría de Unidad y de la Oficina de vinculación (COPLADA) de la UAMX, por el apoyo brindado para la realización de dos estancias de investigación en el LFMLC asesoradas por el Doctor Quirino Barreda: 28 de noviembre al 14 de diciembre de 2018 y 2 de septiembre al 31 de octubre de 2019; actividad que también permitió que la autora de esta tesis doctoral impartiera del 17 de septiembre al 1 de octubre de 2019 en la Coordinación de educación continua y a distancia (CECAD), el curso: Procesos bioquímicos e inmunológicos en osteoporosis y diabetes. Propuestas nutracéuticas, prevención y tratamiento, con una duración de 20 horas.

A Dr. Ponciano García Gutiérrez por su colaboración en el apoyo técnico para la determinación de potencial Z de muestras de los hidrocoloides en estudio, en el Laboratorio de Biofísicoquímica, Departamento de Química, de UAM-Iztapalapa.

A M. en C. María Carolina Muñoz Torres por su colaboración en el análisis químico para la determinación de calcio por la técnica ICP-OES en el Laboratorio de Geoquímica Ambiental del Centro de Geociencias (CGEO-UNAM, Campus Juriquilla).

A la empresa Anton Paar México, S.A de C.V. y en particular a la Química Rosario Espinosa Meléndez por su colaboración y apoyo en la determinación de tamaño de partícula y potencial Z de muestras de hidrocoloides y microesferas, en el Laboratorio de Aplicaciones de la empresa.

Agradezco al CONACYT por el apoyo recibido a través del proyecto 316849 del Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04). Así mismo, doy mi agradecimiento al apoyo otorgado por el "Fondo Química Somos Todos 2020" (FQST2020) y al "Fondo Química Somos Todos 2021" para el fomento a la investigación en la modalidad consolidado (FQST2021-FOMIC). Proyecto FCQ202110), que permitieron cumplir con los objetivos planteados en esta tesis.

Así mismo, el presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT: IA207121 Desarrollo de un sistema matricial polimérico de proteínas de lactosuero-polisacáridos como fuente de calcio altamente biodisponible de la DGAPA-UNAM.

Finalmente, agradezco al CONACYT por la beca doctoral otorgada con número 598386 para poder continuar con mi formación académica y profesional.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PAPIIT: IA207121 Desarrollo de un sistema matricial polimérico de proteínas de lactosuero-polisacáridos como fuente de calcio altamente biodisponible de la DGAPA-UNAM.

ÍNDICE

RESUMEN	II
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Osteoporosis	6
2.1.1 <i>Epidemiología</i>	6
2.1.2 <i>Diagnóstico y tratamiento</i>	6
2.1.3 <i>Calcio</i>	8
2.1.4 <i>Regulación hormonal del calcio</i>	8
2.1.5 <i>Osteoporosis posmenopáusica</i>	9
2.2 Lactosuero	10
2.2.1 <i>Principales proteínas del lactosuero</i>	10
2.2.2 <i>Propiedades de las proteínas del lactosuero como vehículos para bioactivos</i> ..	11
2.3 Opuntia ficus indica	11
2.3.1 <i>Mucílago del Opuntia ficus indica</i>	12
2.3.2 <i>Aplicaciones farmacéuticas del mucílago del nopal Opuntia ficus indica</i>	12
2.4 Coacervación compleja utilizando biopolímeros	13
2.4.1 <i>Coacervación compleja</i>	13
2.4.2 <i>Microesferas como coadyuvantes para el tratamiento de osteoporosis</i>	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	19
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVOS	20
6.1 Objetivo General	20
6.2 Objetivos particulares	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
8. CUADRO METODOLÓGICO	30
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
10. CONCLUSIONES	69
11. PERSPECTIVAS	71
12. REFERENCIAS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes estructuras de microesferas.	15
Figura 2. Cuadro Metodológico.	30
Figura 3. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de cladodios frescos y deshidratados. Imágenes de cladodios frescos.	36
Figura 4. Espectros de infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF) de mucílago de <i>Opuntia ficus indica</i>	39
Figura 5. Valores de esfuerzo cortante (a) y viscosidad (b) versus velocidad de corte del mucílago extraído de cladodios frescos (MNF) y el mucílago extraído de cladodios deshidratados (MND) a diferentes concentraciones.....	40
Figura 6. Curva termogravimétrica y curva de la primera derivada del termograma del mucílago fresco y deshidratado.....	43
Figura 7. Potencial Z de lactosuero a diferentes valores de pH	48
Figura 8. Potencial Z del mucílago <i>O.ficus indica</i> a diferentes valores de pH	49
Figura 9. Tamaño de partícula de lactosuero y mucílago a tiempos de 24, 48 y 72 horas.	50
Figura 10. Micrografías representativas de las suspensiones coloidales elaboradas con una misma proporción de mucílago(M)-lactosuero(L), obtenidos a diferentes valores de pH.	51
Figura 11. Valores de potencial Z de las suspensiones coloidales (coacervados) de mucílago-lactosuero (M:L) en relación 1:2 a diferentes valores de pH.....	53
Figura 12. A) Tamaño de partícula de las suspensiones coloidales(coacervados) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a diferentes valores de pH. B) Porcentaje de diámetro acumulativo de tamaño de partícula del 10 % por debajo de la media de las suspensiones coloidales(coacervados) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a diferentes valores de pH.	55
Figura 13. Tamaño de partícula de la suspensión coloidal (coacervado) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a un pH de 2.0, del sobrenadante y sedimento derivados de M:L (pH 2.0).....	57
Figura 14. Potencial Z (pZ) de la suspensión coloidal (coacervado) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a un pH de 2.0, del sobrenadante y sedimento derivados de M:L (pH 2.0)	58

Figura 15. A) Porcentaje de liberación de calcio *in vitro* de suspensiones coloidales lactosuero (1 % m/m) y mucílago (0.0625 % m/m) en medio ácido y básico. B) Porcentaje de liberación de calcio *in vitro* acumulativo del (M:L) a un pH de 2.0 y sobrenadante derivado de M:L (pH 2.0) en medio ácido y básico. M:L (mucílago-lactosuero)..... 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis químico próximo y contenido de calcio en mucílagos extraídos de cladodios de <i>Opuntia ficus indica</i> frescos y deshidratados.	33
Tabla 2. Valores de la ley de potencia del mucílago extraído de cladodios de <i>O. ficus indica</i> a diferentes concentraciones de mucílago.....	41
Tabla 3. Datos termogravimétricos (TGA y DSC) del mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados	44
Tabla 4. Análisis de textura instrumental en mucílagos extraídos de cladodios de <i>Opuntia ficus indica</i> frescos y deshidratados.	45
Tabla 5. Parámetros de color de mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados de <i>O. ficus indica</i>	46
Tabla 6. Porcentaje de calcio liberado acumulado después de 60 min, en un sistema de disolución <i>in vitro</i> en medio ácido y básico.....	61
Tabla 7. Ajuste a modelos matemáticos para la cinética del perfil de liberación...	67

ACRÓNIMOS

AACC	Asociación Americana de Químicos de Cereales
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analistas
ATR	Reflectancia Total Atenuada
α-LA	Alfa-Lactoalbúmina
AP	Parénquima Acuoso
AP-1	Proteína Activadora Tipo 1
β-LG	Beta-Lactoglobulina
CaSR	Calcium Sensing Receptor
C-Jun	Cinasas Amino-Terminales
CPC	Cemento de Fosfato de Calcio
DMO	Densidad Mineral Ósea
DXA	Densitometría Dual de Rayos X
ELN	Extracto Libre de Nitrógeno
Erα	Receptor para Estrógeno tipo alfa
Erβ	Receptor para Estrógeno tipo beta
ERK1,2	Regulador de la Proteína Kinasa 1,2
Id	Idioblastos Secretores de Mucílago
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
IR-FT:	Infrarrojo con Transformada de Fourier
K	Índice de Consistencia
k	Constante de la Velocidad de Liberación
L	Lactosuero
M	Mucílago
MB	Microesferas biopoliméricas
MEB	Microscopía electrónica de barrido
M:L	Mucílago: lactosuero
MND	Mucílago de nopal deshidratado
MNF	Mucílago de nopal fresco
n	Índice de Comportamiento de Flujo
NCX1	Intercambiador de sodio calcio (NCX)
NF- $\kappa$$\beta$	Factor de Nuclear kappa-beta
NOF	National Osteoporosis Foundation
OX	Cristales de Oxalato de Calcio
PI	Punto isoeléctrico
PLGA	Ácido poliláctico-co-glicólico
PMCA1b	Bomba de calcio de membrana plasmática
PTH	Hormona Paratiroidea
PTHR	Receptor para Hormona Paratiroidea
pZ	Potencial Z
RANK	Receptor Activador del Factor Nuclear κ β
RANKL	Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear κ β
rhBMP-2	Proteína Osteoinductora
Sb	Sobrenadante
Sd	Sedimento
Tg	Transición vítrea
TGA	Análisis Termogravimétrico
TPA	Análisis del Perfil de Textura
TRPV5	Receptor Transitorio Selectivo de Calcio 5
TRPV6	Receptor Transitorio Selectivo de Calcio 6
VDR	Receptor de Vitamina D

1. INTRODUCCIÓN

La adecuada mineralización del hueso para protegerlo del riesgo de padecer fracturas se consigue a través de la ingesta diaria recomendada (IDR) de calcio, (1,200 mg/día en adultos). La deficiencia de este mineral en la dieta está relacionada con enfermedades como la osteoporosis, incrementando el riesgo de presentar fracturas en la edad adulta (Martín *et al.*, 2015).

En México, se estima que 168 mujeres y 98 hombres por cada 100,000 personas presentan fractura del fémur proximal. Además, el 43 % de la población femenina con edades entre 20 a 69 años presentan una densidad mineral ósea baja, lo que significa que 1 de cada 4 mujeres mexicanas padece osteopenia. Se pronostica que para el año 2050 se incremente un 43.1 % el número de casos de fracturas entre la población en etapa de la adultez tardía o adulto mayor (Nieto *et al.*, 2012). Por lo anterior, se puede decir que la osteoporosis es un problema de salud pública, así como para la clínica, terapéutica y la investigación, pues no existe edad tardía para prevenir fracturas y evitar la pérdida del tejido óseo (Martín *et al.*, 2015).

Es importante destacar que las mujeres presentan un mayor porcentaje de riesgo de padecer algún tipo de fractura, en la etapa de la menopausia y postmenopausia. La relación entre la menopausia y la osteoporosis es debido a que los estrógenos tienen influencia sobre el equilibrio entre el remodelado y resorción ósea gracias a los receptores estrogénicos que se encuentran en todas las células óseas (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) (Lerner, 2006). La disminución de los niveles de estrógenos durante y después de la menopausia, ocasiona un desbalance entre el remodelado y la resorción ósea, aumentando la actividad osteoclástica y, por lo tanto, el incremento de la destrucción ósea (Dong *et al.*, 2014).

En la actualidad existen diversos tratamientos para la prevención de la osteoporosis, como son los suplementos de sales de calcio; sin embargo, se recomienda que no exceda más de 500 mg para prevenir el riesgo de formar cálculos renales. Otra opción es la terapia de reemplazo hormonal, pero solo se ha demostrado una disminución en

el riesgo de fractura en vértebras, pero no en cadera o en fémur (Gambacciani y Levancini, 2014). Por otro lado, se han evidenciado efectos secundarios relacionados a este tipo de tratamiento como son náuseas, mareos, gastritis, trombosis, cáncer de ovario y/o mama entre otros (Drake *et al.*, 2015).

Por otra parte, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que el mucílago del nopal de *Opuntia ficus indica* presenta calcio en forma de carbonato y que es biodisponible para mejorar las propiedades físicas y mecánicas en ratas con ovariectomía (Rojas-Molina *et al.*, 2015; Quintero-García *et al.*, 2020). Sin embargo, el consumo de mucílago utilizado en este estudio para lograr el efecto benéfico en el hueso excede la ingesta recomendada de fibra en humanos. Por otro lado, el desarrollo de microesferas ha servido para obtener y mejorar la liberación controlada de un fármaco de interés, principalmente por la técnica de coacervación compleja, en donde existe la interacción electrostática entre dos biopolímeros con cargas opuestas (Gorji *et al.*, 2018).

El lactosuero es el producto lácteo líquido que se obtiene durante la elaboración del queso, sin embargo, en la industria alimentaria el suero de la leche es desaprovechado y desechado en mantos acuíferos, resultando un contaminante ambiental. Una de las propiedades que llama la atención del lactosuero es el contenido de proteínas, representan el 20 % de la leche bovina (β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y lactoferrina) (FAO, 2017). En diversos estudios, se han aprovechado las propiedades fisicoquímicas de las proteínas para ser utilizadas como vehículos bioactivos a través de procesos de encapsulación (Zhang *et al.*, 2014). Por este motivo, el objetivo de este trabajo consistió en desarrollar microesferas a partir del lactosuero y del mucílago de la especie *O. ficus indica* para incrementar la biodisponibilidad del calcio en un modelo *in vitro*, debido a que no existe en la actualidad un estudio donde se elaboren micropartículas empleando dichos biopolímeros.

2. ANTECEDENTES

2.1 Osteoporosis

De acuerdo con la Fundación Nacional de Osteoporosis (National Osteoporosis Foundation por sus siglas en inglés NOF), la osteoporosis se describe como una enfermedad común en los seres humanos, lo que representa un problema de salud pública (NOF, 2014).

2.1.1 Epidemiología

Se estima que 200 millones de personas padecen osteoporosis a nivel mundial. El 30 % corresponde a mujeres post-menopáusicas en Estados Unidos y en Europa (IOF, 2017). En México, 18 % de la población femenina padece osteoporosis en comparación con el 9 % la población masculina; sin embargo, lo que implica un riesgo de sufrir una fractura en el caso de las mujeres del 8.5 % y en hombres de 3.8 %. La deficiencia estrogénica duplica el riesgo de fractura cada 7 u 8 años después de los 50 años de edad (Diagnóstico y tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas, 2018). Estos datos indican que una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres mayores de 50 años, sufrirán una fractura, lo que genera un gasto anual en atención hospitalaria de 97 mil millones de dólares (Cabrera-Pivaral *et al.*, 2018).

2.1.2 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la osteoporosis se realiza a través de la técnica de imagen de absorciometría dual de rayos X (DXA), considerada como la principal herramienta para su determinación, debido a que no es invasiva mostrando un valor predictivo para el riesgo de fractura. Se puede realizar en las áreas óseas del fémur, cadera, radio, cúbito y columna espinal (Bernabei *et al.*, 2014). La herramienta del DXA, realiza la medición de la densidad mineral ósea (DMO, gramos de mineral por centímetro cuadrado escaneado, g/cm^2) haciendo una comparación del resultado obtenido con los valores de referencia de un joven adulto (z-score). Si el resultado de DMO es ≥ -1.0 , se considera normal, una DMO de > -2.5 y < -1.0 es diagnóstico de osteopenia. Finalmente, cuando el resultado obtenido de DMO resulta ≤ -2.5 es considerado osteoporosis (Cosman *et al.*, 2014). Con respecto al tratamiento de la osteoporosis, se utiliza la administración oral y/o intravenosa de bifosfonatos, como alendronato,

risedronato y etidronato, su acción consiste en inhibir la actividad osteoclástica. El más comúnmente prescrito es el alendronato como tratamiento para la osteoporosis postmenopáusicas, donde se observa un incremento en la DMO, así como una disminución en el riesgo de fractura. Sin embargo, el uso de bifosfonatos, se les ha relacionado con efectos secundarios a nivel gastrointestinal (Das y Crockett, 2013).

Otras estrategias para inactivar la resorción ósea es el denosumab (anticuerpo monoclonal IgG2), su mecanismo de acción está implicado en la regulación negativa del ligando RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$), ya que se dirige con afinidad y especificidad al RANKL logrando el bloqueo en el mecanismo de resorción ósea cuando dicho ligando se une a su receptor RANK. Este ligando (RANKL) se encuentra en la superficie de la membrana de los osteoclastos cuya función es activarlos. El denosumab, disminuye el riesgo de fractura de cadera en un 40 %, fractura en vértebras en un 68 % y un 20 % en fracturas no vertebrales. Entre los efectos secundarios que presenta este medicamento se incluyen: náuseas, dolor de cabeza, aumento del ritmo cardíaco y trombosis (Lewiecki, 2011; Tella y Gallagher, 2014).

La terapia de reemplazo hormonal ha demostrado ser un tratamiento con efectos antiresortivos óseos con dosis farmacológicas de estrógenos en mujeres postmenopáusicas. En un estudio longitudinal de 6 años, se observó que las dosis de estrógenos incrementaron el 61 % el volumen de hueso trabecular y un 22 % del grosor en la pared trabecular (Khashtgir *et al.*, 2010). El Raloxifeno es un modulador selectivo del receptor de estrógeno que es utilizado en la clínica para la prevención y tratamiento de osteoporosis; sin embargo, presenta efectos secundarios asociados con incremento de riesgo de cáncer de mama (Drake *et al.*, 2015).

Finalmente, existen los tratamientos con suplemento de calcio en forma de sales (citrato o carbonato). El carbonato de calcio se ha observado que incrementa la DMO en mujeres postmenopáusicas; no obstante, causa complicaciones gastrointestinales. Por otro lado, el citrato de calcio es más caro que el carbonato y se requiere una dosis de dos tabletas de 500 mg/día para obtener la absorción del mineral acompañado con acidez gástrica. Sin embargo, el tratamiento con estos dos

suplementos mencionados no se ha asociado con un descenso del riesgo de padecer una fractura (Cano *et al.*, 2018).

2.1.3 Calcio

Una persona adulta contiene aproximadamente 1 kg de calcio, el 99 % se encuentra en huesos y dientes (Zhu y Prince, 2012). A lo largo de la vida de una persona, el requerimiento de la ingesta de calcio se modifica, es decir, que en la etapa de la niñez (0 – 9 años) se requieren 1000 mg/día, en etapa de crecimiento (9 – 18 años) son necesarios 1300 mg/día, en la etapa adulta (19 – 50 años) se requieren 1000 mg/día, tanto en hombres como en mujeres; sin embargo, a partir de los 51 años de edad, una mujer necesita consumir 1200 mg/día de calcio a diferencia de un varón que requiere esta misma cantidad pero a partir de los 71 años de edad (NIH, 2013).

2.1.4 Regulación hormonal del calcio

La homeostasis del calcio es regulada por un sistema hormonal cuya función es controlar el transporte de calcio en el riñón, intestino y hueso (Brown, 2013). El cambio de las concentraciones de calcio sérico es sentido por un receptor acoplado a la proteína G, el CaSR (Calcium Sensing Receptor). La actividad de este receptor tiene una acción en la hormona paratiroidea (PTH) secretada por la glándula paratiroidea. Un decremento en los niveles de calcio en suero (hipocalcemia), inactiva a CaSR logrando una estimulación para la secreción de PTH, la cual tendrá efecto en los receptores para PTH (PTHr) presentes en el riñón para incrementar la reabsorción de calcio a nivel del túbulo renal; al mismo tiempo, en este órgano se incrementa la secreción de 1,25(OH)₂D (calcitriol, forma activa de la vitamina D) que activa a su receptor (VDR) en el intestino para aumentar la absorción de calcio (transporte transcelular de calcio), donde a su vez, participan receptores transitorios selectivos de calcio 5 y 6 (TRPV5 y TRPV6), mismas que se encuentran en las membranas de las células epiteliales que recubren las paredes del intestino, cuya función consiste en regular la entrada y la absorción de calcio. Una vez que el calcio se encuentra dentro del enterocito del intestino, la proteína con alta afinidad a calcio (calbindina) transporta el calcio hacia la membrana basolateral del intestino para que éste sea expulsado al torrente sanguíneo a través de la bomba de calcio/sodio (NCX1) y la proteína PMCA1b (bomba de calcio de membrana plasmática). Finalmente, el calcio entra al torrente

sanguíneo y en conjunto con el calcio liberado en hueso, a partir del incremento de la resorción ósea, los niveles séricos de calcio se regulan a niveles basales (Fleet y Scoch, 2010; Brown, 2013; Xiao-Li *et al.*, 2014; Veldurthy *et al.*, 2016). En caso contrario, cuando los niveles de calcio en suero se observan elevados actúa la calcitonina (hormona polipeptídica) que se sintetiza en las células C de la glándula de la tiroides. La secreción de esta hormona tiene efecto en el hueso, disminuyendo la actividad osteoclástica (Brown, 2013).

2.1.5 Osteoporosis posmenopáusica

La osteoporosis posmenopáusica se presenta cuando cesa el funcionamiento por parte de los ovarios y, por lo tanto, se reduce la producción de estrógenos en la menopausia, dando lugar a un incremento y prolongación de la fase rápida de pérdida de masa ósea (Ji y Yu, 2015).

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas que tienen dos tipos de receptores: alfa ($Er\alpha$) y beta ($Er\beta$). Se ha observado que el receptor $Er\alpha$ se expresa tanto en osteoblastos como en osteoclastos y que el receptor $Er\beta$ se expresa únicamente en los osteoblastos y tejidos mesenquimales (Lerner, 2006). Por lo tanto, los estrógenos tienen un papel importante en el metabolismo óseo, en el que destaca la inhibición de la diferenciación de los osteoclastos, además de aumentar su apoptosis reduciéndose, por consiguiente, la resorción ósea (Chabbert-Buffet *et al.*, 2016). La vía de señalización regulada por los estrógenos para la inactivación osteoclástica involucra la inhibición de cinasas amino terminales (c-Jun), lo que resulta en un decremento de la activación de AP-1 (factor de transcripción), NF- $\kappa\beta$ (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras de kappa de las células B activadas) y ERK1,2 (Khalil *et al.*, 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, las mujeres tienen riesgo de sufrir una fractura por osteoporosis de aproximadamente un 40 % como resultado del papel que desempeñan los estrógenos en la inhibición de la resorción ósea (Ji y Yu, 2015).

2.2 Lactosuero

El lactosuero es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche y/o los productos derivados de la leche (FAO, 2017).

A partir de 10 litros de leche se pueden producir de 1 a 2 kg de queso, con un promedio de 8 a 9 kg de suero. Esto representa el 90 % del volumen de la leche, el cual contiene la mayor parte de compuestos hidrosolubles (lactosa 95 %) y cerca de un 20 % de proteínas (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, lactoferrina e inmunoglobulinas). Sin embargo, tanto la lactosa como las proteínas son desaprovechadas durante la fabricación del queso, transformándose en contaminantes (alta demanda biológica de oxígeno BOD₅) que son descargados al drenaje, el cual llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación (Pescuma *et al.*, 2015). Las proteínas existentes en el suero han captado considerablemente la atención, debido a que pueden utilizarse como vehículos precursores de péptidos “bioactivos” (componentes que tienen actividad biológica dentro del organismo) que pueden incluso formarse durante la digestión (Ramos *et al.*, 2015). Además, estas proteínas juegan un papel importante en la encapsulación y protección para el suministro de compuestos bioactivos en alimentos funcionales, a través de la formación de complejos proteína-ligando con la capacidad de proteger los componentes unidos contra la oxidación y degradación (Zhang *et al.*, 2014).

2.2.1 Principales proteínas del lactosuero

La beta-lactoglobulina (β -LG), pertenece a la familia de la lipocalina (transportadores de moléculas hidrofóbicas), compuesta por 183 aminoácidos (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014). Se ha reportado que esta proteína se une a ligandos hidrofóbicos pequeños (ácidos grasos, retinol, triacilglicérols, cetonas alifáticas, compuestos aromáticos, tocoferoles, colesterol y calcio) modulando sus propiedades fisicoquímicas y coloidales que pueden tener efectos en el proceso digestivo, así como en el destino biológico de dichos compuestos (Pérez *et al.*, 2014). Por otro lado, la alfa-lactoalbúmina (α -LA) es una proteína que se encuentra unida a Ca²⁺ constituida por 123 aminoácidos, conteniendo ácido glutámico (NH₂-terminal) y leucina (COOH-terminal), cuatro enlaces de disulfuro y no contiene tioles libres. Además, tiene la capacidad para interactuar con péptidos hidrófobos (Kamau *et al.*, 2010).

2.2.2 Propiedades de las proteínas del lactosuero como vehículos para compuestos bioactivos

Muchas de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas del lactosuero permiten que funcionen como vehículos naturales para compuestos bioactivos. Entre las propiedades más importantes se incluyen: unión de iones, excelentes propiedades superficiales, interacciones con macromoléculas para formar complejos y conjugados con propiedades sinérgicas, biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo cual, permite el control de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y por lo tanto, mejorar su biodisponibilidad (Ha *et al.*, 2019).

2.3 *Opuntia ficus indica*

Opuntia pertenece a la familia de las cactáceas, y es comúnmente conocido con el nombre de *nopal*. Su origen proviene del continente americano, distribuido desde Canadá hasta Argentina, con preferencia en las zonas áridas y semiáridas (Loayza y Chávez, 2007). Respecto a su composición química, el nopal verdura contiene: 90 % de agua, 3 – 7 % de carbohidratos (sacarosa, fructosa y glucosa), 2 % de fibra, 1 % de proteína y lípidos 0.2 % (Florian *et al.*, 2005). También contiene minerales como el calcio (130 mg/100 g), fósforo (21 mg/100 g) y hierro (1.95 mg/100 g) (INECC, 2007).

Con relación al contenido de calcio del nopal, se ha observado un incremento en el contenido de sales de calcio (carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, oxalato de calcio monohidratado) en función de la etapa de desarrollo de la cactácea, cuyo contenido es mayor en pencas con 150 días a partir del brote (Contreras-Padilla *et al.*, 2015). Así mismo, se ha demostrado que el contenido de calcio total del cladodio es significativamente mayor en la fibra soluble en comparación con la fibra insoluble (Rojas-Molina *et al.*, 2015).

El nopal, como ya se mencionó anteriormente, contiene fibra soluble e insoluble. La fibra soluble se compone principalmente de pectinas, mucílago y hemicelulosas consideradas como gomas, en tanto que la fibra insoluble la constituyen celulosas y ligninas (López-Palacios *et al.*, 2011).

La fibra soluble o mucílago del nopal tiene propiedades fisicoquímicas interesantes como son su viscosidad y su elevada capacidad de retención de agua que le permiten

ser utilizado como sustrato por la microbiota intestinal para generar productos como ácidos grasos de cadena corta e incrementar la población de bifidobacterias, las cuales se relacionan con efectos benéficos en la salud como por ejemplo, la regulación de procesos inflamatorios relacionados al desbalance de bacterias patógenas y bacterias benéficas a nivel intestinal (Cruz-Rubio *et al.*, 2020).

2.3.1 Mucílago de *Opuntia ficus indica*

El mucílago es una sustancia polimérica con estructura ramificada por carbohidratos, constituidos por: D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa, D-xilosa, L-ramnosa, D-galacturónico y ácidos glucurónicos (Kaur *et al.*, 2012). El mucílago contiene una fracción de pectina con propiedades gelificantes cuando se mezcla en agua en presencia de calcio (Sepúlveda *et al.*, 2007).

2.3.2 Aplicaciones farmacéuticas del mucílago del nopal *Opuntia ficus indica*

Por sus propiedades de viscosidad (espesante), mucoadhesiva, mucoprotectora, y nutracéuticas, el mucílago de nopal se ha utilizado en las últimas décadas como un componente de valor agregado en diversas composiciones farmacéuticas y nutracéuticas (Peña-Valdivia *et al.*, 2012; Solano *et al.*, 2018; Reyes-Buendía *et al.*, 2020). Así mismo, se han desarrollado nanopartículas empleando un extracto acuoso de nopal, utilizado como vehículo para la quercetina demostrando su efecto antibacteriano incluso con bacterias que son multirresistentes (Gade *et al.*, 2010).

En otro estudio, se utilizó el mucílago del *Opuntia* para obtener una microcápsula con las condiciones óptimas para la obtención de compuestos activos, como fue en este caso, el encapsulamiento de betacianinas, sugiriendo su incorporación ya sea para aditivos en alimentos, como colorante o como un antioxidante en diversas enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (Otálora *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha observado la presencia de sales de calcio en esta cactácea a 50, 100 y 150 días de maduración, como lo son el carbonato de calcio (calcita), oxalato de calcio monohidratado (whewellita), bicarbonato de calcio y magnesio, entre otros. Todos estos compuestos fueron detectados a través de diversas técnicas como difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido y espectroscopia infrarroja de transformada Fourier (Contreras-Padilla *et al.*, 2015). Así mismo, Hernández-

Becerra *et al.* (2017), emplearon cladodios del nopal *O. ficus indica* con etapas de maduración de 25, 60, 100 y 135 días, las cuales fueron utilizadas como única fuente de calcio en el alimento para ratas Wistar macho en etapa de crecimiento, en donde se observó que los cladodios con 100 y 135 días de maduración precisaron una mejora en las características microestructurales del fémur, por lo cual, se obtuvo una mayor resistencia para la fractura del hueso. Por otra parte, Mendoza-Ávila *et al.* (2020) demostraron que la biodisponibilidad del calcio presente en los cladodios de 100 y 135 días de maduración del *O. ficus indica* en ratas en crecimiento es mayor en la fibra soluble de *O. ficus indica* en comparación con la fibra insoluble. Adicionalmente, el calcio contenido en el mucílago (fibra soluble) del *O. ficus indica* con una edad de 135 días de maduración fue altamente biodisponible en ratas con ovariectomía, cuyos huesos fueron más resistentes a la fractura con respecto a los huesos del grupo alimentado con la fibra insoluble de dicha cactácea (Quintero-García *et al.*, 2020).

Con base en lo anteriormente señalado, las propiedades químicas, fisicoquímicas y la actividad biológica (biodisponibilidad del calcio) del mucílago de *O. ficus indica* son idóneas para ser utilizado en el desarrollo de nuevos agentes bioactivos como fuente de calcio para el tratamiento de diversas enfermedades asociadas con la deficiencia de este mineral como es el caso de la osteoporosis (Aguilera-Barreiro *et al.*, 2013).

2.4 Coacervación compleja utilizando biopolímeros

2.4.1 Coacervación compleja

La coacervación es un proceso en el que uno o varios polímeros o hidrocoloides en solución se separan, uniéndose y depositándose inicialmente en grupos de moléculas que, dependiendo de la existencia previa o no, en el vehículo, de partículas sólidas o líquidas, coalescen o se agregan sobre estas últimas formando una película continua que las rodea y, si no es el caso, las moléculas poliméricas o los hidrocoloides se pueden agrupar para formar matrices esféricas. En el primer caso, las partículas formadas se denominan microcápsulas y en el segundo, microesferas. (Quirino, 2021).

En función de los solutos (polímeros o hidrocoloides) presentes en la solución y del mecanismo físico o fisicoquímico (ionización o disociación por cambios de pH o

adición de electrolitos, modificación de solubilidad por cambio de pH, adición de disolvente, cambio de temperatura) involucrado en la separación de fases, la coacervación se divide en dos tipos: simple y compleja. La coacervación compleja es aquella en la cual dos o más polímeros con cargas opuestas se unen por la diferencia en cargas electrostáticas (Gorji *et al.*, 2018; Quirino 2021).

Cuando se desarrolla una microesfera a partir de un polímero, la liberación del fármaco puede ocurrir por difusión o por degradación parcial o total de la estructura de la microesfera, es decir, a partir de la superficie de la matriz que entra en contacto con un medio fisiológico, se inicia un proceso de liberación de la sustancia activa, la cual adquirirá una velocidad de liberación y mostrará una cinética que dependerá de la constitución de la microcápsula o de la microesfera y de la naturaleza química y física del activo (Quirino 2021; Sáez *et al.*, 2004).

Existen sistemas con un recubrimiento hidrofóbico en la matriz, con los cuales se consigue una capa protectora que rodea a la microesfera conocida como shell-core (mononuclear); pudiéndose también conseguir que los polímeros se encuentren dispersos en la matriz al mismo tiempo que forman una pared de recubrimiento (shell-matriz microcápsula) (Haffner *et al.*, 2016). La Figura 1 muestra ejemplos de este tipo de sistemas matriciales, con y sin recubrimiento.

Una de las técnicas utilizadas para elaborar microesferas es a través de la coacervación compleja, es el proceso de coacervación cuando se mezclan dos o más coloides que presentan una carga opuesta (catión y polianión) (Gorji *et al.*, 2018).

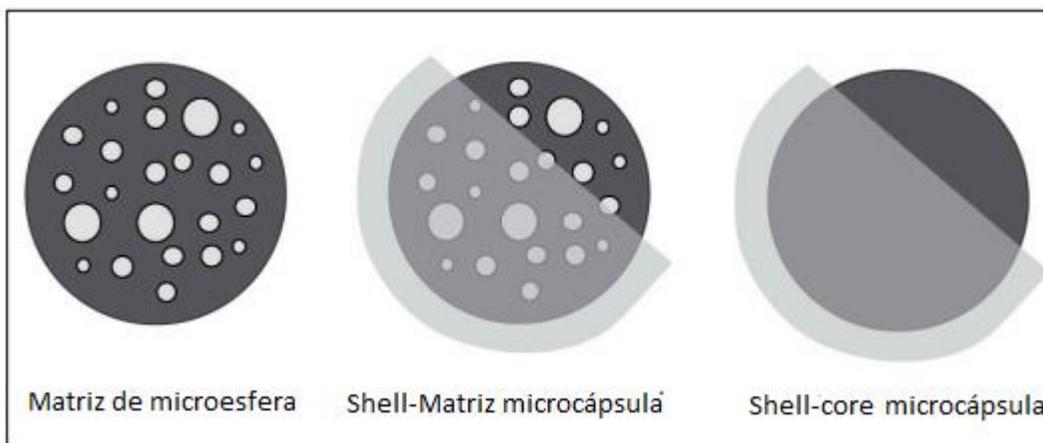


Figura 1. Diferentes estructuras de microesferas. (Haffner *et al.*, 2016).

En diversos estudios se ha utilizado la coacervación de proteínas y polisacáridos como componentes de procesos de coacervación compleja. Por ejemplo, el aceite de pescado se ha utilizado en la microencapsulación para enriquecer el queso procesado. Se ha demostrado que el coacervado de proteínas de leche precalentado forma emulsiones estables con un tamaño promedio de gotitas de 0.21 μm . Haciendo una comparación entre el aceite encapsulado y no encapsulado, el primero, tiene una menor oxidación y mejora la calidad sensorial del queso (Livney, 2010).

En el caso de los dextranos, estos compuestos han sido utilizados en la coacervación con proteínas para la formación de geles (Spotti *et al.*, 2013). Es importante destacar que existen tres factores principales que determinan la naturaleza del gel de la mezcla o la conjunción de la proteína y el polisacárido, las cuales se mencionan a continuación: 1) condiciones ambientales (pH, fuerza iónica y contenido de mineral), 2) composición proteica (grado de desnaturalización y concentración y 3) condiciones de procesamiento (velocidad de calentamiento y enfriamiento) (Turgeon y Beaulieu, 2001).

Por otro lado, se han observado ventajas al utilizar la coacervación de proteínas-polisacáridos, como son la mejora de propiedades fisicoquímicas (cinética de agregación, solubilidad, biodisponibilidad, estabilidad emulsificante, textura de la microesfera, propiedades reológicas, etcétera), mismas que son dependientes de las interacciones entre los dos biopolímeros para lograr un cambio molecular en su estructura. Dichos cambios proceden de la manipulación de factores como: pH,

relación polímeros-proteínas, entalpía del sistema, viscosidad, potencial Z, intensidad de la carga de Coulomb, entre otras, que determinan las propiedades farmacéuticas y nutracéuticas del preparado obtenido (Turgeon y Beaulieu, 2001; Leng y Turgeon, 2007; Jing *et al.*, 2007; Sing y Perry, 2020).

2.4.2 Microesferas como coadyuvantes para el tratamiento de osteoporosis

El desarrollo de microesferas ha tenido gran impacto para incrementar la eficacia de algún fármaco con respecto a su liberación controlada, es decir, manteniendo los niveles séricos del compuesto activo por periodos prolongados, como es el caso del injerto bioactivo óseo conocido como el cemento de fosfato de calcio (CPC). Este compuesto, es utilizado comúnmente para el tratamiento de fracturas; sin embargo, en personas con osteoporosis no ha sido del todo efectivo. Es por esto que Li y Liu (2010) desarrollaron microesferas utilizando el rhBMP-2 (proteína osteoinductora) incorporando el CPC, demostrando que la liberación de rhBMP-2 era más efectiva utilizando microesferas de CPC-rhBMP-2 gracias a su liberación controlada en vez de emplear únicamente rhBMP-2 en un modelo de cabras con ovariectomía. Otro polímero comúnmente utilizado para el desarrollo de microsferas para el tratamiento alternativo de la osteoporosis es el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), el cual ha sido empleado para encapsular fármacos como el risedronato de sodio, la calcitonina, el alendronato sódico, el estradiol y la parathormona. El polisacárido quitosano también ha sido empleado para desarrollar microesferas y encapsular calcitonina. El incremento en la biodisponibilidad de algunos fármacos antiosteoporóticos se ha obtenido gracias a la encapsulación con de polímeros naturales (Martino *et al.*, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

La osteoporosis es una de las enfermedades crónicas más comunes y es considerada como una epidemia creciente a nivel mundial debido al envejecimiento de la población y a los cambios en el estilo de vida. En México, el 43 % de la población femenina padece osteopenia, lo que representa que 1 de cada 12 mujeres sufrirá una fractura después de la menopausia. Esto es debido al desbalance hormonal existente a partir de la quinta década de su vida. Durante esta etapa los niveles de estrógeno disminuyen, lo que conlleva a una alta resorción ósea y a una baja activación del remodelado óseo. Esto incrementa la pérdida de hasta el 3 % anual de la masa ósea y, en consecuencia, el riesgo de fractura. Las lesiones de las pacientes con fractura son consideradas como graves, ya que su calidad de vida se reduce considerablemente debido a que experimentan dolor crónico severo y pérdida de movilidad a largo plazo que conduce a una muerte prematura. Por otra parte, la carga económica para los sistemas de salud y la sociedad también es enorme y se incrementa año con año. Existen diferentes alternativas para el tratamiento de la osteoporosis como son el empleo de bifosfonatos y la terapia de reemplazo hormonal. Este tipo de terapias tienen un efecto benéfico al incrementar el nivel de densidad mineral ósea en vértebras, caderas y fémur. Sin embargo, se les ha relacionado con efectos secundarios entre los que destacan neuralgias, mialgia, náuseas, trombosis, osteonecrosis y cáncer (ovárico y mamario). Por otro lado, los suplementos elaborados a partir de sales de calcio como el carbonato y el citrato han sido recomendados por varios años debido a que son económicamente accesibles y su dosificación es sencilla. No obstante, en estudios recientes se ha observado que el consumo de este tipo de sales no reduce el riesgo de fractura, sino que, además, son promotores de acidez gástrica.

La osteoporosis es una enfermedad que puede prevenirse a través de un consumo adecuado de alimentos ricos en calcio en la dieta como son algunos vegetales, la leche y sus derivados; no obstante, existe la limitante de las personas en cuyos hábitos dietarios no incluyen los vegetales o presentan intolerancia a la lactosa. La nanotecnología ha sido utilizada para la elaboración de productos nutracéuticos mediante el aprovechamiento de principios bioactivos obtenidos a partir de productos naturales. Sin embargo, constituye un campo poco explorado para el diseño de

productos nutracéuticos ricos en calcio con efectos benéficos en la salud ósea y sin los efectos secundarios que presentan las terapias actuales para incrementar la masa ósea. Por lo que el objetivo de este trabajo consiste en obtener microesferas a partir de dos subproductos de la industria agroalimentaria con alto contenido de calcio como son el lactosuero y el mucílago extraído de las pencas de nopal en etapa tardía de desarrollo, a fin de incrementar la biodisponibilidad de dicho mineral demostrando este potencial en un modelo *in vitro*.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La cinética de liberación de calcio a partir de las microesferas elaboradas a partir del lactosuero y polisacáridos del mucílago de *Opuntia ficus indica*, permite proponer a dichas microestructuras como una fuente de calcio potencialmente biodisponible?

5.HIPÓTESIS

Las microesferas obtenidas a partir del lactosuero y polisacáridos del mucílago de *Opuntia ficus indica*, constituyen una fuente de calcio potencialmente biodisponible debido a que presentan propiedades fisicoquímicas que favorecen una cinética de liberación modificada de este mineral.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Desarrollar microesferas a partir del lactosuero y del mucílago de la especie *O. ficus indica* y determinar la cinética de liberación del calcio a partir de dichas microestructuras en un modelo *in vitro*.

6.2 Objetivos particulares

- 6.2.1 Realizar la caracterización fisicoquímica del mucílago de la especie *O. ficus indica* y lactosuero a emplear en el desarrollo de las microesferas biopoliméricas.
- 6.2.2 Obtener y caracterizar las microesferas biopoliméricas elaboradas a partir de del lactosuero y mucílago de la especie *O. ficus indica* mediante el proceso de coacervación compleja determinando su tamaño de partícula, potencial zeta y su estabilidad.
- 6.2.3 Determinar la cinética de liberación del calcio a partir de las microesferas biopoliméricas en un modelo *in vitro*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material vegetal

Los cladodios (pencas) de nopal (*Opuntia ficus indica*) se cosecharon en el campo experimental de Amazcala de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). Se recolectaron en la etapa de maduración de 100 días a partir del brote.

7.1.1 Preparación de las muestras de *O. ficus indica*

Se realizó el proceso de desespinado, lavado y cepillado de las pencas de *O. ficus indica*, para después colocarlas en charolas de acero inoxidable y ser deshidratadas utilizando una estufa de aire forzado marca BG Didacta Italia, modelo E 102 (Contreras-Padilla *et al.*, 2011). Finalmente, se trituró el nopal en un molino de martillos estriado PULVEX 200 y los sólidos granulares resultantes se hicieron pasar a través de una malla 60 USA.

7.1.2 Extracción del mucílago de las muestras de *O. ficus indica*

La suspensión para la extracción del mucílago del nopal se llevó a cabo con base en la metodología reportada por Rojas-Molina *et al.* (2015). Por cada litro de fibra soluble que se obtuvo se agregaron 2 L de etanol con un 96 % de grado de pureza. La mezcla se filtró a vacío en un embudo Büchner a 30 mm Hg. Finalmente, se colocó en charolas para su deshidratación en una estufa de vacío marca Barnstead International, modelo 3618, hasta alcanzar una humedad del 4 %.

7.2 Caracterización del mucílago de *O. ficus indica*

7.2.1 Rendimiento y eficiencia de separación

Se prepararon dos suspensiones, la primera suspensión fue obtenida de la molienda de nopal fresco determinándose la humedad (Método 925.10, AOAC, 2000) y por diferencia de peso se obtuvo el contenido de sólidos totales en la suspensión que resultó de 4 g/100 g, esta determinación se realizó con la finalidad de tener una misma concentración de sólidos totales en la suspensión del nopal deshidratado. La segunda suspensión se preparó con los sólidos granulares del nopal deshidratado y agua, utilizando un homogeneizador (IKA-WERKE, modelo EUROSTAR BSC.S1, Wilmington, NC, EE. UU.) a una velocidad de 450 rpm por 5 minutos. Ambas suspensiones se dejaron reposar 2 h a 10 °C. La suspensión de nopal deshidratado se centrifugó para separar el mucílago en una centrífuga de discos concéntricos

(DIDACTA, Mod. TAG1/d, Torino, TO, Italia) con una velocidad de alimentación al equipo de 200 mL/min, una velocidad de giro de 7000 rpm. Inicialmente, se separó la fracción ligera o líquido obtenido a partir del centrifugado (fibra soluble) de la fracción pesada o sólidos fibrosos de los cladodios (fibra insoluble). El mucílago se obtuvo a partir de la fracción ligera mediante una precipitación con alcohol etílico 96° GL en una relación 1:2 v/v (fracción ligera: alcohol etílico). Posteriormente, el mucílago se filtró a vacío en un embudo Büchner a 40 mm Hg utilizando medio filtrante de poliéster-algodón (70-30 %) con una abertura de 20 µm. Finalmente, el mucílago se deshidrató en un horno de aire forzado (BG model E102 USA) a 35 °C durante 40 minutos. La suspensión de nopal fresco fue procesada utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente.

El rendimiento de mucílago a partir de cladodios tanto frescos como deshidratados se obtuvo con la ecuación (1) (Bostan *et al.*, 2010):

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{P_m}{P_c} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde:

P_m = peso de sólidos totales del mucílago (g)

P_c = peso de los sólidos totales de los cladodios (100g)

La eficiencia de separación entre la fracción ligera y la fracción pesada de la operación de centrifugado se realizó utilizando el valor de la turbidez observada en la fracción ligera con la ecuación (2) reportada por Bai *et al.*, 2017. La turbidez se determinó en la fracción soluble de la suspensión obtenida con el mucílago de los cladodios de cada una de las fracciones solubles de las suspensiones centrifugadas.

La turbidez fue analizada con un turbidímetro (HANNA, Mod. LP 2000, Woonsocket, RI, EE.UU.) por el método 1889-88a ASTM (2012).

$$\text{Eficiencia de separación} = \left(\frac{T_{sn} - T_{fl}}{T_{sn}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde:

T_{sn} = turbidez de la suspensión elaborada con nopal fresco o deshidratado (t_{sn})

T_{fl} = turbidez de la fracción ligera (t_{fl})

7.2.2 Análisis químico proximal

Se determinó el análisis químico proximal de los mucílago frescos y deshidratados acorde con los métodos establecidos por la Asociación Americana de Químicos de Cereales por los métodos 08.01.01 y 32-05.01 (AACC, 2001) y la AOAC 2000 (Asociación Oficial de Químicos Analistas) (método 997.09). El extracto libre de nitrógeno, se calculó por diferencia (% NFE = 100 - [% humedad +% Fibra bruta +% Proteína bruta +% Extracto de éter +% Ceniza]) (Quintero-García *et al.*, 2021).

7.2.3 Análisis del contenido de calcio

El contenido de calcio en las muestras de mucílago se determinó mediante el método de incineración seca a partir de las cenizas secas, se analizó el contenido de calcio por el método 968.08 (AOAC, 2000), de acuerdo con lo reportado por Gutiérrez *et al.* (2007) y utilizando un espectrómetro de absorción atómica de doble haz (Perkin Elmer, Mod. Analyst 300, Boston, MA, EE. UU.). Se utilizó CaCO₃ (1000 ppm) como estándar de calcio para elaborar la curva de calibración. El equipo fue operado con aire seco a 82.80 kPa, acetileno a 483 kPa usando un detector de llama de 422 nm, con una lámpara a 10 mA y un ancho de onda de 0.7 nm (Rojas-Molina *et al.*, 2015).

7.2.4 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido

La morfología de los cladodios de *O. ficus indica* y el mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados se estudió mediante microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (LV-SEM) utilizando un microscopio JSM 5600LV (Tokio, Japón) con una resolución de 5 nm, ajustado con un espectrómetro de rayos X con energía de dispersión (Noran, Mod. Voyager 4.2.3). Las condiciones de análisis fueron las reportadas por Mendoza-Ávila *et al.* (2020).

7.2.5 Caracterización del mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados de *O. ficus indica* mediante análisis infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-FT).

Las muestras de mucílago se caracterizaron utilizando un espectrofotómetro IR-FT (Perkin Elmer, Mod. Spectrum Two, Boston, MA, EE.UU.) con ATR (reflectancia total atenuada). La transmitancia se registró en longitudes de onda entre 500 y 4000 cm⁻¹ (Quintero-García *et al.*, 2021).

7.2.6 Potencial Z y Tamaño de Partícula

Los sólidos granulares muy finos de mucílago obtenidos a partir de cladodios frescos y deshidratados se disolvieron en agua desionizada para obtener soluciones de mucílago al 0.0625 % (m/v) a temperatura ambiente. Los sólidos se mezclaron con un homogeneizador a 600 rpm durante 10 min (IKA-WERKE, Mod. Eurostar BSC.S1, Wilmington, NC, EE. UU.). Las dispersiones se almacenaron durante 24 horas hasta su análisis. Las evaluaciones del potencial Z se realizaron utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido) a una temperatura de 25 °C para obtener el potencial Z y el tamaño de partícula (Quintero-García *et al.*, 2021).

7.2.7 Viscosidad del mucílago extraído de cladodios de *O. ficus indica* frescos y deshidratados

Los sólidos granulares de mucílago pulverizados obtenidos tanto de los cladodios frescos y deshidratados se disolvieron en agua destilada para preparar soluciones de mucílago a diferentes concentraciones de 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 % (m/v) a 25 °C con agitación magnética durante 45 minutos para completar la hidratación. Posteriormente las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente para su análisis. Las mediciones se realizaron en modo rotacional a diferentes velocidades de cizallamiento en un rango de 64.6 a 600 s⁻¹ en un viscosímetro con geometría de cilindro concéntrico (Mettler-Toledo, Mod. RM180 Rheomat, Columbus, OH, USA.) y un sensor de cilindro giratorio (DIN 1). Los datos se utilizaron para obtener los gráficos de esfuerzo cortante (Pa) *versus* a la velocidad de corte (s⁻¹) y los reogramas de viscosidad (Pa.s) *versus* la velocidad de corte (s⁻¹). Los valores del índice de comportamiento del flujo (n) y del índice de consistencia (k) se calcularon ajustando el modelo para la ley de la potencia (Hussain *et al.*, 2015).

7.2.8 Análisis termogravimétrico (TGA y DSC)

Los análisis termogravimétricos de las muestras se realizaron con un equipo TGA Q5000IR y en un calorímetro diferencial de barrido (DSC) (TA Instruments, New Castle, EE. UU.). Para el análisis de TGA se utilizó una atmósfera de nitrógeno con un flujo de 30 mL / min, una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, una temperatura que varió de 25 a 600 °C y el software de análisis utilizado fue el TRIOS 4.3.0. 38388. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Para la determinación del DSC el

calentamiento se realizó con un flujo de 30 mL/min y a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera de nitrógeno dentro de un intervalo de temperatura de -50 a 230 °C. Se usó un crisol de aluminio con tapa de aluminio, sellados y sin sello hermético. El análisis de datos se realizó mediante los termogramas que arrojó el software, donde se determinó el valor de la temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras estudiadas. (Quintero-García *et al.*, 2021)

7.2.9 Análisis del perfil de textura (TPA)

Las muestras se disolvieron en agua destilada a 35 °C para preparar soluciones al 4 % (m/v) usando un agitador térmico (Thermo Scientific, Mod. 4625Q, Waltham, MA, USA.) a una velocidad máxima de 250 rpm. Posteriormente, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 h hasta su análisis. Se utilizó un Texturómetro Universal (Shimadzu, Mod. EZ-S, Kioto, Japón) para obtener la curva fuerza *versus* tiempo empleando una compresión en dos ciclos. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura controlada de 25 °C. Se utilizó un cilindro (2.54 cm de diámetro) para comprimir las muestras colocadas en una placa de Petri (6.0 cm de diámetro, 1.5 cm de altura). La velocidad de descenso del cilindro fue de 1.3 mm/s hasta una profundidad de compresión de 8 mm (20 % de compresión), cuando se completó el ciclo de compresión, se invirtió la dirección del émbolo para iniciar la trayectoria ascendente. En seguida, se llevó a cabo el segundo ciclo de ascenso y descenso del cilindro en la misma muestra con un intervalo de tiempo de 5 segundos antes del segundo ciclo de compresión. El software del instrumento permitió registrar y obtener directamente la curva de fuerza *versus* tiempo. Se realizaron cinco repeticiones para cada muestra de mucílago. réplicas para cada muestra (Quintero-García *et al.*, 2021).

7.2.10 Determinación de color

La medición del color de las muestras de mucílago se realizó utilizando un colorímetro (Minolta, CR300, Tokio, Japón). Se utilizaron las escalas tridimensionales expresadas por Hunter L, a y b para cuantificar los valores de color, que se registraron como L: oscuridad/claridad (0, negro; 100, blanco); a (-a, verdoso; +a, enrojecimiento); y b (-b, azulado; +b, amarillento). Además, la diferencia de color total (ΔE) se calculó de acuerdo con la ecuación (3). Las mediciones de color se repitieron desde tres posiciones diferentes (Quintero-García *et al.*, 2021).

$$\Delta E = \frac{((L * 1 - L * 2)^2 + (a * 1 - a * 2)^2 + (b * 1 - b * 2)^2)^{1/2}}{2} \quad \text{Ecuación (3)}$$

7.3 Caracterización del lactosuero

El lactosuero fue proporcionado por la empresa CYTECSA (Ciencia y Tecnología en Sistemas Alimentarios, México). En dicho concentrado se realizaron los análisis que se mencionan a continuación.

7.3.1 Potencial Z y punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico se determinó con el método 44-19 del AOAC (2000), utilizando un potenciómetro 1100 (Jenway, 3510, Staffordshire, Reino Unido) previamente calibrado con soluciones buffer estándar en un rango de pH de 2.0 – 5.0. Se obtuvieron soluciones al 1 % de lactosuero (m/m). Las dispersiones se almacenaron durante 24 horas hasta su análisis. Las evaluaciones del potencial Z se realizaron utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido) a una temperatura de 25 °C para obtener el potencial Z y el tamaño de partícula.

7.3.2 Análisis del contenido de calcio

A partir de las cenizas secas, se analizó el contenido de calcio por el método 968.08 (AOAC, 2000), de acuerdo con lo reportado por Gutiérrez *et al.* (2007) como se describió en el apartado 7.2.3 de esta sección.

7.4 Obtención de las microesferas biopoliméricas de lactosuero-mucílago de *O. ficus indica* por coacervación compleja

Se prepararon dos suspensiones, la primera correspondiente al lactosuero a una concentración del 1 % (m/m) y la segunda consistió en una solución al 0.0625 % (m/m) de mucílago obtenido a partir de cladodios de *O. ficus indica*. Se aplicó el proceso de coacervación compleja mezclando por inmersión mecánica las dos suspensiones a una razón de proporcionalidad 1:2, mucílago:lactosuero (M:L) a tres diferentes pH: 2.0, 4.0 y 5.0 a fin de obtener tres suspensiones coloidales. El ajuste del pH se realizó utilizando ácido clorhídrico al 0.1 N. De acuerdo con los resultados derivados de las micrografías del tamaño de partícula y del potencial Z, el desarrollo de las microesferas se realizó con la suspensión coloidal M:L a condiciones de pH 2.0. Sin embargo, para lograr una mejor interacción electrostática entre los dos biopolímeros,

se llevó a cabo la siguiente modificación: Se aplicó un tratamiento con onda ultrasónica utilizando un baño de ultrasonido (Branson Ultrasonics CPX3800H-E, Connecticut, USA) para el lactosuero al 1 % (m/m) durante un tiempo de 15 minutos, con una frecuencia de onda de 20 kHz y una intensidad de 35 W/cm². Al finalizar, esta muestra se mezcló con el mucílago (relación 1:2 y pH 2.0). La suspensión coloidal resultante (M:L 1:2 pH 2.0) se almacenó a una temperatura de 4 °C hasta su análisis.

7.4.1 Centrifugación de la suspensión coloidal (M:L pH 2.0): obtención del sedimento y sobrenadante

En las evaluaciones del tamaño de partícula de la suspensión coloidal (M:L pH 2.0) se observaron en el gráfico dos poblaciones de partículas con rangos desde nanómetros hasta micrómetros. Para lograr la separación de dichas poblaciones, se aplicó la fuerza centrífuga en la suspensión coloidal (M:L pH 2.0) utilizando una centrifuga digital (Lhobo, FTD4C, China) utilizando 3500 rpm durante un tiempo de 15 minutos. El sobrenadante y el sedimento obtenido se almacenaron a una temperatura de 4 °C hasta su análisis.

7.5 Caracterización de las microesferas biopoliméricas de proteína de lactosuero-mucílago de *O. ficus indica*

7.5.1 Determinación de la microestructura por microscopía electrónica de barrido

La microestructura de las microesferas se analizó mediante imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (Jeol JSM 6060LV, Tokio, Japón) acorde con la metodología reportada Rojas-Molina *et al.* (2015).

7.5.2 Determinación del tamaño de las micropartículas y Potencial Z

La distribución de tamaño desde nanómetros hasta milímetros y la polidispersidad de las tres suspensiones coloidales (M:L; pH 2.0, 4.0 y 5.0) se determinó por la técnica de difracción laser (a partir de la variación angular de la intensidad de la luz a través de la muestra) en una celda para muestras en dispersión líquida (Horiba, LA-960, Kioto, Japón) con el método descrito por Martino *et al.* (2016). El potencial Z se evaluó con el equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Reino Unido) a una temperatura de 25 °C.

Finalmente, para las muestras de M:L pH 2.0 (con tratamiento de ultrasonido en el lactosuero), y sus derivados (sedimento y el sobrenadante), la evaluación del potencial Z y determinación del tamaño se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección 7.2.6.

7.5.4 Contenido de calcio

La determinación del contenido de calcio se realizó en las suspensiones biopoliméricas independientes (lactosuero y mucílago) empleando la metodología descrita en el apartado 7.3.2. Por otro lado, la determinación de calcio proveniente de la suspensión coloidal M:L 1:2 pH 2.0 (con sonicación del lactosuero) y el sobrenadante, se empleó una técnica con más sensibilidad para la detección de calcio de dichas muestras. La técnica utilizada fue Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES) empleando un equipo iCAP 6500 Dúo (Marca ThermoFisher, Massachusetts, EE.UU). Las condiciones del equipo de plasma para el análisis fueron: RF (radiofrecuencia) 1150 W, flujo del gas auxiliar 0.5 L/min, flujo del gas de nebulización 0.6 L/min., flujo del gas refrigerante 10- 20 L/min. y tiempo de estabilización de 2 s.

Cabe destacar que la detección de calcio en la muestra del sedimento no fue posible determinarla debido a las condiciones de ésta (por su relativamente alta viscosidad y turbidez).

7.6 Cinética de liberación del calcio a partir de las microesferas biopoliméricas *in vitro*

La proporción de calcio liberado de la suspensión coloidal (M:L 1:2 pH 2.0) y del sobrenadante obtenido después de centrifugar la suspensión coloidal, se determinó por disolución *in vitro*, acorde a la metodología adaptada de lo publicado por Gazga-Urioste *et al.* (2018), para lo cual se utilizaron membranas de diálisis (Spectra/Por® Dialysis, USA) con tamaño de poro de 1 KDa, que contenía 15 mL de dichas suspensiones. El medio de disolución (ácido clorhídrico y buffer de fosfatos) fue establecido con valores de pH entre 2.0 y 8.2; habiéndose sometido muestras del coacervado M:L, 1:2, pH 2.0; por separado, a cada medio (ácido y alcalino). Como controles, se evaluó independientemente, la liberación del calcio contenido tanto en las dispersiones de lactosuero al 1 % m/m, como de mucílago al 0.0625% m/m. El análisis se llevó a cabo manteniendo una temperatura en el baño maría fue de 37 ± 0.5 °C. Los tiempos establecidos para la toma de alícuotas fueron de 5, 10, 15 y 30

minutos para medio ácido y básico respectivamente. El calcio liberado se cuantificó por ICP-OES como se describe en el punto 7.5.4.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* fueron examinados aplicando un análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó la prueba de Tukey para detectar diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos ($p \leq 0.05$) y la prueba Kruskal-Wallis para la determinación del valor p en el modelo matemático, empleando el programa estadístico GraphPad Prism (USA) versión 6. Para el análisis de los resultados de la cinética de liberación de calcio *in vitro* y el modelo matemático se empleó el software Microsoft® Excel® 2016 versión 2110.

8. CUADRO METODOLÓGICO



Figura 2. Cuadro Metodológico. Descripciones del primer, segundo y tercer objetivos.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Rendimiento y eficiencia de separación del mucílago extraído de cladodios frescos y secos

Los rendimientos obtenidos para la extracción de mucílago a partir de los cladodios de *O. ficus indica* deshidratados y frescos fueron 15.69 ± 0.04 y 13.06 ± 0.19 g/100 g respectivamente, no se observaron diferencias significativas en ambos valores ($p \geq 0.05$). Estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Contreras-Padilla *et al.* (2016), quienes utilizaron condiciones similares para la extracción de mucílago. Por otro lado, se han reportado valores más altos en el rendimiento obtenido para la extracción de este hidrocoloide (de 16.50 a 33 %) (Sepúlveda *et al.*, 2007; Monrroy *et al.*, 2017; Missaoui *et al.*, 2020). Estas discrepancias se pueden atribuir a varios factores: 1) el tipo de disolvente utilizado en el proceso de extracción, cuya polaridad puede influir en las características de solubilidad y transferencia de masa de los compuestos a extraer (Ho *et al.*, 2007), 2) etapa de madurez de los cladodios, se ha observado una relación entre el rendimiento de mucílago y la edad del tallo, a medida que los cladodios son más jóvenes el porcentaje de rendimiento será mayor, ya que su contenido de fibra soluble es alto, a medida que los cladodios envejecen, el contenido de fibra insoluble aumenta (Hernández-Urbiola *et al.*, 2010), 3) la temperatura y el tiempo de extracción son parámetros críticos para una extracción eficaz, ya que implican la convección y conducción del disolvente al núcleo de las partículas de la matriz y la interacción del disolvente con las partículas diana (Grosso *et al.*, 2015).

Aunque algunos autores han reportado rendimientos similares o incluso superiores para la extracción de mucílago de cladodios de *O. ficus indica*, cabe señalar que muy pocos estudios mencionan la eficiencia de extracción. El porcentaje de eficiencia de separación en el mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados fue de 97.1 ± 0.06 % y 96.65 ± 0.01 % respectivamente. Esto significa que la deshidratación de los cladodios no afecta la eficiencia de la separación de hidrocoloides. Es bien sabido que la centrifugación es un proceso crucial para separar impurezas y obtener hidrocoloides de macroalgas para aplicaciones alimentarias (Cong *et al.*, 2016). Por lo tanto, el mucílago obtenido de este proceso de extracción tiene el potencial para

aplicaciones farmacéuticas o de grado alimenticio, que requieren requisitos de pureza más altos que otras aplicaciones (Gómez *et al.*, 2020).

Una de las ventajas de este método de extracción de mucílago de cladodios de *O. ficus indica* es el uso de etanol considerado como solvente ecológico, ya que los peligros que este compuesto representa para la salud y el medio ambiente son relativamente bajos (menos de 3.0 puntos) en conformidad con el método EHS (medio ambiente, salud y seguridad) (Capello *et al.*, 2007). Otras ventajas son que no se requieren tratamientos térmicos para la extracción del hidrocoloide y el tiempo de extracción es corto. Adicionalmente, para la obtención del mucílago se utilizaron cladodios en etapa tardía de maduración, los cuales se clasifican como residuos por carecer de valor comercial. En consecuencia, este proceso puede considerarse como un método de extracción sostenible (Matos *et al.*, 2021).

9.2 Composición química del mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados

El análisis químico proximal y contenido de calcio del mucílago extraído de cladodios frescos (MNF) y cladodios deshidratados (MND) se presentan en la Tabla 1. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de proteína, cenizas, extracto libre de nitrógeno (ELN) y de calcio entre las muestras.

El contenido de humedad en el mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados presentó valores en alrededor al 4 %. Este porcentaje es similar a los reportados anteriormente (de 4.4 a 4.5 %), cuando se utilizó un secador por aspersion de flujo para la deshidratación del mucílago de *O. ficus indica* con una temperatura del aire de entrada de 170 °C (León-Martínez *et al.*, 2010). En este sentido, se ha reportado que se requiere el uso de altas temperaturas o períodos de tiempo relativamente largos para eliminar el exceso de agua en el mucílago, que está estructurado por heteropolisacáridos ácidos de cadena larga capaces de absorber y retener grandes cantidades de agua (Cárdenas *et al.*, 1997).

Tabla 1. Análisis químico próximo y contenido de calcio en mucílago extraídos de cladodios de *Opuntia ficus indica* frescos y deshidratados.

Componente	MNF	MND
Humedad (%)	4.12 ± 0.02 ^a	4.19 ± 0.02 ^a
Lípidos (%)	2.11 ± 0.10 ^a	2.13 ± 0.01 ^a
Proteína (%)	6.52 ± 0.10 ^a	7.93 ± 0.02 ^b
Cenizas (%)	3.15 ± 0.02 ^a	5.18 ± 0.02 ^b
Fibra cruda (%)	0.33 ± 0.01 ^a	0.31 ± 0.01 ^a
ELN (%)	83.77 ± 0.02 ^a	80.26 ± 0.04 ^b
Calcio (mg/100 g)	15.18 ± 0.15 ^a	19.05 ± 0.25 ^b

Los valores representan la media ± desviación estándar (DE), n = 5. Las medias en filas con letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$). ELN = extracto libre de nitrógeno. MNF = Mucílago extraído de cladodios frescos. MND = Mucílago extraído de cladodios deshidratados (Quintero-García *et al.*, 2021).

El contenido de proteína en ambas muestras de mucílago está por arriba del rango (2.7–3.2 g/100 g) observado por Toit *et al.* (2018) y similar al valor detectado por Gebresamuel y Gebre-Mariam (2012) (6.82 g/100 g) en extractos de mucílago obtenidos a partir de cladodios de *Opuntia* spp. El contenido de lípidos fue superior al observado por Toit *et al.* (2018) y Gebresamuel y Gebre-Mariam (2012) quienes encontraron concentraciones de lípidos en un rango de 0.4 a 0.9 %. Al respecto, Toit *et al.* (2018) detectaron la presencia de ácidos grasos de cadena larga (por ejemplo, α -Linolénico y Linoleico, entre otros). Estos ácidos grasos son resistentes a la hidrólisis térmica en un rango de temperatura de 90 a 160 °C por periodos de tiempo entre 30 min y 8 h (Charuwat *et al.*, 2018). Esto significa que las temperaturas utilizadas para la deshidratación de los cladodios y mucílagos no degradan los ácidos grasos esenciales, que se conservan en los productos deshidratados de *O. ficus indica*.

No se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el contenido de fibra cruda entre las muestras (ver Tabla 1). Estos resultados pueden estar asociados con la eficiencia de separación del mucílago a partir de los cladodios frescos y deshidratados, cuyos porcentajes fueron similares. Los contenidos de fibra cruda en el MNF y MND estuvieron por debajo de los datos reportados por Sepúlveda *et al.* (2007) (0.69 %) y superior a los resultados detectados por Toit *et al.* (2018) y Gebresamuel y Gebre-Mariam (2012) (0.2 y 0.06 %, respectivamente).

Con respecto a estos resultados, se esperaba un bajo contenido de fibra cruda en ambos mucílagos, debido a que se ha propuesto que el mucílago de *O. ficus indica* está constituido por diferentes fracciones solubles en agua: 1) una pectina con propiedades gelificantes dependientes de Ca^{2+} , 2) la presencia de mucílago no gelificante y 3) una fracción de polisacárido con propiedades espesantes que representan menos del 10 % del material soluble en agua (Majdoub *et al.*, 2001; Goycoolea y Cárdenas, 2003). En este sentido, en el análisis de fibra cruda solo se cuantifican los componentes insolubles en agua presentes en las muestras, como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Fiber Analysis of Animal Feed-FOOS, 2018).

Las diferencias observadas en los contenidos de proteína, cenizas, extracto libre de nitrógeno y calcio en las muestras analizadas con respecto a los datos reportados con anterioridad, se pueden atribuir a los procesos utilizados para la extracción del mucílago (temperatura, disolventes, etc); así como la temporada de cosecha, condiciones edáficas y la edad de los cladodios. Estos son factores que influyen en el contenido de nutrientes de esta cactácea (Sepúlveda *et al.*, 2007; El-Mostafa *et al.*, 2014; Toit *et al.*, 2018; Missaoui *et al.*, 2020).

El contenido de calcio en el mucílago obtenido de los cladodios deshidratados (19.05 ± 0.25 mg/g) fue significativamente diferente ($p < 0.05$) en comparación con este contenido mineral en el mucílago extraído de cladodios frescos (15.18 ± 0.15 mg/g). Estos valores son similares a lo reportado por Monrroy *et al.* (2017). La mayor parte del calcio en el mucílago se encuentra como CaCO_3 , que es biodisponible (Rojas- Molina *et al.*, 2015; Quintero-García *et al.*, 2020; Mendoza-Ávila *et al.*, 2020). Probablemente, la pérdida de agua como resultado

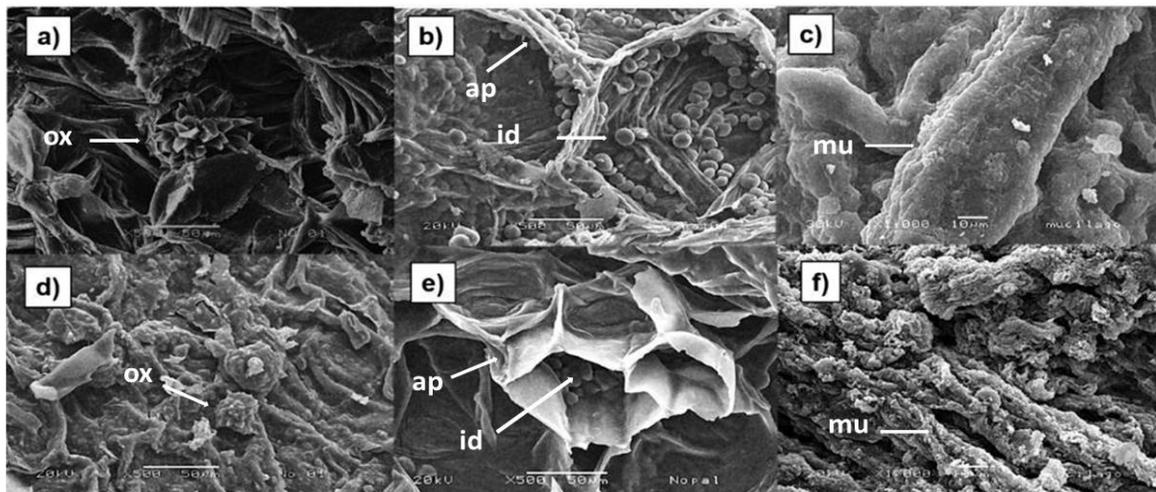
de la deshidratación previa de los cladodios para la obtención del mucílago, aumentó el contenido de proteínas, cenizas, calcio y ELN (disminuyó su valor %) en las muestras. En este sentido, un aumento del contenido de proteínas en el mucílago aumenta su capacidad como agente emulsificante facilitando la formación de una emulsión aceite en agua, ya que las proteínas mejoran la estabilidad de la emulsión y le confieren propiedades fisicoquímicas específicas (McClements, 2004). El contenido de carbohidratos se determinó por diferencia; por consiguiente, el contenido de este componente fue mayor en la muestra de mucílago extraída de cladodios frescos en comparación con el mucílago extraído de cladodios deshidratados.

9.3 Morfología del mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados

La Figura 3 muestra micrografías de cladodios frescos (Figura 3 a y b) y deshidratados (Figuras 3 d y e) de *O. ficus indica*. Las Figuras 3 a y d muestran la presencia de cristales de oxalato de calcio (ox) en la fibra insoluble, tanto en cladodios frescos como deshidratados previamente identificados por otros autores (Rojas-Molina *et al.*, 2015; Contreras-Padilla *et al.*, 2016). Estos cristales se forman dentro de células conocidas como idioblastos cristalinos, cuya función es mantener un equilibrio iónico y regular la presión osmótica de la planta (Malainine *et al.*, 2003).

En la Figura 3 b y e, se observa el parénquima interno de cladodios frescos y deshidratados. Este tejido se caracteriza por la presencia de células isodiamétricas con paredes celulares delgadas compuestas principalmente por celulosa, cuya función es almacenar agua. Por esta razón, este tejido también se conoce como parénquima acuoso (Perrotta y Arambarri, 2018). En el interior del parénquima acuoso, se puede distinguir la presencia de estructuras esféricas y globosas conocidas como células mucilaginosas o idioblastos secretores de mucílago, característicos de las especies de *Opuntia* (ver flechas). La función principal de estas células es la retención de agua cuando la planta está expuesta a largos periodos de sequía (Conde, 1975; Trachtenber y Mayer, 1982; Silva *et al.*, 2001; Perrotta y Arambarri, 2018). Resulta importante denotar que el tamaño de las células del parénquima interno y los idioblastos secretores de mucílago de los cladodios deshidratados (Figura 3e) están

visiblemente reducidos y han perdido su forma esférica en comparación con el tamaño y la forma de estas células en cladodios frescos (Figura 3b). Esto puede explicarse por la eliminación de agua que experimentaron los cladodios deshidratados durante el secado, sin embargo, no hay diferencias en humedad. A este respecto, se ha mencionado que los idioblastos secretores de mucílago pueden representar hasta un 14 % del peso seco de cladodio. Estas células están especializadas para retener hasta más del 30 % del agua como reserva en el área del parénquima (Ventura-Aguilar *et*



al., 2017).

Figura 3. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de cladodios frescos y deshidratados. Imágenes de cladodios frescos (a, b) y deshidratados (d, e) de *O. ficus indica* y mucílagos extraídos de cladodios frescos (c) y deshidratados (f). (a) Cristales de oxalato de calcio (ox) en cladodios frescos, (d) cristales de oxalato de calcio (ox) en cladodios deshidratados, (b) parénquima acuoso (ap) en cladodios frescos con idioblastos secretores de mucílago en el interior (id), (e) parénquima acuoso (ap) en cladodios deshidratados con idioblastos secretores de mucílago en el interior (id), (c) mucílago extraído de cladodios frescos, (f) mucílago extraído de cladodios deshidratados (Quintero-García *et al.*, 2021).

Las figuras 3 c y f pertenecen al mucílago obtenido de cladodios frescos y deshidratados, respectivamente. En las plantas superiores, el mucílago en conjunto con las gomas y la pectina son componentes de la fibra soluble en los tallos de los cactus y establecen un sistema coloidal que evita la deshidratación de los tejidos (Rani *et al.*, 1994; Ventura-Aguilar *et al.*, 2017). Bayar *et al.* (2016) demostraron que el 50

% de la composición del mucílago es pectina; sin embargo, el mucílago mostró un 28 % más de capacidad de retención de agua que la pectina. Esto explica que el mucílago retiene más del 30 % del agua total del parénquima de reserva (Ventura-Aguilar *et al.*, 2017). Las micrografías de las Figuras 3 c y f muestran el mucílago con una estructura alargada, que difiere de lo reportado por León-Martínez *et al.* (2010), quien observó células buliformes deshidratadas semiesféricas con una estructura de aglomerado. Estos autores, posiblemente observaron agrupaciones de células de mucílago (idioblastos secretores de mucílago) como resultado de la extracción de mucílago por decocción y agitación. En nuestro caso, la separación mecánica del mucílago a alta velocidad promueve la ruptura de los idioblastos y, en consecuencia, esto permitió la liberación del mucílago desde la célula hacia el exterior, por lo que no se observan estructuras globulares. Con respecto a esto, se ha informado que las centrifugas con discos concéntricos promueven la disrupción de las levaduras y de las células de microalgas para liberar componentes celulares (lípidos) (Chlup *et al.*, 2008; Milledge y Heaven, 2011). Es importante mencionar que se observan cúmulos de partículas en la superficie de las estructuras alargadas del mucílago, las cuales son más evidentes en el mucílago obtenido de cladodios deshidratados. Probablemente, estas partículas correspondan a sales minerales, principalmente CaCO_3 , como ya fue reportado por Rojas-Molina *et al.* (2015).

9.4 Caracterización del mucílago extraído de los cladodios de *O. ficus indica* por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF)

En los espectros de IR-TF del mucílago extraído de cladodios de *O. ficus indica* frescos y secos, se observaron variaciones tanto en las posiciones como en las intensidades de algunas bandas (Figura 4a, b). El proceso de secado produjo un ligero desplazamiento hacia frecuencias más bajas, desde 3294 cm^{-1} en el mucílago extraído de cladodios frescos a 3290 cm^{-1} en el mucílago extraído de cladodios secos (debilitamiento de la fuerza de unión), en la banda correspondiente al grupo OH (ver flechas). Así mismo, se observó una disminución en la intensidad de dicha banda. Esto se puede atribuir a la pérdida de algunos de los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua, la cual es abundante en el material fresco, así como entre los grupos hidroxilo de los carbohidratos y ácidos. Esta misma tendencia se observó para las ν_{as} del grupo CH_2 , disminuyendo de 2920 a 2912 cm^{-1} en el mucílago obtenido a

partir de los cladodios deshidratados. Esta banda se refiere a los grupos de hidroximetileno presentes tanto en las conformaciones de piranosa y furanosa de la galactosa, arabinosa y xilosa, los cuales son los monosacáridos más frecuentes identificados en el mucílago de *Opuntia*. No se observó una variación apreciable en la intensidad de dicha banda (ver flechas). A este respecto, el alto grado de viscosidad del mucílago se ha asociado con su alto contenido de arabinosa (Rodríguez-González *et al.*, 2014).

También se observó una disminución de la frecuencia para el grupo carboxilato (COO^-) cerca de 1600 cm^{-1} , aunque esta banda se fraccionó en una segunda banda más débil a 1513 cm^{-1} (vs COO^-) como resultado de los puentes de H entre los grupos ácidos presentes en el mucílago extraído de los cladodios frescos y el agua, la cual es muy abundante en este vegetal. Es muy probable que estos grupos carboxilato pertenezcan al ácido urónico, el cual se ha identificado de manera frecuente en el mucílago (Monrroy *et al.*, 2017). También se ha establecido que el grupo carboxilato del ácido urónico (sales) puede interactuar con el agua, el calcio y otros iones catiónicos, lo cual contribuye al desarrollo de la viscosidad por parte del mucílago en solución (Rodríguez-González *et al.*, 2014). Así mismo, se detectó la presencia de bandas débiles cerca de 1420 cm^{-1} (superpuesto en mucílago extraído de cladodios frescos y más visible en mucílago extraído de cladodios deshidratados) y a 875 cm^{-1} en ambas muestras de mucílago, lo que indica la presencia de trazas de CO_3 (ver flechas).

Finalmente, también se observó una disminución (de 1034.21 cm^{-1} a 1024.25 cm^{-1}) en la ν de la banda correspondiente al enlace C-O en los monosacáridos del mucílago extraído de los cladodios frescos en comparación con el mucílago extraído de los cladodios deshidratados, como resultado de la pérdida de agua en éstos últimos. Cabe mencionar que el mucílago seco es el material más adecuado para prolongar la vida útil de los productos derivados de las variedades de *Opuntia* antes de ser reconstituidos para consumo humano.

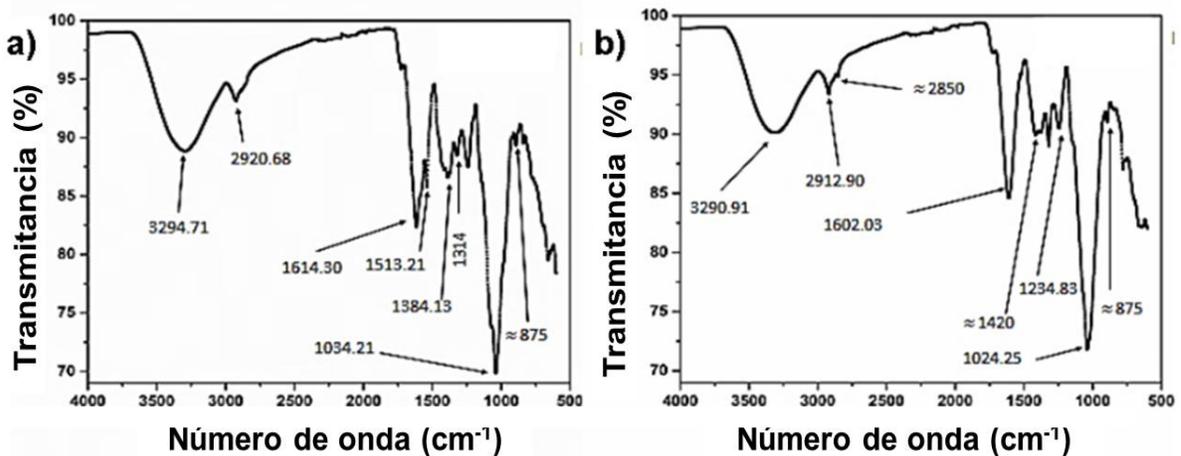


Figura 4. Espectros de infrarrojo con Transformada de Fourier (IR-TF) de mucílagos de *Opuntia ficus indica*. a) Espectro IR-TF del mucílago extraído de cladodios frescos de *Opuntia ficus indica*. b) Espectro IR-TF del mucílago extraído de cladodios deshidratados de *O. ficus indica* (Quintero-García *et al.*, 2021).

9.5 Viscosidad del mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados

Los valores de viscosidad y deformación por cizallamiento *versus* velocidad de cizallamiento de las muestras a diferentes concentraciones de mucílago (% m/v) se observan en la Figura 5. En la Figura 5a es evidente que, al aumentar la velocidad de cizallamiento y la concentración de mucílago, la deformación por cizallamiento también aumenta en el rango de las concentraciones evaluadas. Este parámetro es mayor en el MND con respecto a los valores detectados en el MNF.

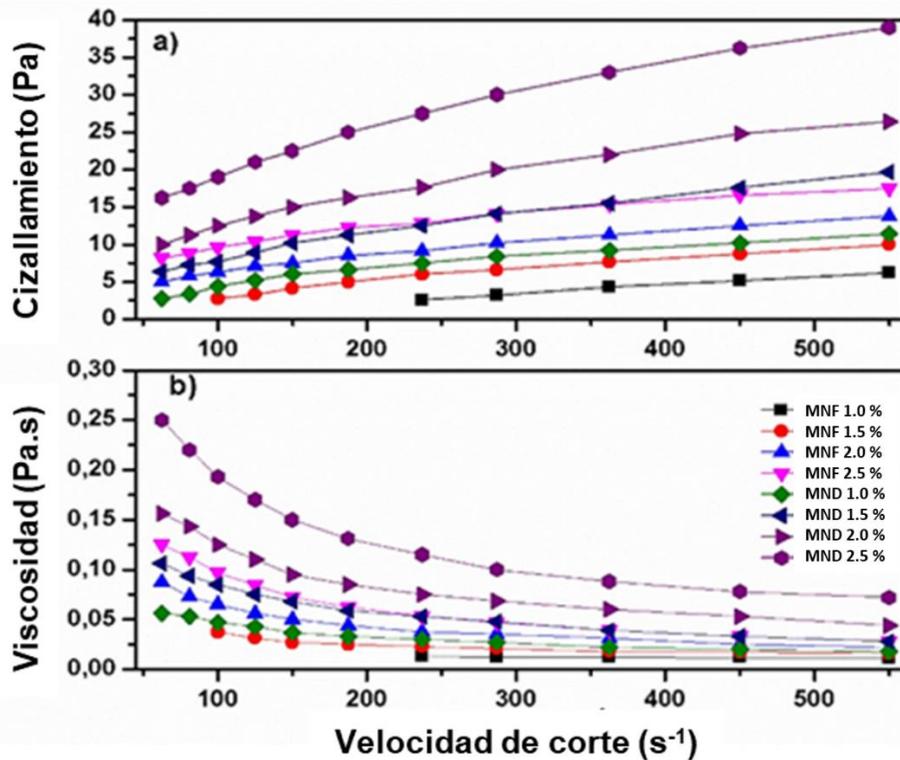


Figura 5. Valores de esfuerzo cortante (a) y viscosidad (b) versus velocidad de corte del mucílago extraído de cladodios frescos (MNF) y el mucílago extraído de cladodios deshidratados (MND) a diferentes concentraciones (1, 1.5, 2 y 2.5 % m/v) (Quintero-García *et al.*, 2021).

El reograma de la Figura 5b muestra que a medida que aumenta la velocidad de corte, la viscosidad de las muestras disminuye. Esto significa que las soluciones del mucílago extraídas de cladodios frescos y deshidratados muestran un comportamiento de fluidos diluyentes por cizallamiento, también denominados fluidos pseudoplásticos (Rao, 2013) en las condiciones de evaluación. La viscosidad de estos fluidos disminuye al aumentar la velocidad de cizallamiento, lo cual es común en soluciones de polímeros y soluciones similares de compuestos de alto peso molecular (Bastian, 2017). El comportamiento pseudoplástico de las disoluciones de mucílagos está respaldado por el índice de comportamiento de flujo ($n < 1$, ver Tabla 2). Esta característica es más pronunciada cuando se incrementa la concentración de mucílago. Estos resultados concuerdan con Medina-Torres *et al.* (2000), León-Martínez *et al.* (2010) y Contreras-Padilla *et al.* (2016).

Tabla 2. Valores de la ley de potencia del mucílago extraído de cladodios de *O. ficus indica* a diferentes concentraciones de mucílago

Tipo de mucílago	Concentración (% m/v)	k	n
MNF	1	0.0635	0.7273
	1.5	0.2517	0.5824
	2	0.8697	0.4335
	2.5	1.6245	0.3828
MND	1	0.3854	0.5414
	1.5	0.8657	0.4927
	2	1.5288	0.4519
	2.5	2.8021	0.4171

MNF = mucílago extraído de cladodios frescos, MND = mucílago extraído de cladodios deshidratados, k = índice de consistencia, n = índice de comportamiento de flujo (Quintero-García *et al.*, 2021).

Cabe destacar que el MND presenta valores de viscosidad más elevados en comparación con el MNF (ver Figura 5b), casi el doble en todas las concentraciones evaluadas, esto se corrobora con los valores del índice de consistencia (k), los cuales resultaron mayores en el MND con respecto a los valores detectados en el MNF (ver Tabla 2). En este punto, es importante mencionar que se observaron diferencias significativas en el contenido de calcio entre el MND y el MNF (ver Tabla 1). Se ha reportado que la presencia de iones Ca^{2+} provoca un aumento en la viscosidad de un polisacárido extraído de la matriz de la pared celular de frutos como la manzana. Asimismo, se ha observado que un aumento de la viscosidad va acompañado de un incremento en la concentración de los iones de Ca^{2+} (Mierczyńska *et al.*, 2015).

Las diferencias en los valores de viscosidad entre el MNF y el MND implican que la aplicación de este hidrocoloide puede variar dependiendo de las propiedades texturales que se desean en los productos finales. Por ejemplo, el MNF puede usarse en productos donde se necesita una viscosidad moderada o baja para sustituir lácteos o grasas (postres congelados) y para la elaboración de recubrimientos y películas comestibles en productos mínimamente procesados (Toit *et al.*, 2020; Zambrano-

Zaragoza *et al.*, 2014). Por el contrario, el MND puede ser útil para mejorar las características de textura de los productos y reemplazar el huevo y las grasas (aderezos) (Toit *et al.*, 2020).

9.6 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) es un método simple y preciso para medir el cambio de peso de una muestra en función de un perfil de temperatura. Esta técnica es útil para determinar la descomposición, oxidación o pérdida de disolvente o agua de la muestra (Zohuriaan y Shokrolahi, 2004). La Figura 6 muestra los termogramas de mucílago extraídos de cladodios frescos (Figura 6a) y deshidratados (Figura 6b). La Tabla 3 proporciona los detalles del comportamiento térmico de acuerdo con los termogramas primarios y los termogramas derivados de las muestras. La pérdida de peso inicial en el MNF se puede atribuir a la eliminación de moléculas de agua libre (agua adsorbida) y de moléculas de agua unidas a los polisacáridos presentes en el mucílago (Zohuriaan y Shokrolahi, 2004; Archaana *et al.*, 2013; Singh y Bothara, 2014).

Dado que esta primera pérdida de peso en la MNF cubre un amplio rango de temperaturas (ver Tabla 3), algunos autores mencionan que esta reducción de peso también se asocia con la pérdida de componentes de bajo peso molecular como lípidos, clorofila, componentes fenólicos entre otros presentes en *O. ficus indica* (Manals-Cutiño *et al.*, 2011; Ventura-Aguilar *et al.*, 2017; Andreu *et al.*, 2018; Madera-Santana *et al.*, 2018; Cruz-Rubio *et al.*, 2020). Por el contrario, este evento no se observó en el MND (Figura 6b ver flecha). Probablemente, la mayor parte del agua adsorbida y los compuestos volátiles fueron eliminados durante el proceso de secado del cladodio previo a la extracción del mucílago, por lo que no se detectó la eliminación de estos componentes.

La primera pérdida de peso en el MND se observó en un rango de temperatura de 125 a 200 °C con dos picos máximos de temperatura (ver Figura 6 y Tabla 3). En este contexto, se ha informado que la pérdida de peso entre 100-200 °C puede deberse a la pérdida de las moléculas de agua coordinadas y unidas a través de puentes de hidrógeno a compuestos minerales que contienen calcio, lo que finalmente daría como

resultado la estructura 'colapsada' de dichos compuestos minerales (Bala *et al.*, 2000). Probablemente, estos picos pertenecen a la pérdida de agua en los compuestos de calcio (CaCO_3 , $\text{K}_2\text{Ca}(\text{CO}_3)_2$) identificados en el mucílago de *O. ficus indica* (Rojas-Molina *et al.*, 2015; Contreras-Padilla *et al.*, 2016).

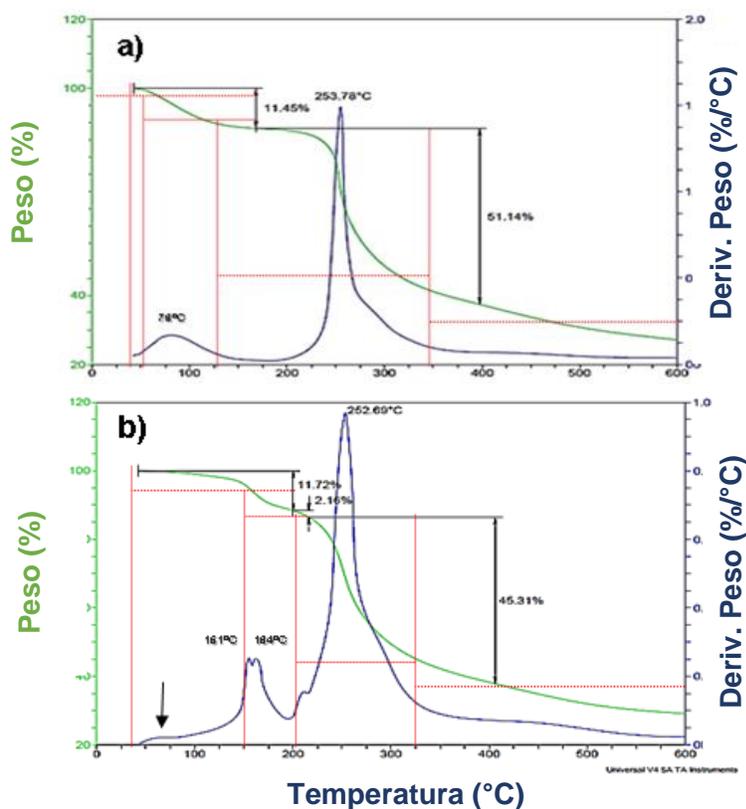


Figura 6. Curva termogravimétrica y curva de la primera derivada del termograma del mucílago fresco y deshidratado. (a) mucílago extraído de cladodios de *O. ficus indica* frescos y (b) mucílago extraído de cladodios de *O. ficus indica* deshidratados. La flecha indica la ausencia de pérdida de peso a un rango de temperatura de 70 °C (Quintero-García *et al.*, 2021).

El segundo evento exhibió la mayor pérdida de masa en el MNF y el MND (51.14 y 45.31 %, respectivamente) en picos de temperatura similares (ver Tabla 3). Este dato es comparable con la estabilidad térmica observada en el mucílago extraído de semillas de *Hollyhocks* (*Opuntia spinulifera*) y goma modificada de *Dalbergia* reportadas por otros autores (Munir *et al.*, 2016; Madera-Santana *et al.*, 2018; Nowrouzi *et al.*, 2020). Este evento se atribuye al inicio de la degradación térmica de los biopolímeros, como, por ejemplo, la ruptura de polisacáridos ramificados y la descomposición de pectinas (Archaana *et al.*, 2013; Madera-Santana *et al.*, 2018). La

masa residual a 600 °C, que es mayor en MND en comparación con MNF (ver Figura 6), se ha asociado al contenido de compuestos inorgánicos en el mucílago cuantificado como cenizas (ver Tabla 1) (Madera-Santana *et al.*, 2018). Es importante mencionar que el inicio de la pérdida de peso en las muestras sugiere que tanto el MNF como el MND tienen una buena estabilidad térmica. Esto significa que ambos mucílagos se pueden utilizar en productos que requieren temperaturas de esterilización (Berovič, 2011).

Tabla 3. Datos termogravimétricos (TGA y DSC) del mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados

Tipo de mucílago	No. de etapa de descomposición	Rango de Temperatura °C	DTG max. °C	Peso perdido %
MNF	1	45-125	76	11.45
	2	200-350	254	51.14
MND	1	125-200	151 and 164	11.42
	2	210-325	252	45.31

MNF = mucílago extraído de cladodios frescos, MND = mucílago extraído de cladodios deshidratados (Quintero-García *et al.*, 2021).

9.7 Análisis de perfil de textura del mucílago extraído de los cladodios de *O. ficus indica*

El análisis del perfil de textura (TPA) es una técnica que se ha utilizado ampliamente para determinar las propiedades texturales de los alimentos, aunque también se utiliza en las industrias cosmética y farmacéutica. Durante una prueba de TPA, las muestras se comprimen dos veces utilizando un analizador de textura para proporcionar información sobre cómo se comportan las muestras cuando se mastican (Tai *et al.*, 2014).

Los parámetros (atributos) que pueden derivarse del TPA son dureza (fuerza requerida para una deformación predeterminada), cohesión (fuerza de las uniones internas en la muestra), elasticidad (originalmente llamada resiliencia que es la velocidad a la que la muestra deformada vuelve a su condición no deformada después de la eliminación de la fuerza deformante), adhesividad (trabajo requerido para superar las fuerzas de atracción entre la superficie de la muestra y la superficie de la

sonda con la que la muestra entra en contacto), compresibilidad (la fuerza por unidad de tiempo requerida para deformar el producto durante el primer ciclo de compresión de la sonda), entre otros (Nishinari *et al.*, 2013). Como resultado del TPA, las condiciones en las que se realizan los ensayos afectan los resultados de la prueba, además de que los parámetros medidos y calculados tienen escasa relación con las mismas propiedades en la Ciencia de los Materiales y otras disciplinas. Por esta razón, los parámetros del TPA son actualmente objeto de estudio (Pelleg, 2019).

Con el fin de estudiar de forma preliminar las posibles aplicaciones del mucílago de *O. ficus indica* como aditivo, se realizó TPA. El perfil de textura de cohesividad, adhesividad y elasticidad de las muestras se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de textura instrumental en mucílagos extraídos de cladodios de *Opuntia ficus indica* frescos y deshidratados.

Tipo de mucílago	Cohesión (Kg/cm ²)	Adhesividad (J x 10 ⁻³)	Elasticidad (m)
MND	0.72 ± 0.01 ^a	3.21 ± 0.01 ^a	0.63 ± 0.01 ^a
MNF	0.97 ± 0.01 ^b	5.95 ± 0.01 ^b	1.13 ± 0.06 ^b

Los valores representan la media ± desviación estándar (DE), n = 5. Las medias en columnas con letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$). MNF = mucílago extraído de cladodios frescos, MND = mucílago extraído de cladodios deshidratados (Quintero-García *et al.*, 2021).

Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los valores de cohesividad, adhesividad y elasticidad en las muestras. Esto significa que el proceso de deshidratación de los cladodios previo a la extracción del mucílago afectó los parámetros de TPA evaluados reduciendo su magnitud. De acuerdo con el enfoque de ingeniería para el procesamiento de alimentos, los atributos de textura son el resultado de la estructura y la composición que se obtienen al someter los ingredientes a una secuencia de operaciones, que comprenden un proceso alimentario dado (Di Monaco *et al.*, 2008) específicamente, la cohesión entre dos partículas y la adhesión entre dos superficies sin puentes de hidrógeno del material, lo cual se puede atribuir principalmente a las interacciones de Van der Waals y las fuerzas electrostáticas

(Adhikari *et al.*, 2001). Desde este punto de vista, la disminución de la cohesión y adhesividad en el MND en comparación con el MNF se puede explicar a la pérdida de las interacciones a través de los puentes de hidrógeno por eliminación de agua en el MND, así como a los enlaces a través de puentes de hidrógeno entre los carbohidratos y los grupos ácidos (ácido urónico) presentes en el mucílago, que se detectó a través de una disminución en la frecuencia en las bandas correspondientes al grupo OH⁻ y el grupo carboxilato (COO⁻) (ver Figura 4). En una reducción de las frecuencias de la banda ancha característica de la vibración de estiramiento del grupo OH y una disminución de $\nu_{\text{C=O}}$ para el grupo carboxilato (COO⁻) (ver Figura 4). Probablemente, la pérdida de enlaces de hidrógeno favoreció la interacción del grupo carboxilato del ácido urónico con el calcio y otros iones catiónicos, aumentando de esa forma la viscosidad en el MND (ver Figura 4).

9.8 Determinación de color

Los parámetros de color (L*, a* y b*) del mucílago extraído de cladodios de *O. ficus indica* frescos y deshidratados se muestran en la Tabla 5. Se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros entre ambos mucílagos. El MNF presentó un color más claro (verde) a diferencia del MND (verde con tonos marrones). El $\Delta E = 8.33$ indica la diferencia de color entre las muestras de mucílago, esta diferencia tiene implicaciones para sus posibles aplicaciones.

Tabla 5. Parámetros de color de mucílago extraído de cladodios frescos y deshidratados de *O. ficus indica*.

Tipo de Mucílago	L*	a*	b*
MNF	90.34 ± 0.23 ^a	+18.31 ± 0.15 ^a	+22.29 ± 0.10 ^a
MND	84.58 ± 0.16 ^b	+21.21 ± 0.11 ^b	+27.57 ± 0.10 ^b

Los valores representan la media ± desviación estándar (DE), n = 5. Las medias en columnas con letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$). MNF = mucílago extraído de cladodios frescos, MND = mucílago extraído de cladodios deshidratados (Quintero-García *et al.*, 2021).

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 5, el mucílago extraído tanto de cladodios frescos como deshidratados se proponen para el desarrollo de cápsulas

blandas (softgels), para lo cual se acepta un valor de $L^* = 87.73$ para la manufactura de cápsulas como estándar de control de calidad (Camelo *et al.*, 2019). Sin embargo, el MNF (color más claro) es más adecuado para la formulación de películas comestibles, donde se requiere que el recubrimiento presente una capacidad elevada para la transmisión de la luz y por lo tanto, dicha película sea transparente (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2014; González *et al.*, 2019). Por el contrario, el MND podría utilizarse como agente encapsulante para preservar la estabilidad de compuestos bioactivos y aditivos alimentarios, así como para mejorar las propiedades texturales y funcionales de los alimentos, donde el color no es un atributo crítico en los productos finales (Liguori *et al.*, 2020).

Además, el proceso de secado indujo una disminución en la coordenada L^* con un aumento en las coordenadas a^* y b^* para la muestra MND en comparación con los valores para el MNF. Las modificaciones de color y la pérdida visual del color verde en el MNF pueden atribuirse a la conversión de clorofilas en feofitinas (feofitinización), esto como resultado del calentamiento y la disminución del pH durante el procesamiento (Steet y Tong, 1996). En esta reacción, la clorofila se convierte en feofitina por la pérdida del ion de magnesio, que se encuentra en el centro del anillo de porfirina, y es reemplazado por dos iones de hidrógeno. En consecuencia, el color verde brillante de la clorofila adquiere tonalidades olivo-marrón, lo cual influye en el hecho de que el consumidor perciba esta característica como un defecto en el producto (Yilmaz *et al.*, 2016). Los cambios en la concentración de clorofila están relacionados linealmente con el valor a^* , por esta razón, dicho parámetro se utiliza como indicador de calidad de las verduras procesadas térmicamente (Steet y Tong, 1996).

9.9 Potencial Z y punto isoeléctrico del lactosuero

Para la determinación del potencial Z y el punto isoeléctrico del lactosuero se preparó una solución al 1 % (m/m) a diferentes valores de pH (2.0, 3.0, 4.0 y 5.0), siguiendo el procedimiento establecido por Cornejo-García *et al.* (2018). Los resultados se muestran en la Figura 7. El punto isoeléctrico obtenido en este estudio fue a un pH de 4.48, en donde mostró un valor de potencial Z de 0 mV, este resultado es cercano a lo reportado por Callejas *et al.* (2012) donde el pH reportado fue de 4.67.

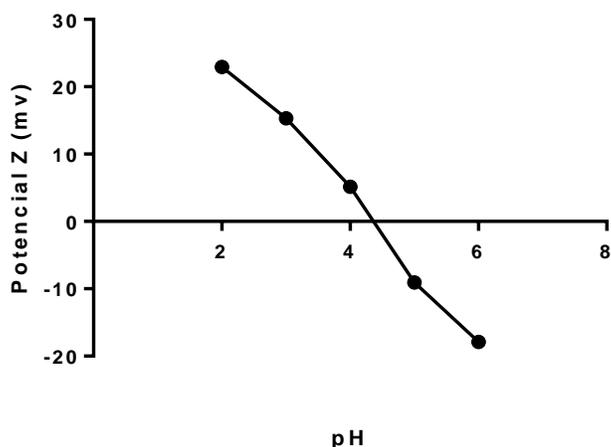


Figura 7. Potencial Z de lactosuero a diferentes valores de pH

El lactosuero está compuesto de proteínas principalmente por beta-lactoglobulina y alfa-lactoalbúmina, proteínas en donde se ha reportado un punto isoeléctrico de 4.7 y 4.2, respectivamente (Engelhardt *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que a un pH por debajo del punto isoeléctrico de estas proteínas la densidad de la carga proviene exclusivamente de los grupos aminos y al aumentar el pH, disminuye dicha carga positiva y los grupos carboxílicos se cargan negativamente (Ravindran *et al.*, 2017). Por lo anterior, en el caso del lactosuero (L) en estudio, para asegurar su carga positiva en dispersión coloidal, es adecuado un valor de pH = 2 con un valor de potencial Z de $+22.93 \pm 0.07$ mV. El uso de las proteínas del lactosuero ha tenido diversas aplicaciones, ya sea para la encapsulación como la vitamina B9 a través de la coacervación compleja para mejorar su biodisponibilidad (Chapeau *et al.*, 2017), así como el aprovechamiento de sus cargas para formar interacciones electrostáticas con polisacáridos provenientes de mucílagos del membrillo (*Cydonia oblonga*) (Ghadermazi *et al.*, 2019), goma de acacia (Ach *et al.*, 2015) y pectina (Raei *et al.*, 2018) para la encapsulación de compuestos bioactivos.

9.10 Potencial Z de *O. ficus indica*

Se utilizó el mucílago deshidratado de *O. ficus indica* para preparar una solución a una concentración de 0.0625 % (m/m) a diferentes valores de pH (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0). Los resultados se muestran en la Figura 8. El mucílago del *O. ficus indica* es un heteropolisacárido compuesto por cadenas de ácido galacturónico, el cual, a

partir de un pH de 2.0 los grupos carboxílicos pertenecientes a este ácido se ionizan (Quinizio *et al.*, 2017), es por esto que se observan valores negativos en todos los diferentes valores de pH experimentales, además de presentar cargas gradualmente negativas cuando se encuentran por encima de un pH de 2.0, particularmente registrado en este estudio, un valor de potencial Z a partir de -2.31 ± 1.03 mV.

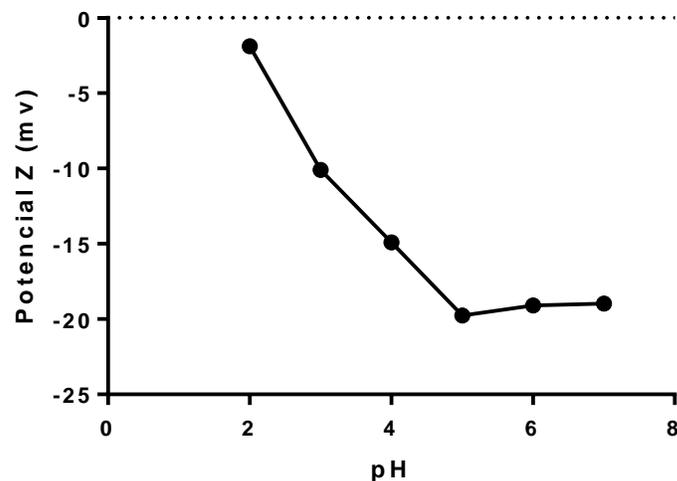


Figura 8. Potencial Z del mucílago *O.ficus indica* a diferentes valores de pH

A un pH básico, estos grupos carboxilo se ionizan para dar lugar a carboxilatos, lo que aumenta la carga negativa del potencial Z (Cortés-Camargo *et al.*, 2017). De manera semejante, se han reportado valores negativos en el potencial Z de varios biopolímeros en un intervalo de pH de 2.0 a 9.0, por ejemplo pectina (-15 mV a +25 mV) (Faria *et al.*, 2017), alginato de sodio (-8.7 mV a -68.4 mV) (Harnsilawat *et al.*, 2006), goma arábiga (-2 mV a -21 mV), pectina de remolacha (-2.5 mV a -33 mV) y goma de fibra de maíz (-3 mV a -19 mV) (Bai *et al.*, 2017).

9.11 Tamaño de partícula y estabilidad coloidal del lactosuero y del mucílago extraído de *O. ficus indica*

Se realizó un monitoreo del tamaño de partícula de los dos biopolímeros en estudio a través del tiempo (24, 48 y 72 h) para comprobar la existencia del estado coloidal, así como determinar su estabilidad. Los resultados del tamaño de partícula se muestran en la Figura 9. El tamaño promedio obtenido del lactosuero fue de 24.38 ± 1.21 μm . Estos resultados se encuentran cercanos a lo reportado para el lactosuero por Callejas *et al* (2016) y Ramírez *et al* (2018), con valores de 26.14 μm y 20.1 μm ,

respectivamente. Para el caso del mucílago, se obtuvo un valor promedio de $77.01 \pm 0.22 \mu\text{m}$. Este tamaño de partícula en las dispersiones de mucílago es similar en al tamaño de partícula observado en otros polímeros aniónicos en dispersión coloidal como la goma arábiga (37 a $790 \mu\text{m}$) (Rosland *et al.*, 2020), la pectina de yaca ($363.6 \mu\text{m}$) (Begum *et al.*, 2017) y la goma guar ($46.4 - 315 \mu\text{m}$) (Acartürk y Armagan, 2009).

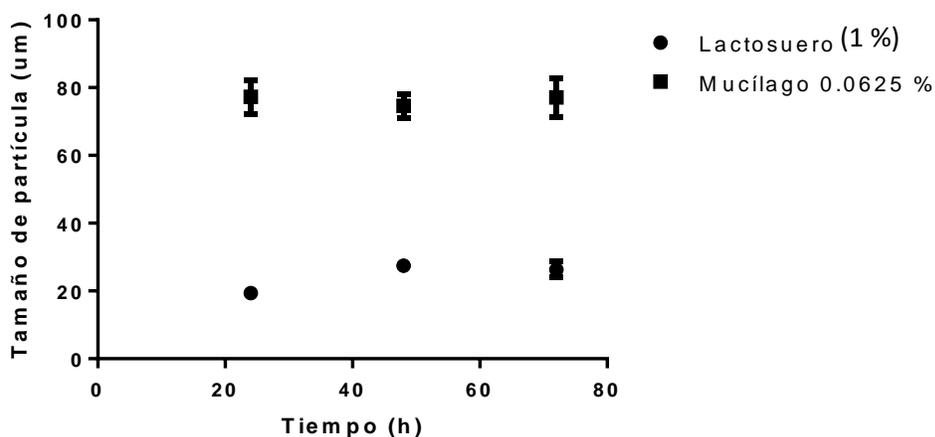


Figura 9. Tamaño de partícula de lactosuero y mucílago a tiempos de 24, 48 y 72 horas.

Como se puede observar en la Figura 9, no hubo variación en los tamaños de partícula en el intervalo de tiempo evaluado, por lo que se considera que las dispersiones de los biopolímeros son estables en condiciones de almacenamiento a una temperatura de $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta temperatura evita el proceso de fermentación de diversos microorganismos fermentativos de azúcares (*B. bruxellensis* y *B. clausenii*) que pueden modificar el pH de biopolímeros que contienen alto contenido de carbohidratos (lactosa, arabinosa, glucosa, entre otros y dar como resultado productos orgánicos como ácido láctico y ácido acético, lo cual se ha demostrado a partir de temperaturas de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en adelante (Marcus *et al.*, 2021; Rodríguez-González *et al.*, 2014).

9.12 Desarrollo de las suspensiones coloidales (coacervados)

Se prepararon diluciones madre de lactosuero y mucílago a una concentración del 1 % y 0.0625 % (m/m), respectivamente. A partir de estas dispersiones coloidales, se hicieron mezclas para realizar la coacervación compleja de los biopolímeros a una

relación de mucílago con lactosuero de 1:2 (v/v) a valores de pH de: 2.0, 4.0 y 5.0. El ajuste de pH se realizó después de haber obtenido la mezcla utilizando HCl al 0.1 N y NaOH a la misma concentración. Para verificar la interacción electrostática de los biopolímeros se llevó a cabo su observación con la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB). Los resultados se muestran en el siguiente apartado.

9.13 Morfología de las suspensiones coloidales (coacervados)

Para evaluar el efecto que tuvo el pH sobre la interacción electrostática requerida para la coacervación y formación de microesferas con los biopolímeros, se observó por MEB la suspensión coloidal de las muestras obtenidas después del proceso de coacervación a los valores de pH (2.0, 4.0 y 5.0). Los resultados se muestran en la Figura 10.

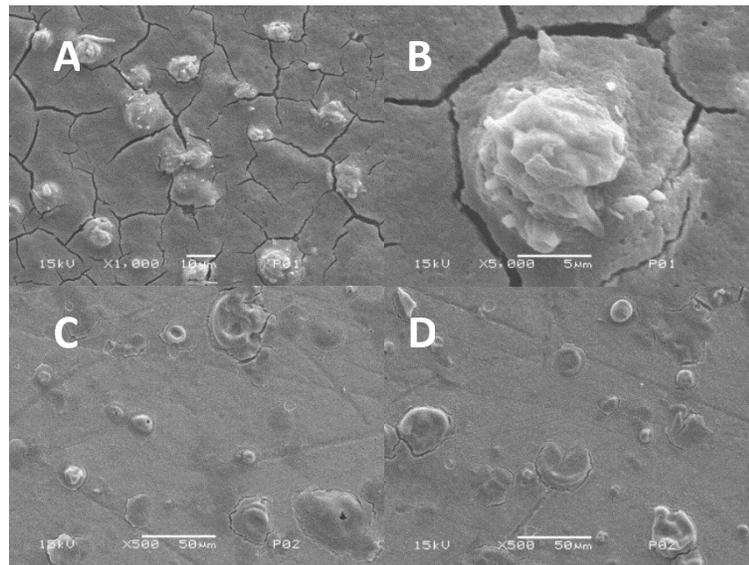


Figura 10. Micrografías representativas de las suspensiones coloidales elaboradas con una misma proporción de mucílago(M)-lactosuero(L), obtenidos a diferentes valores de pH: A) y B) M:L a pH 2.0, con amplificación a 1,000X y 5,000X, respectivamente; C) M:L pH a 4.0, amplificación a 500X; y D) M:L pH a 5.0, con amplificación a 500X.

En las Figuras 10 A y B se observan microesferas con un tamaño aproximado de 5 μm , a diferencia de las muestras a pH de 4.0 y 5.0, en las que no se observaron formación de microesferas. Esto se debe al efecto del pH, en donde las suspensiones coloidales que se encuentran con pH cercano y/o superior al punto isoeléctrico de la proteína proveniente del lactosuero, no logran establecer una carga lo suficientemente protónica de los grupos aminos (NH_3^+) para la interacción con los grupos carboxílicos

(COO⁻) pertenecientes al mucílago, fenómeno conocido como co-solubilidad, en donde no existe una separación de fases (Ye, 2008). Aunado a esto, habrá formaciones débiles (detención cinética) entre las cargas catiónicas y aniónicas de los dos biopolímeros, fenómeno conocido también como complejo de polielectrolito, en donde los sistemas implicados no están en total equilibrio (Sing, 2016), dando como resultado estructuras parcialmente esféricas (planas) y/o de formación incompleta como se muestra en las Figuras 10 C y D.

En otros estudios se ha evaluado la optimización de interacciones electrostáticas en proteínas-polisacáridos para el desarrollo de microesferas como lo reporta González-Martínez *et al.* (2017), quienes utilizaron proteínas de lactosuero y mucílago extraído de la semilla del tamarindo (*Tamarindus indica* L.) a pH de 3.68 con relación proteína-polisacárido de 1:0.3 (v/v). De la misma manera, se han logrado obtener microesferas a partir de proteínas de lactosuero y goma arábica a pH 3.8 con relación 2:1 (v/v) proteína-polisacárido (Sánchez *et al.*, 2006). El desarrollo de estas microesferas se ha logrado cuando los grupos aminos provenientes de la proteína, se logran ionizar a un pH abajo del punto isoeléctrico e interactúan con un polímero cargado negativamente.

Por lo antes expuesto, generalmente ocurre la formación de complejos electrostáticos entre las proteínas y polisacáridos en un intervalo de pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína y/o con un valor alto de pH de 4.0 hasta 7.4 del pK_a de los grupos aniónicos del polisacárido, principalmente los grupos carboxílicos del ácido galacturónico (pK_a 2.9 a 3.3) (Ye, 2008; Wagoner *et al.*, 2016).

A fin de confirmar el desarrollo de las microesferas al estado coloidal, se realizó el análisis del potencial Z y tamaño de partícula de los coacervados lactosuero-mucílago.

9.14 Potencial Z y tamaño de partícula de las suspensiones coloidales (coacervados)

Se determinó el potencial Z de las suspensiones coloidales a un pH de 2.0, 4.0 y 5.0. Los resultados se muestran en la Figura 11.

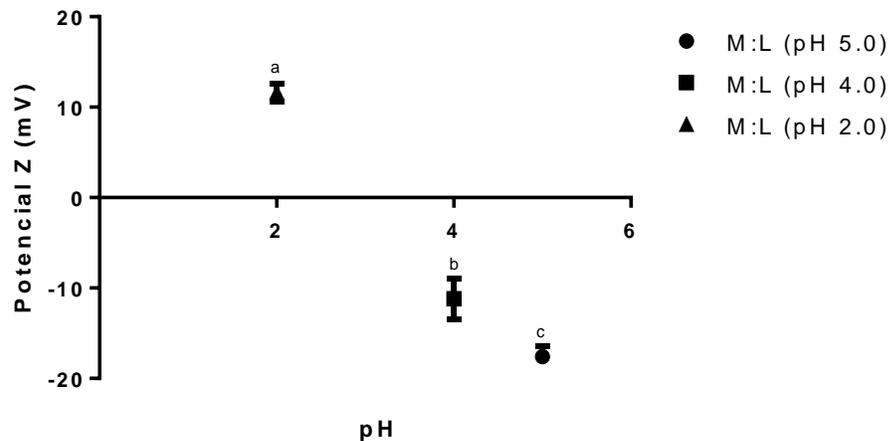


Figura 11. Valores de potencial Z de las suspensiones coloidales (coacervados) de mucílago-lactosuero (M:L) en relación 1:2 a diferentes valores de pH. Se muestra la media \pm desviación estándar (DE), $n = 3$. Las medias con letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Como se puede apreciar, en las suspensiones coloidales M:L (1:2) a un pH de 2.0 se registra un potencial Z de $+11.63 \pm 1.06$ mV, a pH de 4.0 el resultado fue de -11.16 ± 2.25 mV y finalmente, a pH de 5.0 un potencial Z de -17.56 ± 1.72 mV, con una diferencia estadística en todas las muestras de $p \leq 0.05$. Cabe destacar que a un pH de 2.0 se obtiene un valor positivo de este parámetro, lo que significa que existe una ionización suficiente de grupos funcionales (NH_3^+) del lactosuero, favoreciendo un incremento de la carga eléctrica en la molécula para interactuar con la densidad aniónica que se encuentra en los grupos provenientes del polisacárido, siendo así posible obtener un complejo electrostático: la matriz esférica resultante de la coacervación (Ye, 2008), es decir, el coacervado.

A diferencia de lo observado a pH 2.0, con las suspensiones coloidales M:L (1:2, v/v) a pH de 4.0 y 5.0 se obtiene un potencial Z negativo, esto representa una mayor carga de los grupos aniónicos del mucílago relacionado a su pK_a (2.9 a 3.3), infiriéndose

que se sobrepasó la densidad de carga negativa; ocurriendo también que a estos valores de pH las moléculas de proteína se encuentran por encima del PI del lactosuero y por ello su densidad de carga también tiende a ser negativa (Wagoner *et al.*, 2016).

Por otro lado, los resultados para la evaluación del tamaño de partícula de las suspensiones coloidales M:L (1:2) a diferentes condiciones de pH (2.0, 4.0 y 5.0) y que se muestran en la Figura A 12, corroboran lo anterior. Se observa así que ocurre una reducción en el tamaño de las partículas coloidales existentes en el sistema en dispersión al disminuir su tamaño como consecuencia de la interacción electrostática (coacervación M:L) a medida que disminuye el pH del medio.

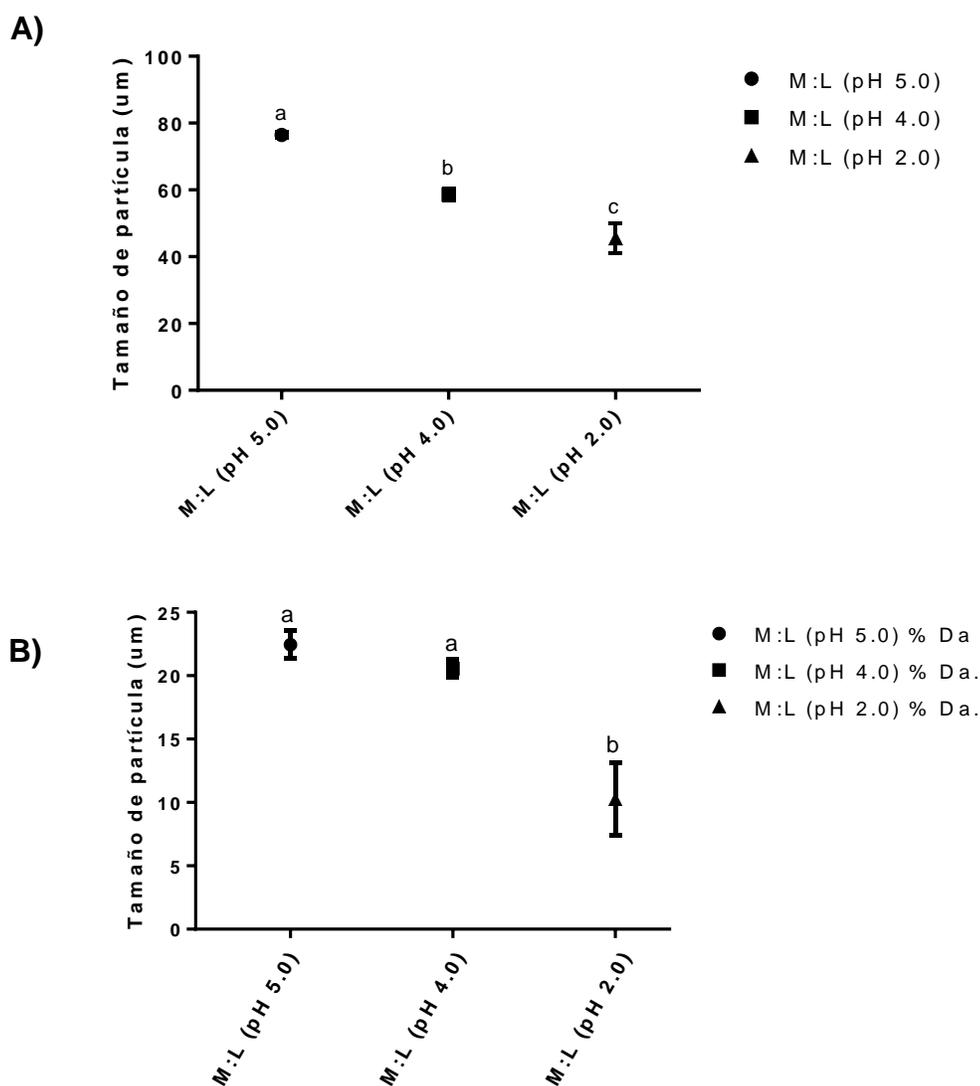


Figura 12. A) Tamaño de partícula de las suspensiones coloidales (coacervados) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a diferentes valores de pH. B) Porcentaje de diámetro acumulativo de tamaño de partícula del 10 % por debajo de la media de las suspensiones coloidales (coacervados) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a diferentes valores de pH. Los valores representan la media \pm desviación estándar (DE), $n = 3$. Las medias con letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$).

Las suspensiones coloidales M:L (1:2) presentaron los siguientes datos de tamaño de partícula: a pH de 5.0 se registraron valores promedio de tamaño de partícula de $77.13 \pm 0.26 \mu\text{m}$, a pH de 4.0 se obtuvieron valores de $60.93 \pm 0.31 \mu\text{m}$ y finalmente, a pH de 2.0 se observaron valores de $42.85 \pm 1.04 \mu\text{m}$, con una diferencia estadística ($p \leq 0.05$) en todas las muestras.

Como se puede observar en estos resultados, a condiciones de pH de 5.0 se obtienen valores semejantes al tamaño de partícula del mucílago del *Opuntia ficus indica* cuando es el componente único de la dispersión ($77.01 \pm 0.22 \mu\text{m}$), lo que implica que probablemente existió una separación completa de fases (incompatibilidad de cargas), ya que también se observó que en esta muestra el 10 % de diámetro acumulativo (porcentaje que se encuentra por debajo de la media) (ver Figura 12 B) presentó un tamaño de partícula de $22.86 \pm 2.0 \mu\text{m}$. Este porcentaje, probablemente corresponde al dato obtenido anteriormente para el lactosuero ($24.38 \pm 1.21 \mu\text{m}$).

Con la suspensión coloidal a pH 4.0, se logró una ligera disminución del tamaño de partícula ($60.93 \pm 0.31 \mu\text{m}$), con un 10 % de diámetro acumulativo de partículas de $20.63 \pm 1.94 \mu\text{m}$ (ver Figura 12 B). Estos datos para un pH de 5.0 y de 4.0, se pueden también relacionar con el fenómeno de co-solubilidad, en donde se forman parcialmente complejos, es decir, interacciones de cargas poli-aniónicas, que en su totalidad corresponden a las cadenas estructurales solvatadas del mucílago, así como a los tamaños moleculares de las proteínas provenientes del lactosuero, dando como resultado una nula formación de microesferas, ya que este particularmente el valor de pH de 4.0 es muy cercano al PI de la proteína (4.2).

Acorde con la ecuación de Henderson-Hasselbach, si un grupo ácido o básico interactúa con cargas por debajo o superiores a su pK_a , existe una menor o mayor

ionización en los grupos anfotéricos que conforman a la molécula respectivamente (Lunkad *et al.*, 2021). Con estos datos se confirma que no hubo una interacción electrostática entre los dos biopolímeros debido a la carga ejercida relacionada con el pH que se encuentra por encima del pKa de los grupos aniónicos del polisacárido y/o cercana al PI de las proteínas. Sin embargo, en la suspensión coloidal M:L (1:2) a un pH de 2.0, se logra una disminución significativa en el tamaño de partícula ($42.85 \pm 1.04 \mu\text{m}$).

En apoyo al análisis anterior, al presentar el sistema coloidal M:L-1:2 a pH de 2.0, a un 10 % de diámetro acumulativo un tamaño de $10.12 \pm 4.26 \mu\text{m}$ (ver Figura 12 B), esto parece significar que se obtuvo una reducción importante del tamaño de partícula, confirmando de esta manera la formación de las microsferas. Por otra parte, la teoría de Voorn y Overbeek ratifica este resultado, lo cual se interpreta como el desarrollo de la coacervación compleja en términos de una menor entropía del sistema generado por la interacción de las cargas iónicas de los biopolímeros presentes. De esta forma, las macromoléculas cargadas se mueven libremente otorgando una configuración de espiral aleatoria permitiendo lograr arreglos iónicos entre las macromoléculas formando esferas (Burgees, 1994).

Cabe mencionar así mismo que, de los resultados derivados de este ensayo de tamaño de partícula para la suspensión coloidal M:L (1:2) a pH de 2.0, se observó en una misma muestra dos poblaciones con un tamaño de partícula significativamente reducido. Para comprender mejor este fenómeno, se procedió a la sonicación del lactosuero previo a su coacervación, con el propósito de disminuir su tamaño coloidal, y así mejorar la interacción electrostática de los biopolímeros (mucílago-lactosuero), y conseguir desarrollar un sistema coloidal con un tamaño de partícula más homogéneo, ya sea en la escala de nanómetros o de micrómetros (Xue *et al.*, 2016). De tal forma, se procedió a centrifugar la suspensión coloidal con el propósito de observar si ocurría la formación de sedimento y sobrenadante y, en su caso, analizarlos en tamaño de partícula.

Una vez realizada la centrifugación de la suspensión coloidal de coacervado que utilizó lactosuero previamente sonificado, se llevó a cabo la determinación del tamaño de partícula de sedimento y de sobrenadante, así como de la suspensión coloidal M:L

(1:2) pH 2.0. Los resultados de tamaño promedio de partícula en nanómetros, junto con su escala de dispersión, se muestran en la Figura 13.

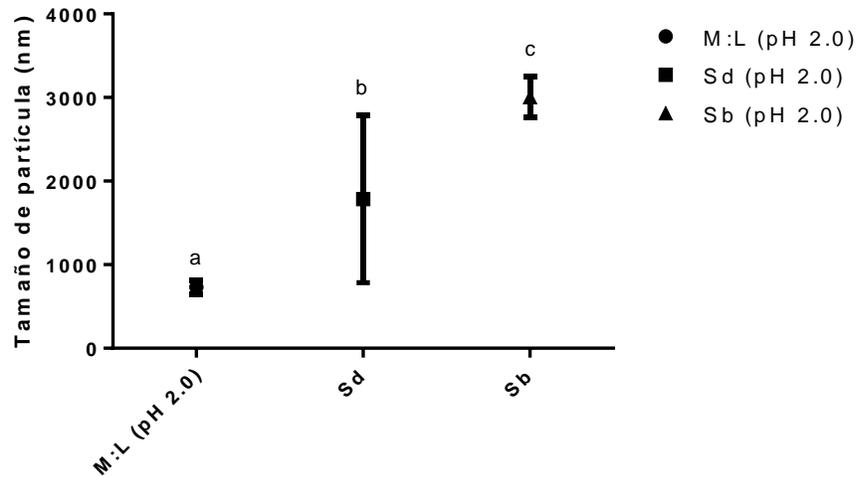


Figura 13. Tamaño de partícula de la suspensión coloidal (coacervado) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a un pH de 2.0, del sobrenadante y sedimento derivados de M:L (pH 2.0). Los valores representan la media \pm desviación estándar (DE), $n = 3$. Las medias con letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$). Sd: Sedimento. Sb: Sobrenadante.

Los valores registrados para el tamaño de partícula en todas las muestras (M:L, pH 2.0, Sd y Sb) obtenidas a pH de 2.0 como se muestra en la figura 13, mostraron diferencia estadística significativa entre ellas ($p \leq 0.05$). Es importante destacar que el tamaño obtenido en cada uno de los sistemas al haber aplicado la sonicación, fue a una escala nanométrica, presentando los siguientes valores: coacervado M:L a pH de 2.0 (730.4 ± 84.76 nm), Sd (1786.66 ± 1000.32 nm) y Sb (3004.33 ± 243.95 nm). Estos resultados indican que, con el tratamiento previo de ultrasonido en la suspensión de lactosuero al 1 %, se logra reducir y homogenizar el tamaño de partícula esférica de la suspensión coloidal M:L (1:2) de pH 2.0.

Los resultados mostrados en la figura 13 indican de igual forma que la centrifugación aplicada a la suspensión coloidal M:L (1:2) de pH 2.0, produce también un efecto de separación de componentes coloidales que originan flóculos con distinto nivel de agregación y en consecuencia, de tamaño y de densidad; lo que explica tanto la existencia de un Sd como de un Sb. En resumen, el ultrasonido aplicado a las

proteínas contenidas en el lactosuero provoca un cambio en las fuerzas hidrodinámicas moleculares, que se relacionan con la cavitación ultrasónica, modificando interacciones covalentes y no covalentes, reduciendo con esto el tamaño de partícula (Xue *et al.*, 2016).

Por otra parte, a dichos sistemas (M:L, Sd y Sb; a PH 2.0) que utilizaron lactosuero previamente sonificado, se les evaluó su potencial Z. Los resultados se muestran en la Figura 14.

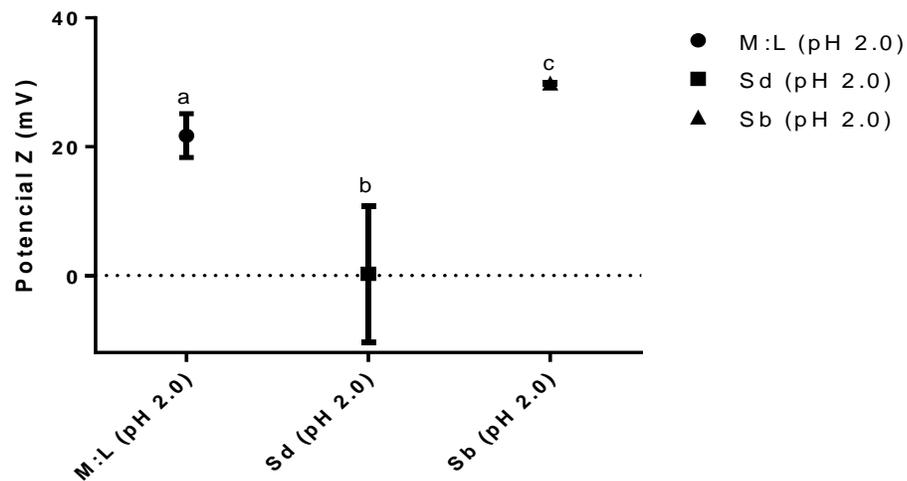


Figura 14. Potencial Z (pZ) de la suspensión coloidal (coacervado) con relación 1:2 mucílago-lactosuero (M:L) a un pH de 2.0, del sobrenadante y sedimento derivados de M:L (pH 2.0). Los valores representan la media \pm desviación estándar (DE), $n = 3$. Las medias con letras diferentes difieren significativamente ($p \leq 0.05$). Sd: Sedimento. Sb: Sobrenadante.

Los registros de valores para el parámetro de potencial Z fueron: M:L (1:2) ($+21.7 \pm 3.40$ mV), Sd ($+0.233 \pm 10.55$ mV) y Sb ($+29.83 \pm 0.15$ mV). En todos los resultados observados en las muestras se obtuvo una diferencia estadística ($p \leq 0.05$) entre los valores del potencial Z. Los valores de la suspensión coloidal M:L (1:2) de pH 2.0 y de la suspensión del sobrenadante, presentan valores igualmente positivos con relación al potencial Z.

Comparando los resultados de potencial Z mostrados en la figura 14 con el valor de potencial Z ($+11.63 \pm 1.06$ mV) de la suspensión coloidal M:L (1:2) de pH 2.0 sin el lactosuero (1 % m/m) tratado mediante el proceso de sonicación, se observa que el

coacervado obtenido con el lactosuero sonicado prácticamente duplicó su valor de carga de las partículas, lo cual es atribuible al incremento de área superficial generado por la reducción de tamaño de las partículas, producto de la cavitación y por ende de la doble capa eléctrica al pasar de la escala micro a la nanométrica.

El efecto de la sonicación arriba señalado ha sido explicado por Jambrak *et al.* (2014) con las proteínas de lactosuero cuando éstas fueron expuestas a ondas ultrasónicas, que dieron por resultado un cambio en la carga superficial de la proteína exponiendo un mayor número de moléculas a la ionización.

Lo anterior explica también por qué el sobrenadante (Sb) adquirió también un potencial zeta positivo mayor, a pesar de tener un aparente mayor tamaño de partícula, que indica la formación de un conjunto de moléculas (flóculos) de baja densidad, pero que pueden ser predominantemente de lactosuero. Así mismo, el incremento de carga positiva para el lactosuero proporciona una mayor interacción electrostática con otros polímeros de carga opuesta, en este caso, con el mucílago de *O. ficus indica*.

Por otra parte, es importante mencionar que en la fracción correspondiente al sedimento (Sd), presentó tanto un valor alto de tamaño de partícula, como una desviación estándar (polidispersidad) elevada (1786.66 ± 1000.32 nm) y, lo mismo sucedió con la desviación estándar del potencial Z (0.233 ± 10.55 mV), si bien el valor promedio de éste fue prácticamente de cero. Esto se puede interpretar por el efecto que tuvo la fuerza centrífuga sobre la suspensión coloidal (M:L 1:2; pH 2.0) infiriéndose que se hayan formado flóculos con un intervalo de tamaño micro y nanométrico y este estado de agregación también puede explicar el potencial prácticamente nulo; sin embargo, habría que realizar en este caso mayores estudios; no habiéndose considerados necesarios para los objetivos de la presente investigación.

Para conocer el efecto que tuvo el tamaño de las partículas (coacervados o esferas) obtenidas en la escala nano y micrométrica, así como de su respectivo potencial Z en la liberación de calcio *in vitro*, se procedió a evaluar únicamente el sistema coloidal M:L (1:2) de pH 2.0 como su sobrenadante (Sb).

9.15 Contenido de calcio en los materiales hidrocoloidales y el coacervado

Los valores de contenido de calcio (mg/L) inicial de cada componente hidrocoloidal, como del coacervado se consideró la parte teórica a partir de la concentración inicial masa/masa de cada hidrocoloide.

Los resultados para el lactosuero 1 % m/m se obtuvieron 13.4 mg/L, este dato en equivalencia a que se realizó una relación molar 1:2 (M:L) de acuerdo a su concentración (m/m) para el desarrollo del coacervado, del cuál equivalen a 200 mg de lactosuero, en donde, el contenido teórico de calcio es de 28.16 mg. En el caso del mucílago al 0.0625 % se reportó un contenido de calcio de 8.3 mg/L, para la creación de las microesferas, se utilizaron 6.25 mg de este polisacárido, lo que corresponde a un contenido de calcio teórico de 0.2246 mg.

Finalmente, siguiendo con la relación 1:2 (M:L) el dato registrado de calcio fue de 29.05 mg/L y del sobrenadante de 29.40 mg/L, ambos resultados generados a partir de la técnica ICP. Considerando el peso de la muestra de las microesferas elaboradas a partir de lactosuero y del mucílago en la concentración masa/masa; se obtuvo un peso de las microesferas de 201.25 mg en 5 ml (volumen de muestra analizada a través de la técnica ICP), por lo cual, representa 29.05 mg de calcio.

9.16 Cinética de liberación de calcio *in vitro* del coacervado

Con la información obtenida de la concentración de calcio en los componentes hidrocoloidales así como en los coacervados, se procedió a determinar la cinética de liberación *in vitro* empleando de manera independiente el sistema coloidal M:L (1:2) de pH 2.0 y su sobrenadante (Sb), esto con el fin de observar si existen diferencias en la liberación de calcio entre ambos sistemas coloidales por presentar diferentes resultados en tamaño de partícula y potencial Z. Las dispersiones coloidales del lactosuero (1 % m/m) y del mucílago (0.0625 % m/m) se utilizaron como controles de la liberación de calcio *in vitro*, al contener ambas, de manera independiente, un contenido distinto de calcio que fue previamente determinado. Los resultados en forma de gráfico de este ensayo se muestran en la Figura 15 A y B.

Los resultados en porcentaje de calcio liberado *in vitro* en un medio ácido (pH 2.0) y en medio básico (pH 8.2) se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de calcio liberado acumulado después de 60 min, en un sistema de disolución *in vitro* en medio ácido y básico. Los datos corresponden a las suspensiones coloidales de lactosuero (L), mucílago (M), de coacervado nanoesférico (M:L, 1:2, formado a pH 2.0 con sonicación previa del L) así como del sobrenadante (Sb) del coacervado, este último, obtenido por centrifugación.

Suspensiones coloidales	Medio Ácido (pH 2.0) (%)	Medio Básico (pH 8.2) (%)
Lactosuero 1 % m/m (L)	36.42 ± 0.010	5.08 ± 0.010
Mucílago 0.0625 % m/m (M)	10.05 ± 0.010	28.50 ± 0.010
M:L (1:2)	17.00 ± 0.035	13.13 ± 0.010
Sobrenadante (Sb)	17.59 ± 0.010	13.16 ± 0.010

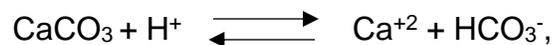
Los valores mostrados en la tabla 6 representan el porcentaje promedio de calcio liberado acumulado después de 60 min de permanecer cada muestra en un medio distinto de disolución (ácido: pH 2.0 y básico: pH 8.2). Con cada promedio se proporciona el valor de desviación estándar.

El comportamiento de liberación de calcio en medio ácido obtenido en este estudio se ha asociado a lo observado en general con las proteínas, que sufren una desnaturalización ácida a un pH de 2.0, principalmente por HCl; por consecuencia, ocurre una protonación de sus residuos ionizables, lo que debilita las fuerzas electrostáticas con los iones metálicos, en este caso el calcio, permitiendo y acelerando de esta manera su liberación al medio. Por el contrario, el fortalecimiento de las fuerzas electrostáticas ocurre a un pH neutro o básico (8.0) permitiendo la unión del ion bivalente (Ca^{2+}) con aminoácidos que se encuentran desprotonados (aspartato, glutamato e histidina) (Kim y Baum, 1998; Tovar *et al.*, 2012; Rodzik *et al.*, 2020).

Lo anterior se corroboró, de acuerdo con el modelo *in vitro* aplicado en este estudio, que, si bien en medio alcalino existe liberación de calcio desde el lactosuero (L), la proporción liberada es menor ($\approx 5\%$) comparada con el aproximadamente mayor valor de 36% que se presenta en el medio ácido; además, en ambos medios de disolución

la liberación de calcio no es total, sumando alrededor del sólo 41% del contenido inicial de calcio en 120 min.

En el caso del mucílago, la liberación del calcio resultó ser menor en medio ácido que en el alcalino. Para este análisis de resultados se toma en cuenta el hecho de que estudios previos (Contreras-Padilla *et al.*, 2015; Rojas-Molina *et al.*, 2015; Quintero-García *et al.*, 2020) y los resultados de la caracterización del mucílago realizada en la presente investigación, indican la presencia de calcio en la forma salina de carbonato. De tal forma, se observó que el porcentaje liberado de calcio obtenido a partir de su sal (carbonato) en medio ácido, fue del 10.05 %, lo que representa en concentraciones de mg/L un valor de 2.41. Esto se explica porque se produce una disociación del carbonato de calcio a pH ácido (con valores menores a 4.0), lo cual ocurre a través de la siguiente reacción (De Giudici, 2002):



De Giudici (2002) empleó soluciones de calcita para la determinación de concentraciones de calcio a pH de 2.7, añadiendo HCl a la muestra, la cual fue 1.0×10^{-3} mol/L; habiendo obtenido por otra parte, que a pH de 7.8, la concentración de calcio en el medio fue de 2.2×10^{-5} mol/L. Tales resultados permiten corroborar la mayor cantidad de calcio en medio ácido obtenida para el mucílago en este modelo de disolución.

Lo anterior indica que para el caso del mucílago (M), con el 10.05% y 28.50% de calcio liberado acumulado en medio ácido y alcalino, respectivamente, a diferencia del lactosuero (L), se libera menos calcio en medio ácido que en el alcalino. Esta mayor liberación de calcio desde M se puede explicar porque al utilizar en nuestro estudio, un buffer de fosfatos para obtener un medio que semejara en lo posible el pH básico del intestino delgado, existen datos que explican cómo los iones fosfato influyen en la disolución del calcio (Hu, et al. 2015).

Hu et al. (2015), mostraron que a un pH de 8.0, los iones fosfato interactúan con el cristal de carbonato de calcio por medio de una nucleación, obteniendo como resultado una disminución en la solvatación del calcio y su deshidratación (como primera etapa) será más lenta en sistema acuoso. No obstante, si continúa el

carbonato en solución y se llega a un pH superior a 9.0, habrá una hidratación del calcio (segunda etapa) y se logrará una precipitación de carbonato de calcio, formando un polimorfo cristalino conocido como ikaite.

Es importante mencionar por otra parte que, en estudios realizados en ratas, la formación de fosfato de calcio a partir del carbonato impidió la disolución del calcio debido a su baja constante de solubilidad, ya que el K_{ps} del fosfato de calcio (2.07×10^{-33}) es mucho menor que la solubilidad de la calcita (3.36×10^{-9}), por lo que así se puede explicar (Lee *et al.*, 2015), el por qué la absorción de calcio a partir de comprimidos de carbonato de calcio utilizados como suplemento para el tratamiento de la osteoporosis, resulta muy deficiente en modelos biológicos. Sin embargo, en la propuesta de este estudio, se estima que el calcio contenido en M se ve favorecida al liberarse en el colon en condiciones biológicas, ya que se ha demostrado que este polisacárido pasará por el proceso fermentativo (Cruz- Rubio *et al.*, 2020) de las bacterias que contiene la microbiota colónica dando como resultado, la producción de ácidos grasos que junto con la descomposición del mucílago, liberarán el calcio favorecido por la acidificación de la zona luminal, aumentando su absorción y biodisponibilidad, logrando con ello finalmente, el efecto benéfico óseo del consumo de mucílago de *O. ficus indica* demostrado en un estudio previo por Quintero-García *et al.* (2020).

Por otra parte, tratándose de las nanoesferas (M:L), los resultados de liberación obtenidos en este estudio con el modelo *in vitro*, mostraron que (Tabla 6 y Figura 15 B), en un tiempo total de 120 min, considerando los 60 minutos de cada ensayo independiente en medio ácido y alcalino, se liberó de las nanoesferas respectivamente, un 17.00% y 13.13% de calcio; de modo que se infiere que el acumulado de calcio que se disolvería a partir de las nanoesferas entre el estómago y el intestino delgado, sólo alcanzaría un 30% del contenido de calcio cargado en las nanoesferas; infiriéndose también que un 70% de calcio estaría aun atrapado y llegando sin liberar al colon.

Como se puede apreciar en la Figura 15 B, los resultados nos indican que con la técnica de coacervación compleja utilizada en este estudio y aplicando previamente un tratamiento de sonicación al lactosuero en estado coloidal, se lograron desarrollar

nanoesferas con el sistema M:L (1:2 a pH 2.0). Los datos permiten apreciar valores de calcio intermedios con relación a los de los biopolímeros independientes (lactosuero y mucílago). Esto significa que, al momento de realizar la coacervación bajo las condiciones establecidas en este estudio, se está llevando a cabo altas interacciones electrostáticas entre los dos biopolímeros (explicado anteriormente); permitiendo una “protección”, disminución o retardo en la liberación del calcio contenido en el coacervado al estar en contacto con un pH ácido. Aunado a esto, se aprecia una cinética de liberación modificada que va en aumento cuando los dos sistemas [M:L y sobrenadante (Sb)] se encuentran dentro del medio básico sin detener la liberación de calcio desde sus matrices.

Adicional a lo anterior, realizando una comparación entre la suspensión coloidal del mucílago (0.0625 %) y las suspensiones coloidales M:L y Sb, se puede observar un comportamiento similar; no obstante, cabe mencionar que para obtener un efecto biológico en el hueso serían necesarias elevadas cantidades de mucílago, y esto sobrepasa la ingesta diaria recomendada de fibra para humanos (Quintero-García *et al.*, 2020). Es importante destacar así mismo, que la liberación del calcio en medio ácido y básico en las suspensiones coloidales fue mayor comparado con el calcio liberado observado en el mucílago, debiéndose probablemente a que parte del calcio liberado por las nanoesferas también procede de las proteínas del lactosuero, tal como se esperaba.

De acuerdo con todo lo anterior, a partir de los resultados obtenidos hasta la fecha, se puede afirmar que la nanoesfera biopolimérica desarrollada estaría cumpliendo con su función de conducir al colon la mayor cantidad de calcio para su liberación y absorción, apoyada por la microbiota local. Con esto último se espera comprobar en un futuro, mediante el modelo experimental ratas ovariectomizadas ya probado por el grupo de investigación de la UAQ, que con las nanoesferas desarrolladas a partir de los biopolímeros (lactosuero y mucílago de *O. ficus indica*), optimizan la liberación de calcio, prolongando la disolución de la mayor proporción de su carga hasta el colon. Esto último le otorgaría a dichas nanoesferas un alto potencial nutracéutico como agente remineralizante óseo, pudiendo ser una alternativa idónea para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis.

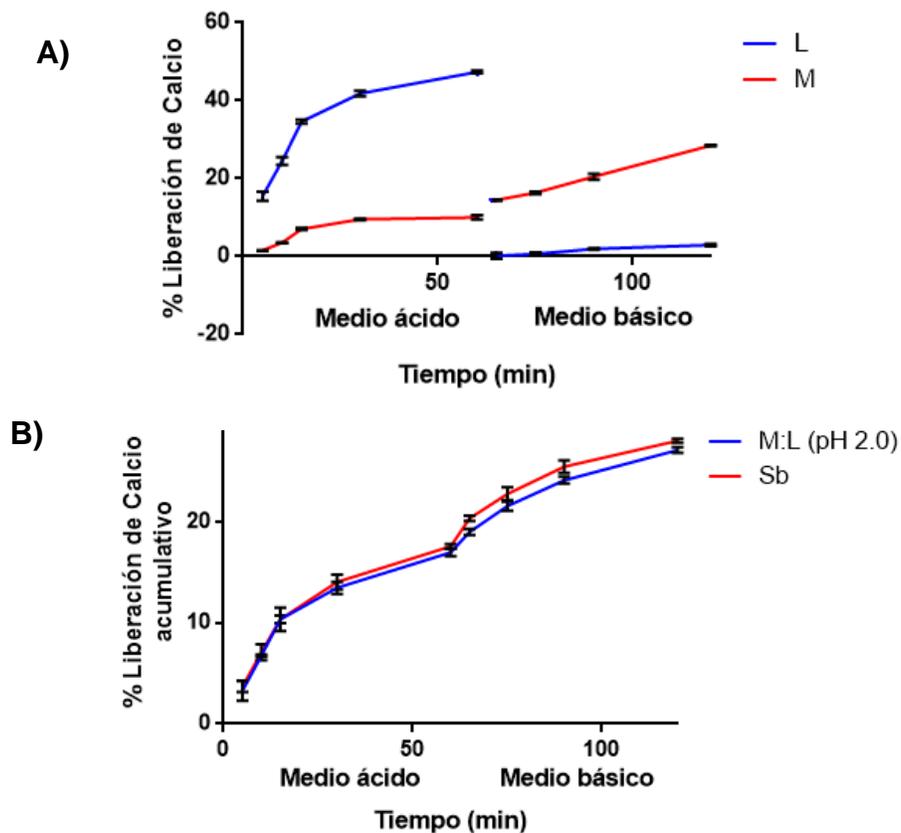


Figura 15. A) Porcentaje de liberación de calcio *in vitro* de suspensiones coloidales lactosuero (1 % m/m) y mucílago (0.0625 % m/m) en medio ácido y básico. B) Porcentaje de liberación de calcio *in vitro* acumulativo del (M:L) a un pH de 2.0 y sobrenadante derivado de M:L (pH 2.0) en medio ácido y básico. M:L (mucílago-lactosuero), L: lactosuero. M: mucílago. Sb: Sobrenadante. Los valores mostrados representan el resultado de los porcentajes para la determinación de la liberación de calcio a partir de la representación de la media con su porcentaje de coeficiente de variación en medio ácido y básico ($CV \leq 5.0$ %) obteniendo de esta manera la desviación estándar.

Se ha reportado que los polisacáridos como los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos entre otros, son conocidos como fibras no digeribles llamados específicamente como prebióticos (Davani-Davari *et al.*, 2019). Estos prebióticos en conjunto con las proteínas son metabolizados a través de una fermentación inducida por la microbiota del íleon y colon, el resultado son ácidos grasos de cadena corta como son el acetato, butirato y propionato (Koh *et al.*, 2016). El efecto de la

fermentación de polisacáridos aumenta la absorción del calcio disminuyendo el pH luminal y aumentando la expresión génica de la proteína Calbindina D9K encargada de la unión y transportación del calcio intestinal (Fukushima *et al.*, 2012). Por otro lado, el mucílago del *Opuntia ficus indica* se ha demostrado que es un prebiótico al inducir un aumento en el crecimiento de bacterias colónicas como son lactobacilos y bifidobacterias en experimentos *in vitro* (Cruz-Rubio *et al.*, 2020). Finalmente, se observa un comportamiento similar en los resultados para la liberación de calcio *in vitro* (medio ácido y básico) entre el sistema coloidal M:L (1:2) pH 2.0 y su sobrenadante. Esto quiere decir que posiblemente el calcio liberado de los dos sistemas provenga de nano esferas y micro esferas desarrolladas. En este proyecto se ha utilizado el total del lactosuero para realizar la coacervación compleja con el mucílago, esto quiere decir, que se encuentra presente la lactoferrina en el biopolímero, además de la alfa-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina (Xue *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la lactoferrina se une por enlaces de coordinación con el ion carbonato formando un complejo de tipo metaloproteína (metal-proteína), esto con el fin de lograr la unión del hierro a la lactoferrina. El punto isoeléctrico de esta proteína es de 8.7, lo que significa que la unión del hierro a la lactoferrina a un pH bajo (ácido) provoca la inestabilidad del ion carbonato liberando el hierro de la lactoferrina (apolactoferrina). Por el contrario, a un pH básico el ion carbonato permanece unido a la lactoferrina, manteniendo la estabilidad de la proteína (Rodzik *et al.*, 2020).

9.16 Determinación del modelo matemático de mejor ajuste cinético del perfil de liberación de calcio de las nanoesferas

El objetivo final de este proyecto fue conocer si las nanoesferas elaboradas pueden ser propuestas como un producto nutracéutico que cumpla con perfil de liberación prolongada para el calcio e incremente con ello su biodisponibilidad. Para esto, se efectuó un ajuste de los resultados de disolución obtenidos con la dispersión (M:L) a varios modelos matemáticos. Lo anterior también con el propósito de inferir el mecanismo involucrado en la liberación del calcio con la matriz de biopolímeros en estudio. (Aragón *et al.*, 2009). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Ajuste a modelos matemáticos para la cinética del perfil de liberación.

	pH	Orden Cero			Primer Orden			Higuchi			Korsmeyer-Peppas		
		k	r ²	valor de <i>p</i>	k	r ²	valor de <i>p</i>	k	r ²	valor de <i>p</i>	k	r ²	valor de <i>p</i>
Microesferas	2.0	0.2863	0.8567	<0.0001	-0.0014	0.8754	<0.0001	2.5220	0.9676	<0.0001	-1.1197	0.6155	<0.0001
	8.2	1.4394	0.8809	<0.0001	-0.5133	0.8985	<0.0001	2.4424	0.9664	<0.0001	-0.9779	0.6017	<0.0001
Sobrenadante	2.0	0.2863	0.8567	<0.0001	-0.0014	0.8754	<0.0001	2.5220	0.9676	<0.0001	-1.1197	0.6155	<0.0001
	8.2	1.394	0.8809	<0.0001	-0.5133	0.8985	<0.0001	2.4424	0.9664	<0.0001	-0.9779	0.6017	<0.0001

Los valores representan el resultado de las ecuaciones utilizadas en cada modelo matemático. k: constante de velocidad de liberación, r²: factor de correlación al modelo matemático. El valor de *p* (<0.0001) se determinó a través de la prueba estadística Kruskal-Wallis.

Como se puede apreciar, el modelo que mostró un factor de correlación (r^2) cercano a 1.0, tanto para la muestra del sobrenadante (0.9664) como para las nanoesferas (0.9676), fue el modelo matemático de Higuchi. Con base en este modelo, se puede inferir que la liberación del calcio desde la matriz biopolimérica (M:L) ocurre mediante un mecanismo de difusión de manera constante en función de la raíz cuadrada del tiempo, cumpliendo así mismo, con la segunda Ley de Fick (Dash *et al.*, 2010).

Cabe mencionar que el modelo de Higuchi está relacionado con matrices homogéneas, en donde el principio activo desde su origen matricial o al entrar la matriz en contacto con el medio fluido, se encontrará disperso molecularmente (en este caso, iónicamente) dentro de estas matrices, lo que conlleva a presentar una tasa de liberación controlada por difusión (Gouda *et al.*, 2017).

Por otra parte, con los resultados obtenidos, se propone como una posibilidad, que el mecanismo de liberación del calcio proveniente de las nanoesferas floculadas contenidas en el sobrenadante, ocurre a través de un sistema monolítico controlado por hinchamiento (Katime *et al.*, 2005). En dicho sistema, el principio activo se encuentra disperso en un biopolímero hidrofílico que tiene la capacidad de hincharse sin que éste llegue a disolverse en un medio acuoso, permitiendo tener una velocidad de liberación prolongada del fármaco (Katime *et al.*, 2005).

Finalmente, se puede reflexionar que el conocer el perfil de disolución *in vitro* de un bioactivo novedoso como el representado por las nanoesferas obtenidas por coacervación en este estudio, representa un factor relevante para la predicción de su comportamiento en un sistema *in vivo*. Sin embargo, se requerirá realizar a futuro estudios en donde se obtenga la caracterización de estas nanoesferas para conocer mejor el proceso de difusión del calcio.

10. CONCLUSIONES

El método desarrollado para extraer mucílago de cladodios de *Opuntia ficus indica* ofrece como ventaja tecnológica con relación a otros métodos que, si bien el rendimiento de mucílago es semejante, este método es sustentable y su eficiencia de separación es cercana al 100 %; siendo, además, la primera ocasión que esto último se notifica.

La composición química y microestructura del mucílago extraído de *O. ficus indica* son dependientes de que el proceso se realice con cladodios frescos o deshidratados, lo cual influye en sus propiedades fisicoquímicas y funcionales como la viscosidad; determinando con ello sus distintas aplicaciones potenciales como aditivo o excipiente en productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos.

La caracterización fisicoquímica de las dispersiones coloidales de lactosuero (L, 1% m/m) y de mucílago (M, 0.0625% m/m) de *O. ficus indica* obtenido de cladodios deshidratados, demostró que, en cuanto a tamaño de partícula, ambos sistemas almacenados hasta 72 h a 4°C son estables; difiriendo en sus dimensiones (L = 24.38 μm y M = 77.01 μm) acorde a su estructura molecular en estado coloidal.

De las propiedades fisicoquímicas de L y M en dispersión coloidal, el pH fue factor determinante para la carga superficial del L, que sólo mostró potencial Zeta positivo (+22.93 mV) a pH de 2.0 (inferior a su PI experimental de 4.48); por el contrario, entre 7.0 y 2.0 de pH, el potencial Zeta de M fue negativo (-2.31 mV a pH 2.0).

En este contexto cabe destacar que, hasta este momento, no se ha reportado la formación de micro y nano estructuras utilizando al mucílago de *O. ficus indica* con lactosuero como parte de su composición; quedando también como un factor determinante para la obtención de nano o microesferas de (M:L), la acidificación del sistema de coacervación a pH 2.0, así como la aplicación o no de sonicación previa a la interacción con el mucílago, del lactosuero.

Con base a que en el estado coloidal L presenta menor tamaño de partícula respecto a M, así como la dependencia de L de un pH ácido para obtener un adecuado potencial de carga positivo; es posible explicar que para la formación de microesferas por coacervación se haya requerido una proporción M:L de 1 a 2 y un pH de 2.0.

El pH ácido también resultó ser el factor de mayor influencia en el tamaño de las microesferas de M:L obtenidas por coacervación, habiéndose demostrado que los coacervados redujeron significativamente ($p \leq 0.05$) su tamaño de partícula promedio de $77.13 \pm 0.31 \mu\text{m}$ a $42.85 \pm 1.04 \mu\text{m}$, conforme se acidificó el sistema coloidal de 5.0 hasta 2.0. Además, con una diferencia estadística en todas las muestras.

El pH ácido es así mismo, un factor que afecta el potencial zeta de las microesferas en suspensión coloidal, pasando de un valor negativo a pH 5.0 de $-17.56 \pm 1.72 \text{ mV}$, a $+11.63 \pm 1.06 \text{ mV}$ a pH 2.0; lo cual se atribuye a la mayor exposición superficial en el coacervado M:L de las moléculas de L, producto de la relación molecular 1 a 2.

La aplicación previa de ultrasonido al L en estado coloidal y la acidificación (pH 2.0) del L y del sistema de coacervación M:L, son factores de proceso que determinan la formación de nanoesferas ($730.4 \pm 84.76 \text{ nm}$) en lugar de microesferas ($42.85 \pm 1.04 \mu\text{m}$); siendo un fenómeno atribuible a la cavitación generada por las ondas de ultrasonido en el L, que eliminaron agregados y produjeron mayor dispersión molecular y diferencial de carga superficial positiva disponible para la coacervación con M.

En el estudio de liberación de calcio *in vitro* de las nanoesferas, se detectó una máxima liberación de dicho mineral cercana al 17 % en medio ácido y 13 % en medio básico. La cinética de liberación de calcio se ajustó al modelo de Higuchi, lo que sugiere una velocidad constante de liberación prolongada de este mineral, dependiente de la raíz cuadrada del tiempo, lo que favorecería prolongar su liberación en el tracto gastrointestinal, así como el incremento en su biodisponibilidad.

La comparación de resultados del calcio liberado *in vitro* de manera independiente en medio ácido (pH 2.0) y en medio alcalino (pH 8.2), por las nanoesferas M:L (1:2) y las dispersiones coloidales del lactosuero (1 % m/m y del mucílago (0.0625 % m/m) indican que las nanoesferas obtenidas en este estudio son candidatas para ser un suplemento para el tratamiento de la osteoporosis.

11. PERSPECTIVAS

Se sugiere llevar a cabo en trabajos futuros, la optimización del proceso de coacervación con la aplicación de sonicación, para validar y escalar la obtención únicamente de nano o microesferas, así como la caracterización completa de las estructuras obtenidas en este trabajo.

Así mismo, se propone que se realicen estudios *in vivo* con modelo de rata ovariectomizada para determinar la absorción y biodisponibilidad del calcio procedente de dichas estructuras biopoliméricas, a fin de que puedan ser utilizadas como coadyuvantes para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades óseas en las que se vea comprometida la densidad ósea.

12. REFERENCIAS

- 1.AACC. (2001). The definition of dietary fiber. Métodos 08.01.01 y 32-05.01. *Cereal Foods World* 46: 112-126.
- 2.Acartürk F., Armagan C. (2009). Comparison of guar gum from different sources for the preparation of prolonged-release or colon-specific dosage forms. *Pharmacology Development Technology*.14: 271-277.
- 3.Ach D., Briancon S., Dugas V., Pelletier J., Broze G., Chevalier Y. (2015). Influence of main whey protein components on the mechanism of complex coacervation with *Acacia* gum. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 481: 367-374.
- 4.Adhikari B., Howes T., Bhandari R., Truong V. (2001). Stickiness in foods: a review of mechanisms and test methods. *International Journal of Food Sciences Technology*. 4: 1-33.
- 5.Aguilera-Bairrero M., Rivera-Márquez J., Trujillo-Arriaga H., Tamayo J., Barreira-Mercado E., Rodríguez-García M. (2013). Intake of dehydrated nopal (*Opuntia ficus indica*) improves bone mineral density and calciuria in adult Mexican women. *Food and Nutrition Research*. 57: 19106-<https://doi.org/10.3402/fnr.v57i0.19106>.
- 6.Andreu L., Nuncio-Jáuregui N., Carbonell-Barrachina Á., Legua P., Hernández F. (2018). Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. cladodes and fruits. *Journal Sciences Food Agriculture*. 98: 1566-1573.
- 7.AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Métodos 925.10, 991.4, 993.19, 968.08, 984.25, AOAC, Gaithersburg, Md, USA, 17th. Ed. W. Horwitz.
- 8.Aragón J., González R., Brizuela N., Valdés O. (2009). Estudio cinético de liberación *in vitro* en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO₃. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 10: 119-130.
- 9.Archanaa G., Sabina K., Babuskin S., Radhakrishnan K., Fayidh M., Saravana B., Sivarajan M., Sukumar M. (2013). Preparation and characterization of

- mucilage polysaccharide for biomedical applications. *Carbohydrates Polymers*. 98: 89-94.
- 10.ASTM. (2012). Libro Anual de Normas ASTM. Sección 11. Agua y Tecnología Ambiental Vol. 11.01. Agua. © Attribution Non-Commercial (BY-NC).
 - 11.Bai L., Liu F., Xu X., Huan S., Gu J., McClements D. (2017). Impact of polysaccharide molecular characteristics on viscosity enhancement and depletion flocculation. *Journal of Foods Engineering*. 207: 35-45.
 - 12.Bala P., Samantaray B., Srivastava, S. (2000). Dehydration transformation in Ca-montmorillonite. *Bulletin of Materials Science*. 23: 61–67.
 - 13.Bastian, E.R. (2017). Fluids. In *Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*, 1st ed.; Elsevier, Inc.: MA, USA, pp. 250–259.
 - 14.Bayar N., Kriaa M., Kammoun R. (2016). Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *Journal Biological Macromolecules*. 2: 441-450.
 - 15.Begum R., Yusof Y., Gulzarul M., Uddin B. (2017). Sctructural and functional properties of pectin extracted from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) waste: Effects of drying. *Journal of Foods Science Process*. 20: S190-S201.
 - 16.Bernabei R., Marlone A., Ortolani E., Landi F., Marzetti E. (2014). Screening, diagnosis and treatment of osteoporosis: a brief review. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. 11:201-207.
 - 17.Berovič M. (2011). Sterilization in Biotechnology. En: *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed.; Academic Press, Moo-Young.: MA, USA, pp. 135-150.
 - 18.Brown E. (2013). Role of the calcium-sensing receptor in extracellular calcium homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 27: 333-343.
 - 19.Bostan A., Seyed M.A., Farhoosh R. (2010). Optimization of hydrocolloid extraction from wild sage seed (*Salvia macrosiphon*) using response surface. *International Journal of Food Properties*. 13: 1380-1392.

20. Burgees DJ. (1994). Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology. En: Complex Coacervation: Microcapsule Formation, 1^{er} ed.; Springer Verlag, Softcover.: MA, USA, pp. 285-300.
21. Cabrera-Pivaral C., Orozco-Valerio M., Báez-Báez M., Méndez-Magaña A., Covarrubias-Bermúdez M., Zavala-González M. (2018). Competencia clínica de médicos mexicanos de atención primaria para manejar la osteoporosis. *Investigación en Educación Médica*. 7: 44-51.
22. Callejas J., Prieto F., Reyes V., Marmolejo Y., Méndez. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria de Guanajuato*. 22: 11-18.
23. Camelo L., Wilches-Torres A., Cárdenas-Chaparro A., Gómez, J., Otálora, M. (2019). Preparation and physicochemical characterization of softgels cross-Linked with cactus mucilage extracted from cladodes of *Opuntia Ficus-Indica*. *Molecules*. 24: 2531
24. Cano A., Chedraui P., Dimitros G., Lopes P., Mishra G., Mueck A., Senturk L., Simoncini T., Stevenson J., Stute P., Tuomikoski P., Rees M., Lambrinoudaki I. (2018). Calcium in the prevention of postmenopausal osteoporosis: EMAS clinical guide. *Maturitas*. 107: 7-12.
25. Capello C., Fischer U., Hungerbuhler K. (2007). What is a Green Solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*. 9: 927–934.
26. Cárdenas A., Higuera-Ciapara I., Goycoolea F.M. (1997). Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) mucilage in solution. *Journal of the Professional Association For Cactus Development*. 2: 152–159.
27. Chabbert-Bufferet N., Thomin A., Darai E. (2016). Moduladores de los receptores estrogénicos (MSRE). *Ginecología-Obstetricia*. 52: 1-10.
28. Chapeau A., Bertrand N., Briard-Bion V., Hamon P., Poncelet D., Bouhallab S. (2017). Coacervates of whey proteins to protect and improve the oral delivery of a bioactive molecule. *Journal of Functionals Foods*. 38: 197, 204.
29. Charuwat P., Boardman G., Bott C., Novak JT. (2018). Thermal degradation of long Chain fatty acids. *Water Environmental Research*. 90: 278-287.

30. Chlup P. H., Bernard D., Stewart G. (2008). Disc stack centrifuge operating parameters and their impact on yeast physiology. *Journal Biology Macromolecules*. 114: 45-61.
31. Conde L. (1975). Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae). *Missouri Botanical Garden*. 62: 425-473.
32. Cong Q., Chen H., Liao W., Xiao F., Wang P., Qin Y., Ding, K. (2016). Structural characterization and effect on anti-angiogenic activity of a fucoidan from *Sargassum fusiforme*. *Carbohydrates Polymers*. 136: 899-907.
33. Contreras-Padilla M., Pérez-Torrero E., Hernández-Urbiola M., Hernández-Quevedo G., Del Real A., Rivera-Muñoz E., Rodríguez-García M. (2011). Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 38-43.
34. Contreras-Padilla M., Rivera-Muñoz E., Gutiérrez-Cortez E., Del López A., Rodríguez-García M. (2015). Characterization of crystalline structures in *Opuntia ficus-indica*. *Jornual of Biological Phsics*. 41: 99-112.
35. Contreras-Padilla M., Rodríguez-García M., Gutiérrez-Cortez E., Valderrama-Bravo M., Rojas-Molina I., Rivera-Muñoz E. (2016). Physicochemical and rheological characterization of *Opuntia ficus* mucilage at three different maturity stages of cladode *European Polymer Journal*. 78: 226-234.
36. Cornejo García FR., Gutiérrez Cortez E., Quirino Barreda CT., Gazga Urioste C., Miranda Calderón JE., Faustino Vega A., Rojas Molina JI. (2018). Extracción-purificación de mucílago de la semilla de chíá. IMPI. Solicitud de patente No. Expediente: MX/a/2018/010230; Folio: MX/E/2018/063489., fecha 23 de agosto, México.
37. Cortés-Camargo S., Gallardo-Rivera R., Barragán-Huerta B., Dublán-García O., Román-Guerrero A., Pérez-Alonso C. (2017). Exploring the potential of mesquite gum-nopal mucilage mixtures: physicochemical and functional properties. *Journal Food Science*. 83: 113-121.

38. Cosman F., Beur S., LeBoff M., Lewiecki E., Tanner B., Randall S., Lindsay R. (2014). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis International*. 25: 2359-2381.
39. Cruz-Rubio J., Mueller M., Loeppert R., Viernstein H. y Praznik W. (2020). The Effect of Cladode drying techniques on the prebiotic potential and molecular characteristics of the mucilage extracted from *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia joconostle*. *Science Pharmacology*. 88: 43-59.
40. Das S. y Chaudhury A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *Pharmacology Sciences Technology*. 12: 62-76.
41. Das S., Crockett J. (2013). Osteoporosis – a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Design, Development and Therapy*. 7: 435-448.
42. Dash S., Murthy P., Nath L., Chowdhury P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 67: 217-223.
43. Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Jalil S., Berenjian A., Ghasemi Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms and clinical applications. *Foods*. 8: 1-27.
44. De Giudici G. (2002). Surface control vs. diffusion control during calcite dissolution: Dependence of step-edge velocity upon solution pH. *American Mineralogist*. 87: 1279-1285.
45. Di Monaco R., Cavella S. y Masi P. (2008). Predicting sensory cohesiveness, hardness and springiness of solid foods from instrumental measurements. *Journal of Texture Studies*. 39: 129–149.
46. Diagnóstico y tratamiento de osteoporosis en mujeres posmenopáusicas. (2018). Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. México, CENETEC. (Fecha de consulta: 29 de diciembre 2021).
47. Dong X., Zhang Y., Wong M. (2014). Estrogen deficiency-induced Ca balance impairment is associated with decrease in expression of epithelial Ca transport proteins in aged female rats. *Life Sciences*. 96: 26-32.

48. Drake M., Clarke B., Lewiecki M. (2015). The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. *Clinical Therapeutics*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.06.006> 0149-2918/\$.
49. El-Mostafa K., Kharrassi Y., Badreddine A., Andreoletti P., Vamecq J., Kebbaj M., 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: 14879-14901.
50. Engelhardt K., Lexis M., Gochev G., Konnerth C., Miller R., Willenbacher N., Peukert W., Braunschweig B. (2013). pH Effects on the molecular structure of β -lactoglobulin modified air-water interfaces and its impact on foam rheology. *American Chemical Society*. 29: 11646-11655.
51. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). Milk and milk products. *Codex alimentarius*. ISBN 978-92-5-305614-9.
52. Faria M., Mislaine K., Nicoletti V. (2017). Characterization of biopolymers and soy protein isolate-high-methoxyl pectin complex. *Polímeros*. 27: 62-67.
53. Fiber analysis of animal feed-FOSS Analytical. (2018). Available online: <file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/eBook-Fibre-analysis-of-animal-feed-GB.pdf>. (Fecha de consulta: 05 de abril 2021).
54. Fleet J., Scoch R. (2010). Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other factors. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 47: 181-195.
55. Florian T., Leng B., Jarrige A. (2005). Valor nutricional de *Opuntia ficus indica* como forraje de rumiantes. *Agriculture and Consumer Protection*. 169: 189-256.
56. Fukushima A., Aizaki Y., Sakuma K. (2012). Short-Chain fatty acids increase the level of calbindin-D9k messenger RNA in Caco-2-cells. *Journal of Nutrition Science*. 58: 287-291.
57. Gade A., Gaikwad S., Tiwari V., Yadav A., Ingle A., Rai M. (2010). Biofabrication of Silver Nanoparticles by *Opuntia ficus-indica*: In vitro Antibacterial Activity and Study of the Mechanism Involved in the Synthesis. *Nanoscience*. 6: 370-375.

58. Gambacciani M., Levancinni M. (2014). Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Przeegląd Menopauzalny*. 13: 213-220.
59. Garza A., Chávez H., Vega R., Soto E. (2005). Mecanismos moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud Mental*. 28: 48-58.
60. Gazga-Urioste C., Rivera-Becerril E., Pérez-Hernández G., Noguez-Méndez N.A., Faustino-Vega A., Quirino-Barreda CT. (2018). Physicochemical characterization and thermal behavior of hexosomes containing ketoconazole as potential topical antifungal delivery system. *Drug Development Industrial Pharmacy*. 45: 168-176.
61. Gebresamuel N., Gebre-Mariam T. (2012). Comparative physico-chemical characterization of the mucilages of two cactus pears (*Opuntia* Spp.) Obtained from Mekelle, northern Ethiopia. *Journal of Biomaterials Nanobiotechnology*. 3: 79-86.
62. Ghadermazi R., Khosrowshahi A., Tamjidi F. (2019). Optimization of whey protein isolate-quince seed mucilage complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 131: 368-377.
63. Gómez L., Alvarez C., Zhao M., Tiwari U., Curtin J., García-Vaquero M., Tiwari B.K. (2020). Innovative processing strategies and technologies to obtain hydrocolloids from macroalgae for food applications. *Carbohydrates Polymers*. 248: 116784.
64. González D., Luna B., Martínez-Ávila G., Rodríguez H., Avendaño V., Rojas R. (2019). Formulation and characterization of edible films based on organic mucilage from Mexican *Opuntia ficus-indica*. *Coatings*. 9: 506
65. González-Martínez D.A., Carrillo-Navas H., Barrera-Díaz C.E., Martínez-Vargas S.L., Alvarez-Ramírez J., Pérez-Alonso C. (2017). Characterization of a novel complex coacervate based on whey protein isolate and tamarind seed mucilage. *Food Hydrocolloids*. 72: 115-126.
66. Gorji G., Waheed A., Ludwig R., Toca-Herrera J., Schleining G. (2018). Complex coacervation of milk proteins with sodium alginate. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.7b03915

67. Gouda R., Baishya H., Qing Z. (2017). Application of mathematical models in drug release kinetics of Carbidopa and Levodopa ER tablets. *Journal of Developing Drugs*. 6: 2329-6631.
68. Goycoolea F., Cárdenas A. (2003). Pectins from *Opuntia* spp.: A short review. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 5: 17-29.
69. Grosso C., Valentão P., Ferreres F., Andrade P.B. (2015). Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Marine Drugs*. 13: 3182–3230.
70. Gutiérrez E., Rojas-Molina I., Pons-Hernández J., Guzmán H., Agua-Angel B., Arenas J., Fernández P., Palacios Fonseca A., Herrera G. y Rodríguez M. (2007). Study of calcium ion diffusion in nixtamalized quality protein maize as a function of cooking temperature. *Cereal Chemistry*. 84: 186-194.
71. Ha HK., Rankin S., Lee MR., Lee WJ. (2019). Development and characterization of whey protein-based nano-delivery systems: A review. *Molecules*. 24: 2-17.
72. Haffner F., Diab R. y Pase A. (2016). Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *Materials Science*. 3: 114-136.
73. Harnsilawat T., Pongsawatmanit R., McClements D. (2006). Characterization of b-lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Foods Hydrocolloids*. 20: 577-585.
74. Hernández-Becerra E., Gutiérrez-Cortez. E, Del Real A., Rojas-Molina A., Rodríguez-García M., Rubio. M, Quintero-García M., Rojas-Molina I. (2017) Bone mineral density, mechanical, microstructural properties and mineral content of the femur in growing rats fed with *Opuntia ficus indica* as calcium source in diet. *Nutrients*. doi:10.3390/nu9020108.
75. Hernández-Rojas M., Vélez-Ruíz J. (2014). Suero de leche y su aplicación para la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2: 13-22.
76. Hernández-Urbiola M., Contreras-Padilla M., Perez-Torrero E., Hernández-Quevedo G., Rojas-Molina I., Cortes M. (2010). Study of nutritional

- composition of nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *The Open Nutrition Journal*. 4: 1-6.
- 77.Ho C.H.L., Cacacea J.E., Mazza G. (2007). Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. *LWT. Food Sciences Technology*. 40: 1637–1647.
- 78.Hussain N., Ishak I., Sulaiman R., Fauzi W.M., Coorey R. (2015) Influence of processing conditions on rheological properties of aqueous extract chia (*Salvia hispánica* L) mucilage. *Food Research*. 4: 227-236.
- 79.Hu Y., Wolthers M., Wolf-Galdrow D., Nehrke G. (2015). Effect of pH and phosphate on calcium carbonate polymorphs precipitated at near-freezing temperature. *Crystal Growth and Design*. 15: 1596-1601.
- 80.INECC Instituto Nacional de Ecología. (2007). El nopal verdura. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/71/nverdura.html>. Fecha de consulta: 7 de septiembre 2017.
- 81.IOF International Osteoporosis Foundation. (2017). Epidemiology. <https://www.iofbonehealth.org/epidemiology>. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2017.
- 82.Jambrak A., Mason T., Lelas V., Paniwnyk L., Herceg Z. (2014). Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*. 121: 15-23.
- 83.Ji MX y Yu Q. (2015). Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Diseases and Translational Medicine*. 1: 9-13.
- 84.Jing L., Guan-Hao B. y Yong-Kang L (2007). Studies of forming whey protein-polysaccharides conjugates and it's functional properties. *China Dairy Industry*. 5: 43-51.
- 85.Kamau S., Cheison S., Chen W., Liu X., Lu R. (2010). Alpha lactoalbumin: its production technologies and bioactive peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9: 198-212.
- 86.Katime I., Katime O., Katime D. (2005). Materiales inteligentes: Hidrogeles macromoleculares. Algunas aplicaciones biomédicas. *Anuales de la Real Sociedad Española de Química*. ISSN 1575-3417.

- 87.Kaur M., Kaur A., Sharma R. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2:15-18.
- 88.Khalil R., Kim N., Claessens F., Decallone B. (2017). Sex steroids and the kidney: role in renal calcium and phosphate handling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 465: 1-12.
- 89.Khastgir G., Studd J., Holland N. (2010). Anabolic effect of estrogen replacement on bone in postmenopausal women with osteoporosis: histomorphometric evidence in a longitudinal study. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism*. 86: 289-295.
- 90.Kim S., Baum J. (1998). Electrostatic interactions in the acid denaturation of α -lactalbumin determined by NMR. *Protein Science*. 7: 1930-1938.
- 91.Koh A., De Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. (2016). From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 165: 1332-1345.
- 92.Lee J., Kim M., Kim J., Lee J., Jeong J., Oh J., Choi S. (2015). The fate of calcium carbonate nanoparticles administered by oral route: absorption and their interaction with biological matrices. *International Journal of Nanomedicine*. 10: 2273-2293.
- 93.Leng X., Turgeon S. (2007). Study of the shear effects on the mixture of whey protein/polysaccharides: Application of flow models in the study of the shear effects on WPI/polysaccharide system. *Food Hydrocolloids*. 21: 1014-1021.
- 94.León-Martínez F.M., Méndez -Lagunas L.L., Rodríguez-Ramírez J. (2010). Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydrates Polymers*. 81: 864-870.
- 95.Lerner U. (2006). Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 7: 584-595.
- 96.Lewiecki E. (2011). New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Rheumatology*. 7: 631-638.
- 97.Li M., Liu X. (2010). Calcium Phosphate Cement with BMP-2-loaded Gelatin Microspheres Enhances Bone Healing in Osteoporosis: A Pilot Study. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 468: 1978-1985.

98. Liguori G., Gentile C., Gaglio R., Perrone A., Guarcello R., Francesa N., Fretto S., Inglese P., Settanni L. (2020) Effect of addition of *Opuntia ficus-indica* mucilage on the biological leavening physical, nutritional, antioxidant and sensory aspects of bread. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 129: 184–191.
99. Livney Y. (2010). Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 15: 73-83.
100. Loayza G., Chávez J. (2007). Chemical compositional study of nopal (*Opuntia ficus indica*) cladodes for human consumption. *Revista de la Sociedad Química de Perú*. 1: 41-45.
101. López-Palacios C., Peña-Valdivia C., Reyes-Agüero J., Rodríguez-Hernández A. (2011). Effects of domestication on structural polysaccharides and dietary fiber in nopalitos (*Opuntia* spp). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 59:1015-1026.
102. Lunkad R., Murriliuk A., Tosner Z., Stepanek M., Kosovan P. (2021). Role of pK_A in charge regulation and conformation of various peptide sequences. *Polymers*. 13: 1-21.
103. Madera-Santana T., Vargas-Rodríguez L., Núñez-Colín C., González-García F., Peña-Caballero V., Núñez-Gastélum J., Gallegos-Vázquez C., Rodríguez-Núñez R. (2018). Mucilage from cladodes of *Opuntia spinulifera* Salm-Dyck: chemical, morphological, structural and thermal characterization. *CYTA-J. Food*. 16: 650-657.
104. Majdoub H., Roudesli S., Picton L., Le Cerf D., Muller G., Grisel M (2001). Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions. *Carbohydrates Polymers*. 46: 69-79.
105. Malainine M., Dufresne A., Dupeyre D., Vignon R., Mahrouz M. (2003). First evidence for the presence of weddellite crystallites in *Opuntia ficus indica* parenchyma. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*. 58: 812–816.
106. Manals-Cutiño E., Penedo-Medina M., Giralt-Ortega G. (2011). Análisis termogravimétrico y térmico diferencial de diferentes biomásas vegetales. *Tecnología Química*. 31: 180-190.

107. Marcus J., DeMarsh A., Alcaine S. (2021). Upcycling of whey permeate through yeast- and mold-driven fermentations under anoxic and oxic Conditions. *Fermentation*. 7: 1-16
108. Martín J., Moya B., Jiménez M. (2015). Factores nutricionales en la prevención de la osteoporosis. *Nutrición Hospitalaria*. 32: 49-55.
109. Martino A., Pavelkova A., Maciulyte S., Budriene S., Sedlarik V. (2016). Polysaccharide based nanocomplexes for co-encapsulation and controlled release of 5-fluorouracil and temozolomide. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 92: 276-286.
110. Matos G.S., Pereira S.G., Genisheva Z.A., Gomes A.M., Teixeira J.A., Rocha C.M.R. (2021). Advances in extraction methods to recover added-value compounds from seaweeds: Sustainability and Functionality. *Foods*. 10: 516- <https://doi.org/10.3390/foods10030516>.
111. McClements D.J. (2004). Protein-stabilized emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 3: 305-313.
112. Medina-Torres L., Brito-De la Fuente E., Torrestiana-Sanchez B., Katthain R. (2000). Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids*. 14: 417-424.
113. Mendoza-Ávila M., Gutiérrez-Cortez E., Quintero-García M., Del Real A., Rivera-Muñoz, Ibarra-Alvarado E., Rubio C., Jiménez-Mendoza D., Rojas-Molina I. (2020). Calcium bioavailability of *Opuntia ficus indica* at different maturity stages in growing rats. *Nutrients*. doi: 10.3390/nu12113250.
114. Mierczyńska J., Cybulska J., Sołowiej B., Zdunek A. (2015). Effect of Ca²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. *Carbohydrates Polymers*. 133: 547–555.
115. Milledge J., Heaven S. (2011). Disc stack centrifugation separation and cell disruption of microalgae: A technical note. *Environment and Natural Resources Research*. 1: 17-24.
116. Missaoui M., D'Antuono I., D'Imperio M., Linsalata V., Buokhchina S., Logrieco A., Cardinali A. (2020). Characterization of micronutrients,

- bioaccessibility and antioxidant activity of prickly pear cladodes as functional ingredient. *Molecules*. 2176: 2-14.
117. Monrroy M., García E., Ríos K., Renán J. (2017). Extraction and physicochemical of mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *Journal of Chemistry*. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/4301901>.
118. Munir H., Shahid M., Anjum F., Mudgil D. (2016). Structural, thermal and rheological characterization of modified *Dalbergia sisoo* gum-A medicinal gum. *International Journal of Macromolecules*. 84: 236-245.
119. Nieto L., Zamora E., Reséndiz A., Camacho S., Espinosa J., Torres R., Aguilar G., Loreto U., Roque I., González R. (2012). Consideraciones epidemiológicas de las fracturas del fémur proximal. *Mediagraphic*. 8: 135-139.
120. NIH National Institutes of Health. (2013). Calcium: dietary supplement fact sheet. Office of Dietary Supplements. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-HealthProfessional/>. Fecha de consulta: 18 de septiembre de 2017.
121. Nishinari K., Kohyama K., Kumagai H., Funami T., Bourne M. (2013). Parameters of texture profile analysis. *Food Sciences Technology Research*. 19: 519-521.
122. NOF National Osteoporosis Foundation. (2014). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. <https://cdn.nof.org/wp-content/uploads/2016/01/995.pdf>. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2017.
123. Nowrouzi I., Mohammadi A., Manshad K. (2020). Characterization and likelihood application of extracted mucilage from *Hollyhocks* plant as a natural polymer in enhanced oil recovery process by alkali-surfactant-polymer (ASP) slug injection into sandstone oil reservoirs. *Journal of Molecular Liquids*. 320: 114445.
124. Otálora M., Carriazo J., Iturriaga L., Nazareno A., Osorio C. (2015). Microencapsulation of betalains from cactus fruit (*Opuntia ficus indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*. 187: 174-181.

125. Pelleg M. (2019). The instrumental texture profile analysis revisited. *Journal of Texture Studies*. 50: 262-268.
126. Pérez O., David-Birman T., Kesselman E., Levi-Tal S., Lesmes U. (2014). Milk protein-vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on *in vitro* gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids*. 38: 40-47.
127. Perrotta V., Arambarri A. (2018). Cladodes anatomy of *Opuntia* (Cactaceae) from province of Buenos Aires (Argentina). *Biological Society Argentine Botanical*. 53: 345-357.
128. Pescuma M., Valdez G., Mozzi F. (2015). Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99: 6183-6196.
129. Quintero-García M., Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina A., Mendoza-Ávila M., Del Real A., Rubio E., Jiménez-Mendoza D. y Rojas-Molina I. (2020). Calcium bioavailability of *Opuntia ficus-indica* cladodes in an ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Nutrients*. doi:10.3390/nu12051431.
130. Quintero-García M., Gutiérrez-Cortez E., Bah M., Rojas-Molina A., Cornejo-Villegas M.A., Del Real A., Rojas-Molina I. (2021). Comparative analysis of the chemical composition and physicochemical properties of the mucilage extracted from fresh and dehydrated *Opuntia ficus indica* cladodes. *Foods*. 10: 2137, doi.org/10.3390/foods10092137.
131. Quinzio C., Ayunta C., Alancay M., López de Mishima B., Iturriaga L. (2017) Physicochemical and rheological properties of mucilage extracted from *Opuntia ficus indica* (L. Miller). Comparative study with guar gum and xanthan gum. *Food Measurements*. 12: 459-470.
132. Quirino-Barreda C.T. (2021) Sistemas hidrocoloides, coacervación simple, coacervación compleja y acuasomas. Notas de curso, UAMX.
133. Raei M., Rafe A., Shahidi F. (2018). Rheological and structural characteristics of whey protein-pectin complex coacervates. *Journal of Food Engineering*. 228: 25-31.

134. Ramírez J., Solís C., Vélez C. (2018). Membrane technology: obtaining whey protein. *Entre Ciencia y Tecnología*. ISSN 2539-4169
135. Ramos O., Pereira R., Martins A., Rodrigues R., Fuciños C., Teixeira A., Pastrana L., Malcata F., Vicente A. (2015). Design of whey protein nanostructures for incorporation and release of nutraceutical compounds in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi: 10.1080/10408398.2014.993749.
136. Rani B., Kawatra A. (1994). Fiber constituents of some foods. *Plants Foods Human Nutrition*. 45: 343-347.
137. Rao A.M. (2013). Flow and Functional Models for Rheological Properties of Fluid Foods. En: *Rheology of Fluid, Semisolid, and Solid Foods, Principles and Applications*, 3^{ra} ed.; Barbosa-Cánovas, G.V., Ed.; Springer; N.Y., USA, pp. 27-61.
138. Ravindran S., Williams M., Gillies W. (2017). Understanding how the properties of whey protein stabilized emulsions depend on pH, ionic strength and calcium concentration, by mapping environmental conditions to zeta potential. *Food Hydrocolloids*. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.003>
139. Rodríguez-González S., Martínez-Flores H., Chávez-Moreno C., Macías-Rodríguez L., Zavala-Mendoza E., Garnica-Romo M., Chacón-García, L. (2014). Extraction and characterization of mucilage from wild species of *Opuntia*. *Journal Food Process Engineering*. 4: 285-292.
140. Rodzik A., Pomastowski P., Sagandykova G., Buszewski B. (2020). Interactions of whey proteins with metal ions. *International Journal of Molecular Sciences*. 21: 2156- doi:10.3390/ijms21062156.
141. Rojas-Molina I., Gutiérrez-Cortez E. Bah M., Rojas-Molina A., Ibarra-Alvarado C., Rivera-Muñoz E., Del Real A., Aguilera-Barreiro M.A. (2015). Characterization of Calcium Compounds in *Opuntia ficus indica* as a Source of Calcium for Human Diet. *Journal of Chemistry*. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/710328>.
142. Rosland S., Yusof Y., Chin N., Chang Lee., Ghazali H., Ghani M., Ishak I. (2020) The effect of particle size on the physical properties of arabic gum

- powder. *Journal of Foods Processing Engineering*. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13368>
143. Sáez V., Hernáez E., Agulo L., Katime I. (2004). Liberación controlada de fármacos: Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 5: 87-101.
 144. Sánchez C., Mekhloufi G., Renard D. (2006). Complex coacervation between β -lactoglobulin and *Acacia* gum: A nucleation and growth mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*. 299: 867-873.
 145. Sepúlveda E., Sáenz C., Aliaga E., Aceituno C. (2007). Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia spp.* *Journal of Arid Environments*. 68: 534-545.
 146. Silva H., Acevedo E., Silva P. (2001). Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. *Revista de Chile Historia Natural*. 2: 341-351.
 147. Sing C. (2016). Development of the modern theory of polymeric complex coacervation. *Advances in Colloid and Interface Science*. doi: 10.1016/j.cis.2016.04.004.
 148. Sing C.E., Perry S.L. (2020). Recent progress in the science of complex coacervation. *Soft Matter*. 1: 2-34.
 149. Singh S., Bothara S. (2014). Morphological, physico-chemical and structural characterization of mucilage isolated from the seeds of *Buchanania lanzan* Spreng. *International Journal Public Health*. 3: 33-39.
 150. Spotti M., Perduca M., Piagentini A., Santiago L., Rubiolo A., Carrara C. (2013). Gel mechanical properties of milk whey proteinedextran conjugates obtained by Maillard reaction. *Food Hydrocolloids*. 31: 26-32.
 151. Steet J., Tong C. (1996). Quantification of color change resulting from pheophytinization and nonenzymatic browning reactions in thermally processed green peas. *Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1531-1537.
 152. Tai A., Bianchini R., Tachowicz J. (2014). Texture analysis of cosmetic, pharmaceutical raw materials and formulations. *International Journal Cosmetic Science*. 36: 291-304.

153. Tella S., Gallagher J. (2014). Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 142: 155-170
154. Toit A., De Wit M., Fouché H., Venter L., Hugo A. (2020). Relationship between weather conditions and the physicochemical characteristics of cladodes and mucilage from two cactus pear species. *PLoS one*. 15: e0237517.
155. Toit A., Wit M., Arno H. (2018). Cultivar and harvest month influence the nutrient content of *Opuntia* spp. cactus pear cladode mucilage extracts. *Molecules*. 23: 2-12.
156. Tovar X., Arana A., Téllez A., Abreu A., Muro C. (2012). Traditional methods for whey protein isolation and concentration: Effects on nutritional properties and biological activity. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 56: 369-377.
157. Trachtenber S., Mayer A. (1982) Biophysical properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Phytochemistry*. 21: 2835-2843.
158. Turgeon S., Beaulieu M. (2001). Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*. 15: 583-591.
159. Veldurthy V., Wei R., Oz L., Dhawan P., Jeon Y., Christakos S. (2016). Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Research*. doi:10.1038/boneres.2016.41.
160. Ventura-Aguilar R.I., Bosquez-Molina E., Bautista-Baños S., Rivera-Cabrera F. (2017). Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): Anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. *Journal of Sciences Food Agriculture*. 97: 5065-5073.
161. Wagoner T., Bongkosh V., Foegeding E. (2016). Protein-Polysaccharide particles for colloidal stability. *Journal of Food Science and Technology*. 7: 93-116.
162. Xiao-Li D., Yan Z., Wong M. (2014). Estrogen deficiency-induced Ca balance impairment is associated with decrease in expression of epithelial Ca transport proteins in aged female rats. *Life Sciences*. 96:26-32.

- 163.Xue S., Shao S., Guo M. (2016). Ultrasound-induced changes in physical and functional properties of whey proteins. *Food Science Technology*. 52: 381-388.
- 164.Ye A. (2008). Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interactions: principles and applications- a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 43: 406-415.
- 165.Yilmaz, C.; Gökmen, V. Chlorophyll. En Encyclopedia of Food and Health, 1^a ed.; Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2016; pp. 37–41.
- 166.Zambrano-Zaragoza M., Gutiérrez-Cortez E., Del Real A., Ricardo M., González-Reza R., Galindo-Pérez J., Quintanar-Guerrero D. (2014). Fresh-cut Red Delicious apples coating using tocopherol/mucilage nanoemulsion: Effect of coating on polyphenol oxidase and pectin methylesterase activities. *Food Research International*. 62: 974-983.
- 167.Zhang J., Liu X., Subirade M., Zhou P., Liang L. (2014). A study of multi-ligand beta-lactoglobulin complex formation. *Food Chemistry*. 165:256-261.
- 168.Zhu K., Prince R. (2012). Calcium and bone. *Clinical Biochemistry*. 45: 936-942.
- 169.Zohuriaan M., Shokrolahi F. (2004). Thermal studies on natural and modified gums. *Polymers Test*. 23: 575-579.