



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Composición química, propiedades reológicas y evaluación citotóxica del mucílago de *Quararibea funebris* (Llave) Vischer (Bombacaceae)

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. en Química Alexander Dueñas Deyá

Asesor: Dr. Andrés Navarrete Castro
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, septiembre de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Composición química, propiedades reológicas y evaluación citotóxica del mucílago de *Quararibea funebris* (Llave) Vischer (Bombacaceae)

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. en Química Alexander Dueñas Deyá



Ciudad de México, septiembre de 2023

Jurado asignado

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dr. Luis Medina Torres
Vocal	Dr. Gerardo Leyva Gómez
Vocal	Dra. Berenice Ovalle Magallanes
Secretario	Dr. Josué Arturo Velázquez Moyado

Asesor: Dr. Andrés Navarrete Castro

Sustentante: Q. Alexander Dueñas Deyá

Lugar donde se realizó el presente trabajo de investigación

Laboratorio 126, Conjunto E, Departamento de Farmacia,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías por el financiamiento otorgado durante la realización de mis estudios de maestría (número de becario 1156298).

Al financiamiento otorgado por los proyectos PAIP 5000-9143 de la Facultad de Química, PAPIITIN203122 de DGAPA-UNAM, y el Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología A1-S9698.

A la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica adquirida durante este tiempo.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por la excelente asesoría brindada desde el inicio de este proyecto. Su experiencia, dedicación y orientación fueron fundamentales para el éxito de este trabajo.

Al Dr. Luis Medina Torres por su invaluable ayuda y apoyo en la realización de los experimentos reológicos.

A la Dra. Citlaly Gutierrez, cuya experticia en las pruebas biológicas ha sido una guía invaluable que ha enriquecido significativamente los resultados de este estudio.

Al Dr. José Luis Balderas López por su ayuda técnica en los procedimientos de laboratorio.

A la Mtra. Jéssica Amacosta perteneciente a la USAII por la ayuda brindada en la adquisición de los espectros de masas y procedimientos cromatográficos.

A los miembros del jurado por sus valiosas sugerencias durante la revisión de este trabajo.

Y finalmente, a la familia Ramos-Nava por todo el cariño que me han transmitido desde que llegué a México, el cual se ha reflejado en este proyecto.

Índice

1.	Introducción.....	1
2.	Marco teórico	2
2.1.	<i>Quararibea funebris</i> . Características.....	2
2.1.1.	Descripción del género <i>Quararibea</i> (Bombacaceae).	2
2.1.2.	Caracterización botánica de <i>Quararibea funebris</i> (Llave) Vischer (Bombacaceae).	2
2.1.3.	Usos etnobotánicos de <i>Q. funebris</i>	3
2.1.4.	Fitoquímica de <i>Q. funebris</i>	4
2.2.	Polisacáridos.....	4
2.1.5.	Mucílagos. Química estructural	5
2.2.1.	Métodos de aislamiento de mucílagos.....	6
2.2.2.	Caracterización química de mucílagos.....	7
2.2.2.1.	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (CLAR)	7
2.2.2.2.	Cromatografía de Gases	9
2.2.2.3.	Espectroscopía Infrarroja	10
2.3.	Reología de polisacáridos	10
2.3.1.	Modelos reológicos.....	11
2.3.2.	Efecto de la concentración sobre la viscosidad	12
2.3.3.	Efecto de la temperatura sobre la viscosidad.....	13
2.3.4.	Efecto del pH y la fuerza iónica sobre la viscosidad.....	14
2.3.5.	Propiedades viscoelásticas	16
2.3.5.1.	Propiedades elásticas. El efecto Weissenberg	17
2.4.	Actividades biológicas de mucílagos	19
2.5.	Citotoxicidad	20
2.5.1.	Métodos de evaluación de citotoxicidad	22
2.5.1.1.	Ensayos de exclusión de colorantes	22
2.5.1.2.	Ensayos colorimétricos	23
2.5.1.3.	Ensayos de apoptosis celular	24
2.5.1.4.	Ensayos fluorométricos.....	24
2.5.1.5.	Ensayos luminométricos	25
2.5.2.	Citotoxicidad de mucílagos	26
3.	Hipótesis y objetivos	28
3.1.	Hipótesis.....	28

3.2.	Objetivos	28
4.	Materiales y métodos.....	29
4.1.	Material vegetal.....	29
4.2.	Aislamiento y purificación del mucílago de <i>Q. funebris</i>	29
4.3.	Determinación de la composición del mucílago de <i>Q. funebris</i>	29
4.3.1.	Análisis mediante Espectroscopía Infrarroja	29
4.3.2.	Análisis mediante CG-EM	29
4.4.	Estudio de las propiedades reológicas del mucílago de <i>Q. funebris</i>	30
4.4.1.	Mediciones reológicas.....	30
4.4.2.	Estimación del peso molecular promedio.....	31
4.5.	Evaluación citotóxica del mucílago de <i>Q. funebris</i>	31
5.	Resultados y discusión.....	33
5.1.	Composición química del mucílago de <i>Q. funebris</i>	33
5.1.1.	Análisis mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	33
5.1.2.	Análisis mediante CG-EM.....	34
5.2.	Estudio de las propiedades reológicas del mucílago de <i>Q. funebris</i>	39
5.2.1.	Peso molecular promedio del mucílago de <i>Q. funebris</i>	39
5.2.2.	Mediciones de flujo de cizalla	39
5.2.2.1.	Efecto de la concentración sobre la viscosidad.....	39
5.2.2.2.	Efecto de la temperatura sobre la viscosidad	41
5.2.2.3.	Efecto del pH sobre la viscosidad.....	43
5.2.2.4.	Efecto de la fuerza iónica sobre la viscosidad.....	44
5.2.2.5.	Propiedades elásticas al flujo de cizalla simple	45
5.2.3.	Mediciones de flujo oscilatorias.....	46
5.2.3.1.	Efecto de la concentración.....	46
5.2.3.2.	Efecto de la temperatura	48
5.3.	Efecto citotóxico del mucílago de <i>Q. funebris</i>	49
6.	Conclusiones.....	55
7.	Perspectivas y recomendaciones	56
	Referencias bibliográficas.....	57

Lista de figuras

Figura 1: Distribución geográfica de *Quararibea funebris*.

Figura 2: Árbol de *Q. funebris* y sus inflorescencias.

Figura 3: Principales constituyentes de los mucílagos.

Figura 4: Procedimiento general para la obtención de mucílagos de plantas.

Figura 5: Representación esquemática del efecto de la concentración en una suspensión polimérica.

Figura 6: Proceso de ionización de una pectina tipo homogalacturano.

Figura 7: Modelos matemáticos del comportamiento viscoso, elástico y viscoelástico.

Figura 8: Efecto Weissenberg en un fluido no Newtoniano.

Figura 9: Métodos *in vitro* para la determinación de citotoxicidad.

Figura 10: Estructura del colorante azul de tripano y tinción de células no viables bajo un hemocitómetro.

Figura 11: Aspecto físico del mucílago de *Q. funebris*.

Figura 12: Espectro FTIR-ATR del mucílago de *Q. funebris*.

Figura 13: Cromatograma de gases del mucílago de *Q. funebris* después de hidrólisis ácida y sililación.

Figura 14: Espectros de masas por impacto electrónico de carbohidratos-TMS del mucílago de *Q. funebris*.

Figura 15: Efecto de la concentración en la viscosidad de soluciones acuosas de mucílago a 25°C.

Figura 16: Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de soluciones acuosas de mucílago. Datos a velocidad de cizalla = 30 s⁻¹.

Figura 17: Efecto del pH sobre la viscosidad de una solución de mucílago al 0.5 %. Datos a 25 °C y a $\dot{\gamma} = 30 \text{ s}^{-1}$.

Figura 18: Efecto de la fuerza iónica sobre la viscosidad de una solución de mucílago al 0.5 %. Datos a 25 °C.

Figura 19: Diferencia normal de estrés primario en función del estrés de cizalla y la concentración del mucílago.

Figura 20: Dependencia del módulo de almacenamiento G' (símbolos vacíos) y pérdida G'' (símbolos llenos) de la frecuencia para diferentes concentraciones de mucílago. Símbolos llenos G'' . Datos a 25 °C.

Figura 21: Efecto de la temperatura sobre el módulo dinámico de una solución de mucílago al 3.0 %.

Figura 22: Cambios morfológicos en células HEK-293 tras exposición al mucílago de *Q. funebris* por 48 horas y a diferentes concentraciones

Figura 23: Efecto del mucílago de *Q. funebris* sobre la viabilidad celular de células HEK-293 incubadas por 48 horas.

Lista de tablas

Tabla 1: Composición de distintos mucílagos de plantas.

Tabla 2: Modelos reológicos de correlación de viscosidad de cizalla.

Tabla 3: Composición del mucílago de *Q. funebris* basado en derivados TMS.

Tabla 4: Parámetros n y k de soluciones de mucílagos al 1.0 % a 25 °C.

Tabla 5: Valores de energía de activación al flujo para diferentes biopolímeros.

Lista de esquemas

Esquema 1: Reacción de derivatización de monosacáridos con 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) para su análisis mediante CLAR.

Esquema 2: Mecanismo de reacción genérico en la obtención de derivados de trimetilsilicio (TMS).

Esquema 3: Tensor de estrés en la cizalla de dos planos paralelos.

Esquema 4: Reducción del MTT a formazán por las células viables.

Esquema 5: Reducción de la rezazurina a resorufina altamente fluorescente.

Esquema 6: Reacción de la luciferina con el ATP celular y catalizada por la luciferasa.

Esquema 7: Mecanismo de fragmentación propuesto para la formación del ion m/z 204 en derivados TMS de carbohidratos.

Esquema 8: Mecanismo de fragmentación propuesto para la formación del ion m/z 217 en derivados TMS de carbohidratos.

Esquema 9: Formación del ion m/z 437 a partir del derivado TMS de la glucosa.

Lista de abreviaturas

T	Temperatura
R	Constante universal de los gases
Ea	Energía de activación al flujo
η_{∞}	Viscosidad a temperatura infinita
I	Fuerza iónica
N₁	Primera diferencia de esfuerzo normal
N₂	Segunda diferencia de esfuerzo normal
$\dot{\gamma}$	Velocidad de cizalla
τ	Estrés de cizalla
η	Viscosidad
k	Índice de consistencia de flujo
n	Índice de comportamiento de flujo
G´	Módulo de almacenamiento
G´´	Módulo de pérdida
CLAR	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
UV-Vis	Ultravioleta-visible
CG	Cromatografía de Gases
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
M⁺	Ion molecular
TMS	Trimetilsilicio
FTIR-ATR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier y Reflectancia Total

	Atenuada
SA	Solución amortiguadora
HEK-293	Células de riñón de embrión humano
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
CMC	Carboximetilcelulosa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio
CL₅₀	Semiconcentración letal máxima

Resumen

Quararibea funebris (Llave) Vischer (Bombacaceae) es una planta originaria de México, aunque en la actualidad se encuentra ampliamente distribuida por Centroamérica. La etnobotánica de esta planta se encuentra entrelazada a la bebida prehispánica llamada “tejate”, pues sus flores además de endulzar le otorgan una consistencia ligeramente espesa a la bebida, la cual se atribuye a la presencia de mucílago en ellas. No existen reportes acerca de las características de este material mucilaginoso ni su seguridad, por lo que fue el objetivo del trabajo desarrollado. El mucílago aislado mediante decocción acuosa de las flores y posterior precipitación con etanol absoluto, fue hidrolizado y analizado mediante CG-EM. El mucílago mostró estar conformado principalmente por unidades de ramnosa, xilosa, galactosa, glucosa y ácido galacturónico. Las propiedades reológicas fueron estudiadas en orden de caracterizar el comportamiento de este material. La viscosidad de sus soluciones, en un rango de concentraciones de 0.5-3.0 % (m/m), mostró que fue dependiente de la concentración y la temperatura, mostrando un comportamiento de un fluido no Newtoniano del tipo adelgazante al flujo. Además, la viscosidad fue dependiente de la fuerza iónica del medio, siendo afectada en mayor grado por cationes divalentes que monovalentes. También el pH ejerció un efecto, aunque en menor medida sobre la viscosidad, disminuyendo tanto en regiones ácidas que en alcalinas. Por otra parte, las propiedades elásticas al flujo se evaluaron a través de la primera diferencia de esfuerzo normal de estrés primario, mostrando comportamientos similares a los de polímeros de importancia comercial. El espectro mecánico dinámico de pequeña amplitud de deformación mostró la evolución de los módulos dinámicos (G' y G'') en un rango de temperaturas de 15-45 °C, así como la influencia de la concentración. A bajas concentraciones de mucílago (< 3.0 %) el comportamiento es fundamentalmente viscoso y típico de un líquido viscoelástico. Con el incremento de la concentración, la solución tiende a adoptar un comportamiento tipo gel débil. Por otro lado, el mucílago estudiado mostró citotoxicidad en células HEK-293 de una manera concentración dependiente, con una $CL_{50} = 1.51 \pm 0.30$ mg/ml, siendo potencialmente citotóxico a concentraciones ≥ 0.63 mg/ml. Este tipo de estudios es de suma importancia en la aplicación del mucílago como un agente espesante en la industria química.

Abstract

Quararibea funebris (Llave) Vischer (Bombacaceae) is a plant native to Mexico, although it is currently widely distributed throughout Central America. The ethnobotany of this plant is intertwined with the pre-Hispanic drink called "tejate", whose flowers, in addition to sweetening, give the drink a slightly thick consistency, which is attributed to the presence of mucilage in them. There are no reports about the characteristics of this mucilaginous material or its safety, so it was the objective of the work developed. The mucilage isolated by aqueous decoction of the flowers and subsequent precipitation with absolute ethanol, was hydrolyzed and analyzed by GC-MS. The mucilage was constituted by mainly of rhamnose, xylose, galactose, glucose and galacturonic acid units. The rheological properties were studied in order to characterize the behavior of this material. The viscosity of their solutions, in a concentration range of 0.5-3.0 % (w/v), showed that it was dependent on concentration and temperature, showing a non-Newtonian shear-thinning behavior. Furthermore, the viscosity was dependent on the ionic strength of the medium, being affected to a greater degree by divalent than monovalent cations. The pH also exerted an effect, although to a lesser extent on the viscosity, decreasing both in acid and alkaline regions. On the other hand, the elastic properties to flow were evaluated through the first normal stress difference of primary stress, showing behaviors similar to those of commercially important polymers. The dynamic mechanical spectrum of small strain amplitude showed the evolution of the dynamic moduli (G' and G'') in a temperature range of 15-45 °C, as well as the influence of concentration. At low concentrations of mucilage (<3.0%) the behavior was fundamentally viscous and typical of a viscoelastic liquid. With increasing concentration, the solution tends to adopt a weak gel-like behavior. On the other hand, the mucilage studied showed cytotoxicity in HEK-293 cells in a concentration-dependent manner, with a $LC_{50} = 1.51 \pm 0.30$ mg/ml, being potentially cytotoxic at concentrations ≥ 0.63 mg/ml. This type of study is extremely important in the application of mucilage as a thickening agent in the chemical industry.

1. Introducción

Los hidrocoloides naturales como gomas y mucílagos son un grupo diverso de polímeros hidrofílicos con alto peso molecular, los cuales tienen la característica de ser altamente dispersivos, solubles en agua y muestran la tendencia a hincharse en este medio, produciendo sistemas coloidales con diferentes estructuras. El término *hidrocoloide alimenticio* incluye todos los polisacáridos que son usados globalmente en la industria alimentaria para regular y controlar dicho estado coloidal [1]. La principal razón detrás del amplio uso de los hidrocoloides en alimentos es su capacidad para modificar la reología del medio en el que se encuentran, esto debido a la presencia de una gran cantidad de grupos hidroxilo en su estructura y la afinidad de estos a formar interacciones por puente de hidrógeno con el agua, lo que conlleva a una variación en las propiedades reológicas [2]. La industria farmacéutica también ha puesto su interés en gomas y mucílagos debido a sus diversas aplicaciones como diluyentes, aglutinantes, agentes espesantes en líquidos orales, coloides protectores en suspensiones y agentes gelantes. Las gomas y mucílagos naturales tienen muchos méritos por encima a los polímeros sintéticos debido a su biocompatibilidad, precio y disponibilidad [3].

Quararibea funebris (Bombacaceae) es una planta originaria de México, aunque en la actualidad se le puede encontrar en otros países. A las flores se le conoce popularmente como rosita de cacao, la cual ha sido usada desde tiempos prehispánicos por los indios Zapotecos de Oaxaca, México como un aditivo de la bebida tradicional a base de maíz, cacao y semilla de mamey llamada “tejate” [4]. La adición de las flores de esta planta a la bebida, además de darle sabor y aroma, le otorga una consistencia ligeramente espesa, por lo que es un ingrediente clave para su elaboración.

En el presente trabajo se aisló y caracterizó, química y reológicamente el mucílago de flores de *Q. funebris*, además de evaluarse su citotoxicidad frente a células HEK-293. Los resultados obtenidos constituyen aportes novedosos a la fitoquímica del género y de igual manera sienta las bases para futuras aplicaciones e investigaciones de este nuevo material dentro de la industria farmacéutica y alimentaria.

2. Marco teórico

2.1. *Quararibea funebris*. Características.

2.1.1. Descripción del género *Quararibea* (Bombacaceae).

Quararibea es un género neotropical que en la actualidad está ubicado dentro de Malvoideae, una de las nueve subfamilias ahora reconocidas en las Malvaceae. Tradicionalmente, este género había sido considerado en la familia Bombacaceae; sin embargo, estudios posteriores han concluido que Bombacaceae no es un grupo monofilético, sino que forma parte de la muy diversa familia Malvaceae. De las 14 especies de *Quararibea* reconocidas para Mesoamérica, en México se localizan: *Q. funebris* (La Llave) Vischer subsp. *funebris*, de distribución amplia (Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Veracruz, Quintana Roo y en Centroamérica hasta Costa Rica), *Q. yunckeri* subsp. *sessiliflora* Miranda ex W.S. Alverson (Chiapas y Veracruz), *Q. yunckeri* subsp. *veracruzana* W. S. Alverson (Veracruz), *Quararibea* sp. (una especie aún no descrita formalmente, como *Q. lacandonensis*, de Chiapas, Tabasco y Guatemala), *Quararibea lopezperaltae* y *Quararibea mayarum* (Istmo de Tehuantepec) [5], ver Figura 1.



Figura 1: Distribución geográfica de *Q. funebris*. Tomado de <https://www.gbif.org/es>

2.1.2. Caracterización botánica de *Quararibea funebris* (Llave) Vischer (Bombacaceae).

La historia taxonómica del género *Quararibea* es compleja, donde estuvo unido a *Matisia* y *Myrodia* durante algún tiempo, hasta que en 1954 Cuatrecasas concluyó que se trataban de géneros diferentes [6].

Quararibea funebris es un árbol perennifolio que llega a alcanzar hasta 25-30 m de altura. Posee un tronco recto con diámetro de hasta 60 cm, con copa irregular, ramas en verticilios horizontales y ramificados monopódicamente, su corteza es lisa en individuos jóvenes y escamosa en los adultos. Sus hojas son simples, alternas o en espiral, con pecíolo de hasta 2 cm de largo, pulvinus en la mitad cercana a la lámina, lámina de forma elíptica, oblonga u obovada con márgenes enteros, ápice agudo o acuminado, base obtusa a truncada o aguda,

haz de color verde oscuro y envés de color verde pálido, pelos estrellados en las nervaduras de las axilas del envés. Las flores se encuentran solitarias o en grupo opuestas a las hojas, con pedúnculo de 1-2 cm, actinomorfas de 4-4.5 cm de largo, cáliz verde tubular de 1.5-2 cm de largo con 4-5 lóbulos triangulares, 5 pétalos blancos de 4 cm de longitud largamente espatulados o lineales, ápices redondeados, tubo estaminal de 3-3.5 cm de largo fusionado al estilo y tubo estaminal estrellado pubescente, ovario semiínfero, bilocular, lóculos biovulares, estilo más largo que el tubo estaminal. Flores muy fragantes, floración de agosto a octubre, fruto de drupa fibrosa, en forma ovoide de 3-4 cm de largo y 3 cm de ancho, moreno oscuro, cáliz acrescente, teniendo de 1-4 semillas, maduración entre septiembre y noviembre [7]. En la Figura 2 se pueden observar algunos detalles de la planta.

Esta planta se conoce por diversos nombres según la región geográfica, siendo los más comunes: rosita de cacao, flor de cacao, cacahoaxochitl, molinillo, palo copado, rosital, palo volador [8].



Figura 2: Árbol de *Q. funebris* (izquierda, tomado de internet) y sus inflorescencias (derecha, autoría propia)

2.1.3. Usos etnobotánicos de *Q. funebris*

El uso de esta planta se remonta a tiempos prehispánicos, donde los habitantes locales de la villa de Izúcar, cerca de Puebla, acostumbraban a realizar ritos funerarios debajo de las ramas de árboles de *Q. funebris*. Esta creencia quizás estuviera relacionada con el hecho de que fuera una planta con hojas verdes la mayor parte del año, y es común en las sociedades primitivas que se asociara el concepto de vida eterna con árboles de estas características [9].

Probablemente el uso fundamental de esta especie en la actualidad es con carácter comercial y está relacionado con la elaboración de la bebida tradicional llamada “tejate”, en la que se usan sus flores secas mezcladas con maíz, cacao y semilla de mamey. Las flores de *Q. funebris*, además de otorgarle sabor a la bebida, hacen que la preparación adquiera una consistencia ligeramente espesa debido a la presencia de mucílago, por lo que su incorporación se considera clave en la manufactura de este producto artesanal. Las partes componentes de la flor se pueden separar fácilmente y suelen comerse crudos, en forma de aperitivo. También se suele fumar de manera conjunta con el tabaco y agregarse en tabletas

de chocolate artesanales. Dentro de la medicina herbolaria mexicana, se le atribuyen varios usos terapéuticos: los frutos se usan para controlar y aliviar la fiebre, las flores pueden ser usadas en el tratamiento de la ansiedad y para regular la menstruación. En la región de Oaxaca, un remedio popular para la tos consiste en beber una decocción hecha con cinco flores de “rosita de cacao” y una rama de canela en medio litro de agua hirviendo [7, 9].

Hasta el momento, no existen evidencias científicas reportadas que sustenten los usos de esta planta.

2.1.4. Fitoquímica de *Q. funebris*

Los metabolitos secundarios en las plantas son los responsables de que los productos obtenidos de ellas ejerzan su acción terapéutica. En las flores de *Q. funebris* se reporta en el extracto hexánico la presencia de alcanos de alto peso molecular, predominantemente C₂₅-C₂₇ y C₂₉, los ésteres etílicos de los ácidos linoleicos y linolénico, β-sitosterol y estigmasterol esterificado con ácidos grasos C₁₆ y C₁₈. Del extracto metanólico se reporta la presencia de 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona, el cual resulta ser el principio odorífero de la planta. Además, del extracto etanólico fueron también aisladas dos aminolactonas relacionadas, la 3-amino-4,5-dimetil-2(5H)-furanona y su análogo saturado [10]. La presencia de estas butirolactonas pudiera ser la causa del uso etnomédico de la planta asociado a efectos sobre el sistema nervioso central, ya que diversos estudios han evidenciado los efectos sedantes del ácido γ-hidroxibutanoico y sus derivados sobre este sistema [11, 12]. Algunos compuestos nitrogenados se han reportado también en las flores, como los alcaloides funebrina, funebral y funebradiol, así como el aminoácido 2S, 3S, 4R-4-hidroxileucina, el cual se considera que da origen a los alcaloides anteriores. De la fracción acuosa se lograron identificar en grandes cantidades los carbohidratos conocidos como glucosa, fructosa y sacarosa, lo cual sugiere que la utilización de esta flor en la preparación del tejate tenía además el propósito de dulcificar la bebida [13-15].

Se ha reportado, la presencia de mucílago en las flores de esta planta [6], sin embargo, no existe un estudio sobre el aislamiento y caracterización de esta fracción, dejando un espacio para la búsqueda de un nuevo polisacárido con propiedades de interés para la industria alimentaria y farmacéutica.

2.2. Polisacáridos

Los polisacáridos son carbohidratos complejos, compuestos por la repetición de unidades (monosacáridos o disacáridos) que se encuentran unidas mediante enlaces glicosídicos, por lo que se consideran polímeros de condensación. De manera convencional se clasifican en dos grupos: gomas y mucílagos.

El término goma es usado para describir a los exudados naturales de plantas, estos fluyen lentamente de los troncos y ramas de los árboles y se endurecen al estar expuestos al aire. Las gomas son producidas por las plantas como un mecanismo de defensa ante una herida o daño provocado al vegetal, por ejemplo, la goma arábica (*Acacia* spp.), goma karaya (*Sterculia* spp.), o también pueden ser extraídos de algunas semillas como la goma guar (*Cyamopsis tetragonolobus*), entre otros [16].

Por otra parte, los mucílagos no son producidos por un daño físico o ambiental a la planta, sino que constituyen productos normales del metabolismo secundario de algunos organismos, considerándose productos fisiológicos y estando presentes en muchas plantas [17].

2.1.5. Mucílagos. Química estructural

Los mucílagos son biopolímeros pertenecientes al grupo de los hidrocoloides. Desde una perspectiva química, están conformados por unidades de monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos, pudiendo estar el átomo terminal de carbono oxidado (opuesto al lado del carbonilo) y presentándose como ácidos urónicos. Los componentes más comunes encontrados en los mucílagos son L-ramnosa, D-galactosa, D-glucosa, D-xilosa, ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico, ver Figura 3 [18, 19].

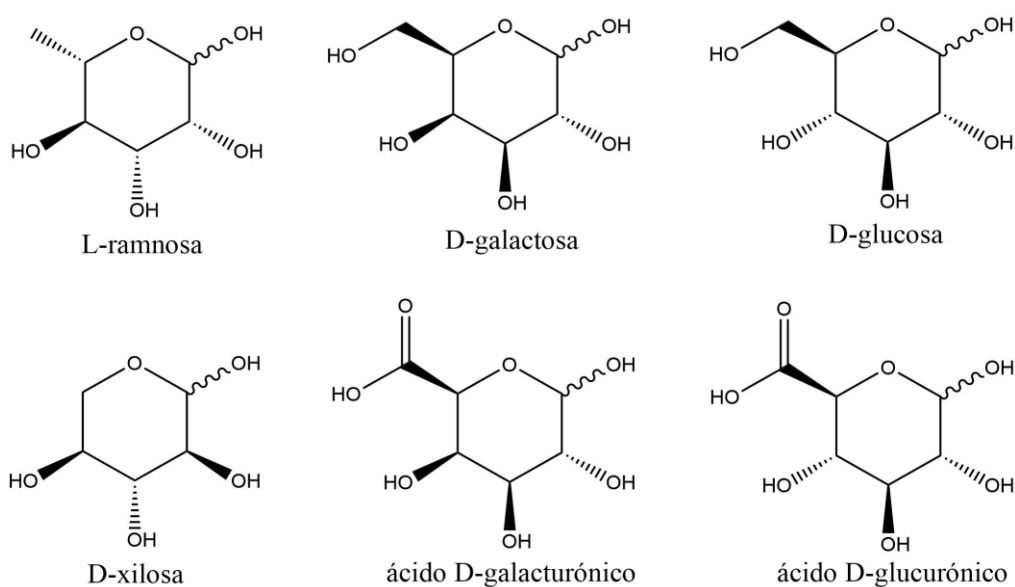


Figura 3: Principales constituyentes de los mucílagos

Además de los polisacáridos, los mucílagos de plantas pueden llegar a contener proteínas, lípidos y minerales. Aunque el contenido proteico generalmente es minoritario, contribuye a la capacidad de retención de agua de estos hidrocoloides, mientras que la presencia de moléculas de baja polaridad favorece la capacidad de retención de aceites [20]. Además, existen evidencias de que altas concentraciones proteicas mejoran la textura y la consistencia de productos que contiene mucílago [18]. En forma de trazas se pueden encontrar otros metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, esteroides y alcaloides.

La combinación de los mucílagos con el agua trae consigo la formación de soluciones muy viscosas o geles. Por la naturaleza de sus componentes, la gran cantidad de grupos hidroxilo presentes tienen el potencial de generar interacciones por puente de hidrógeno intra e intermoleculares. La fisicoquímica y las dimensiones de estas moléculas influyen en sus propiedades. Polisacáridos con el mismo peso molecular, pero de estructura lineal resultan

ser más viscosos (necesitan más espacio) que los que presentan una estructura ramificada [16].

Existen diversos estudios sobre la composición de diferentes mucílagos extraídos de distintos órganos de las plantas, como se observa en la Tabla 1, reflejando que los bloques de construcción de estos son unidades de monosacáridos y ácidos urónicos.

Tabla 1: Composición de distintos mucílagos de plantas

Nombre	Parte utilizada	Composición de mucílago	Referencia
<i>Opuntia ficus indica</i> (Nopal)	Hojas	arabinosa (44.04 %), galactosa (20.43 %), xilosa (22.13 %), ramnosa (7.02 %) y ácido galacturónico (6.38 %)	[21]
<i>Salvia hispánica</i> (Chía)	Semillas	xilosa (38.50), arabinosa (9.60 %), glucosa (19.60 %), ácido galacturónico (5.30 %) y glucurónico (18.7 %)	[22]
<i>Plantago psyllium</i> (Zaragatona)	Semillas	arabinosa (22.6 %) y xilosa (74.6%)	[23]
<i>Colocasia esculenta</i> (Taro)	Tallos	glucosa (28.20 %), galactosa (36.70 %), arabinosa (4.70 %), xilosa (2.10 %), manosa (11.80 %), ácido glucurónico (8.30 %)	[24]
<i>Linum usitatissimum</i> (Linaza)	Semillas	glucosa (11.22 %), galactosa (19.42 %), xilosa (18.38 %), ácido galacturónico (16.32 %), ramnosa (8.92 %), arabinosa (5.40 %)	[25]

2.2.1. Métodos de aislamiento de mucílagos

Los mucílagos pueden encontrarse en cualquier órgano de la planta (raíz, tallo, flores, hojas) si se tiene en cuenta que constituyen una reserva de energía y además aseguran la adecuada hidratación del vegetal. La extracción de mucílagos no resulta un procedimiento complicado, teniendo en cuenta que esencialmente comprende dos pasos sucesivos: decocción y precipitación. La maceración a temperatura ambiente constituye el método de extracción más simple, aunque el bajo rendimiento y los largos tiempos son desventajas presentes en este método. Para la obtención de mucílagos, el método consiste en poner el material vegetal en contacto con una cantidad apropiada de agua destilada caliente (generalmente hasta cubrirlo) y con agitación, adquiriendo la mezcla una viscosidad apreciable al cabo de algunos minutos. Algunos autores han reportado el uso de la maceración empleando soluciones básicas para obtener mucílagos ácidos y así incrementar el rendimiento extractivo. Tras la maceración, la solución debe filtrarse para separar el material vegetal y de manera consecutiva agregarse etanol al filtrado. El mucílago precipitado se suele liofilizar o secar en un rotavapor hasta obtener finalmente el polvo de

mucílago. Este procedimiento se puede resumir de la forma mostrada en la Figura 4 [16, 19, 25, 26].

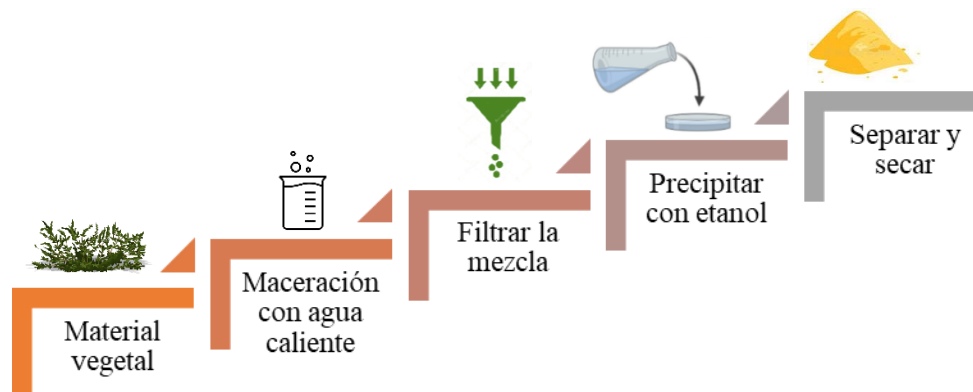


Figura 4: Procedimiento general para la obtención de mucílagos de plantas.

2.2.2. Caracterización química de mucílagos

Los monosacáridos contienen desde tres hasta siete átomos de carbono y constituyen las subunidades de moléculas de mayor tamaño como oligo- y polisacáridos. Estos compuestos se caracterizan por presentar múltiples centros quirales, lo que conlleva a la formación de varias isoformas, dentro de las cuales están enantiómeros, diastereoisómeros y epímeros. La presencia de carbohidratos y mucílagos es cada vez mayor dentro de la industria alimentaria y farmacéutica, por lo que se hace crucial la necesidad de su identificación estructural.

Para llevar a cabo los análisis de composición de mucílagos es común realizar una hidrólisis ácida del mismo, con el objetivo del romper las cadenas complejas de polisacáridos en subunidades de monosacáridos que pueden ser estudiadas de manera más sencilla. La hidrólisis química es típicamente llevada a cabo usando altas temperaturas y en presencia de un ácido fuerte como clorhídrico, sulfúrico o trifluoroacético. Bajo estas condiciones, los enlaces glicosídicos se rompen y las unidades de monosacáridos son liberadas. El tipo de ácido usado, su pH, así como la duración y temperatura de reacción son factores que pueden afectar el rendimiento de los monosacáridos [27, 28].

2.2.2.1. Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (CLAR)

La cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) se considera la técnica de análisis más efectiva para el análisis cuali- y cuantitativo de azúcares. El análisis mediante este método resulta ser rápido y puede aplicarse en un amplio rango de concentraciones.

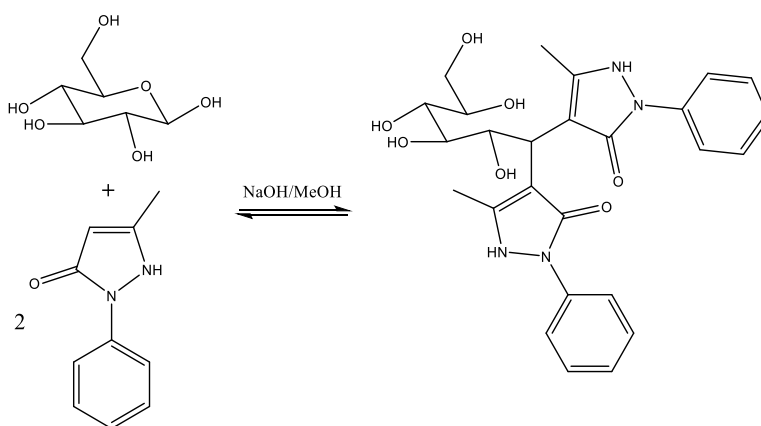
La cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento es la técnica más empleada dentro de la cromatografía líquida para la separación analítica de carbohidratos. Esto es posible con el uso de resinas modificadas con uniones de amonio cuaternario, las cuales resultan ser muy estables a elevados pH. A pesar de la gran capacidad de análisis que poseen las columnas diseñadas para este método, se reportan problemas de coelusión de pares de azúcares (ramnosa/arabinosa y xilosa, manosa). Un problema adicional de esta

técnica es la presencia de carbonato en la fase móvil. Estos iones decrecen el rendimiento de la columna bajando los tiempos de retención de los carbohidratos [29].

La cromatografía de fase reversa usando columnas de sílica modificadas con grupos amino es otra técnica comúnmente usada en la determinación de azúcares. Los sistemas de fase móvil para este método consisten en mezclas de acetonitrilo-agua, además otro dato a considerar es que la estabilidad de estas columnas es limitada al trabajar en condiciones de pH elevadas [30].

Sin embargo, existe una limitante que dificulta el uso de este método para el análisis de azúcares. Los azúcares no contienen grupos cromóforos ni fluoróforos, por lo que no son capaces de absorber luz UV y visible. Esta es la razón por la que la mayoría de los detectores usados en CLAR, como el detector UV, detector de arreglo de diodos y detector de fluorescencia no pueden usarse directamente en el análisis de monosacáridos. Para tal fin es posible usar el detector de índice de refracción, el cual detecta la variación de la refracción de la luz al eluir un compuesto, tomando como base el valor medido a la fase móvil. La principal desventaja de este detector radica en la imposibilidad de usar un gradiente de fase móvil, debido a la variación en la refracción de la luz. Los detectores UV/UV-VIS y de fluorescencia pueden ser usados para el análisis de azúcares, pero se necesita una derivatización previa de la muestra, con el fin de conjugar químicamente un grupo cromóforo a la molécula y que la nueva entidad pueda ser detectada [27, 28, 30].

La amplia accesibilidad de los detectores UV/VIS en los equipos de CLAR, han hecho que se desarrollaran reactivos químicos con el objetivo de obtener moléculas derivadas de azúcares que puedan ser analizadas con este tipo de detector. Con tal finalidad, los reactivos más populares son el 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) y el *p*-aminobenzoato de etilo, los cuales son capaces de reaccionar cuantitativamente con carbohidratos en condiciones leves. Los derivados de PMP son muy estables y pueden ser detectados a 245 nm. La reacción de obtención de estos derivados procede de acuerdo a la siguiente reacción [27]:

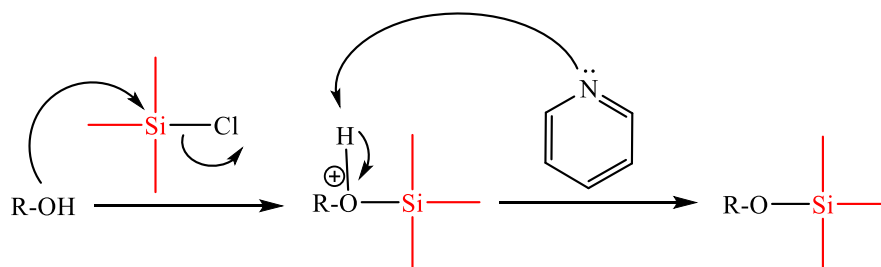


Esquema 1: Reacción de derivatización de monosacáridos con 1-fenil-3-metil-5-pirazolona (PMP) para su análisis mediante CLAR. Tomado de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133466>

2.2.2.2. Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases (CG) es una buena alternativa para la determinación de monosacáridos, Comparada con la CLAR, la CG posee mejores propiedades de separación e incluso puede detectar compuestos quirales en un tiempo relativamente corto. Sin embargo, debido a que los azúcares son no volátiles y térmicamente inestables, para poder hacer uso de la CG en el análisis de carbohidratos es necesario la preparación de derivados apropiados, lo cual también limita al análisis a moléculas de bajo peso molecular, mayormente mono-, di- y trisacáridos. [31].

Los métodos existentes de derivatización de carbohidratos consisten en la sustitución de sus grupos polares en orden de incrementar su volatilidad. La eterificación y esterificación son los procedimientos más comunes para tal propósito, siendo los éteres de metilo, acetatos, trifluoroacetatos y éteres de trimetilsilicio los derivados más utilizados. La buena volatilidad y estabilidad, unido a la simplicidad del método, hacen que los éteres de trimetilsilicio (TMS) sean los derivados más populares aplicados al análisis cromatográfico gaseoso de azúcares. La sililación generalmente consiste en el uso de una mezcla de hexametildisilazano y trimetilclorosilano como agentes derivatizantes y piridina como disolvente y catalizador (Esquema 2), aunque existen otros agentes sililantes [31-33].



Esquema 2: Mecanismo de reacción genérico en la obtención de derivados de trimetilsilicio (TMS).
Paso 1: Sustitución nucleofílica S_N2 . Paso 2: Desprotonación.

Diversos detectores pueden ser acoplados con CG. Dentro de estos, los más populares resultan ser el detector de ionización por llama (FID), el detector de masas y el detector de nitrógeno y fósforo (NPD). El CG-FID es un detector muy sensible y resulta adecuado para la determinación de monosacáridos. El detector de masas es una herramienta muy útil cuando varios analitos coeluyen en un solo pico, además, es la técnica de elección cuando se investiga una nueva molécula o material, ya que aporta valiosa información acerca de las características químico-estructurales a través de los patrones de fragmentación obtenidos. En este caso, la fragmentación de isómeros muy similares estructuralmente conduce a un patrón muy parecido, por lo que los tiempos de retención se convierten en un dato decisivo para su identificación [27, 34].

Maassoumi *et al.* aplicaron satisfactoriamente este método al análisis de mucílagos de 15 especies del género *Astragalus*, identificando la presencia de glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, fucosa y ramnosa en diferentes cantidades [35]. También Yousefi y colaboradores estudiaron la composición del mucílagos extraído de las semillas de *Lepidium perfoliatum*, y tras la hidrólisis y consecuente trimetilsililación, revelaron la presencia de xilosa, ácido galacturónico, arabinosa y galactosa [36]. Otro estudio llevado a cabo por Dammak *et al.*

caracterizó un polisacárido aislado de la corteza de *Citrullus lanatus*, el cual mediante CG-EM, logró identificar a partir de sus éteres-TMS la presencia de galactosa, arabinosa, ramnosa, manosa, xilosa y glucosa [37]. Polisacáridos extraídos de *Opuntia macrorhiza* también fueron analizados mediante esta metodología, pudiendo identificarse la arabinosa, galactosa, glucosa, ramnosa y manosa en la corteza del fruto [38]. Estos estudios demuestran que el análisis mediante cromatografía gaseosa con derivatización previa es un procedimiento eficiente para el análisis de composición de azúcares y que la obtención de los éteres de trimetilsilicio resultan ser una estrategia efectiva para la resolución estructural de polisacáridos.

2.2.2.3. Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja (IR), por otra parte, resulta ser una técnica sencilla, no destructiva y ampliamente empleada en la caracterización química de polisacáridos, destacando por la rapidez de sus análisis. El análisis de los espectros IR permite reconocer la presencia de grupos funcionales característicos dentro de las cadenas poliméricas, siendo una metodología de elección para verificar procesos de purificación. Por ejemplo, el mucílago de *Opuntia ficus indica* muestra vibraciones a 3350 cm^{-1} atribuidos a la combinación de los estiramientos de los grupos OH libres y de ácidos carboxílicos (-COOH), mientras que la absorción observada a 2895 cm^{-1} fue asignada a la suma de los estiramientos C-H de los residuos CH de piranosa y residuos glicosídicos -OCH₂-. Las absorciones observadas a 1728 cm^{-1} y 1609 cm^{-1} , así como la banda a 1402 cm^{-1} fueron asignadas a los estiramientos del grupo carbonilo (C=O) y carboxilo (-COO-) de los residuos de D-galactopiranosil y ácido urónico [39]. Otro estudio analizó el espectro IR del mucílago obtenido de las semillas *Ximenia americana*, donde identificó una banda ancha e intensa a los 2925 cm^{-1} indicando la presencia de estiramientos de OH de grupos alcohol y ácidos formando puentes de hidrógeno intermolecular. Otras bandas a 2578 cm^{-1} , correspondiente a estiramiento del grupo tiol (-SH), y a 2362 cm^{-1} , asignada a la vibración de nitrilo C-N fueron detectadas [40]. Esta técnica espectroscópica resulta de utilidad para una primera aproximación de la composición del mucílago, siendo especialmente útil para detectar ácidos urónicos o moléculas contaminantes.

2.3. Reología de polisacáridos

Los polisacáridos, dentro de los cuales se incluyen los mucílagos, son ampliamente aplicados en formulaciones alimenticias y farmacéuticas con el objetivo de mejorar su calidad a través de la modificación de sus propiedades físico-mecánicas y organolépticas, sirviendo como espesantes, agentes gelantes, estabilizantes y modificadores de textura. Estas propiedades se atribuyen a los mecanismos fisicoquímicos que subyacen a sus comportamientos que presentan en solución.

A pesar de la amplia distribución de polisacáridos en la naturaleza, la aplicación de nuevos hidrocoloides es muy limitada, lo que justifica la necesidad de futuras investigaciones sobre sus propiedades reológicas. La reología de materiales puede ser descrita como el estudio de la deformación y flujo de los materiales cuando son expuestos a algún esfuerzo o tensión mecánica. Las propiedades de un fluido se pueden definir usando la relación entre el

esfuerzo a la cizalla (τ) y la velocidad de cizalla ($\dot{\gamma}$) en un flujo laminar en estado estacionario. Los experimentos reológicos estiman las propiedades al flujo que puedan ser relacionadas con elementos macroestructurales en los materiales, ya que la comprensión de las propiedades al flujo es esencial para optimizar el desarrollo de productos, las condiciones de proceso y como aceptación y control de calidad del material [41].

La capacidad de los polisacáridos de modificar las propiedades reológicas del medio acuoso en el cual intervienen, incluso a muy bajas concentraciones, es la base de sus “propiedades tecno-funcionales” (como espesantes y agentes gelantes). También está relacionado con otras aplicaciones como material de pared para la encapsulación y la liberación controlada de principios activos. Es por esto por lo que la caracterización reológica es esencial para evaluar los usos potenciales de un polisacárido, ya sea extraído de fuentes naturales o modificado químicamente.

El estudio de las propiedades reológicas es importante para el diseño de diferentes procesos donde están fluidos de reología compleja sometidos a flujo, por ejemplo: bombas, procesos de extracción, filtración, purificación, pasteurización, evaporación, secado, etc. Por otro lado, las propiedades espesantes y el comportamiento viscoelástico de los hidrocoloides en solución se pueden ver afectados significativamente por variables como la velocidad de cizalla y el tiempo de esta, concentración, temperatura, presión, fuerza iónica, pH, entre otras. El análisis de estos efectos de manera individual o combinados es de suma importancia, especialmente cuando serán usados estos hidrocoloides para modificar la textura de alimentos [42].

Existen diversos estudios acerca del comportamiento reológico de diferentes mucílago extraídos de plantas, así como de importantes biopolímeros comerciales. Por ejemplo, el mucílago de Nopal de la especie *Opuntia ficus indica*, con gran valor nutricional y comercial se caracteriza por una gran presencia de este compuesto mucilaginoso. En relación con esto, diversos estudios se han llevado a cabo con el fin de caracterizar reológicamente las soluciones de su mucílago. Medina *et al.* estudiaron las dispersiones mucilaginosas en un rango de 1 a 10 %, observando un comportamiento adelgazante al flujo (disminuye la viscosidad con el aumento de la velocidad de cizalla). Por otra parte, se evidenció un comportamiento polielectrolítico al modificarse la viscosidad en función de la fuerza iónica y también una marcada dependencia de la viscosidad respecto al pH del medio [21]. Otro estudio realizado por Capitani *et al.* estudió las propiedades viscoelásticas y de flujo de dispersiones acuosas del mucílago de *Salvia hispánica* (Chía) a diferentes concentraciones, evidenciando que estas presentan un comportamiento adelgazante al flujo y una estructura débilmente elástica tipo gel débil [42].

2.3.1. Modelos reológicos

La viscosidad (η), o en un sentido más general, una curva de flujo, es una característica fundamental dentro de las propiedades mecánicas de un material. Para evaluar como las propiedades reológicas pueden ser influenciadas por la concentración y otros parámetros fisicoquímicos como pH, fuerza iónica y temperatura, es de suma importancia describir los datos experimentales con un modelo reológico que se ajuste adecuadamente [43].

Existen diversos enfoques para describir los datos de viscosidad obtenidos [44, 45], algunos de ellos se muestran en la Tabla 2.

Un análisis simple revela que cuando la velocidad de cizalla se aproxima a cero $\dot{\gamma} \rightarrow 0$, la viscosidad también lo hace $\eta \approx \eta_0$, y cuando $\dot{\gamma} \rightarrow \infty$, $\eta \approx \eta_\infty$. En el rango intermedio de velocidad de cizalla se predice la dependencia de $\eta(\dot{\gamma})$ de la ley de potencia. El rango intermedio de velocidades de cizalla es el rango más importante para aplicaciones prácticas, donde la ecuación de ley de potencia es válida. Esta ecuación se suele conocer como el modelo de Ostwald-De Waele, donde n y k son los parámetros reológicos obtenidos, indicando el índice de adelgazamiento al flujo ($n < 1$) y el índice de consistencia, respectivamente [46].

Tabla 2: Modelos reológicos de correlación de viscosidad de cizalla

Modelo	$\eta(\dot{\gamma})$	Aplicaciones a soluciones de mucílagos
Ley de potencia	$\eta = k\dot{\gamma}^{n-1}$	[21, 26, 47]
Cross	$\eta = \eta_{\infty, \dot{\gamma}} + \frac{\eta_{0, \dot{\gamma}} - \eta_{\infty, \dot{\gamma}}}{1 + (\alpha_c + \dot{\gamma})^m}$	[21, 26, 48]
Carreau	$\eta = \eta_{\infty, \dot{\gamma}} + \frac{\eta_{0, \dot{\gamma}} - \eta_{\infty, \dot{\gamma}}}{[1 + (\lambda_c + \dot{\gamma})^2]^N}$	[49, 50]

η : viscosidad (Pa.s), $\dot{\gamma}$: velocidad de cizalla (1/s), k : índice de consistencia (Pa.sⁿ), n : índice de comportamiento de flujo, $\eta_{\infty, \dot{\gamma}}$: viscosidad a velocidad de cizalla infinita (Pa.s), $\eta_{0, \dot{\gamma}}$: viscosidad a velocidad de cizalla cero (Pa.s), N : constante, λ_c y α_c : tiempos característicos de relajación (s)

Por la simplicidad y aplicación práctica del modelo de ley de potencia, resulta ser el modelo más aplicado al estudio reológico de soluciones de mucílagos. Los parámetros n y k son parámetros de ajuste que dependen de la naturaleza del fluido y de las condiciones ambientales impuestas, además revelan información importante acerca del comportamiento viscoso de los polisacáridos disueltos en agua. Si bien las soluciones de polisacáridos se comportan como fluidos no Newtonianos, es importante discernir el comportamiento intrínseco de los mismos, ya sea adelgazante al flujo (pseudoplástico $n < 1$) o dilatante ($n > 1$). La determinación de dicho comportamiento es el criterio de elección de las futuras aplicaciones que pueda tener un material mucilaginoso.

2.3.2. Efecto de la concentración sobre la viscosidad

En soluciones suficientemente diluidas, las interacciones hidrodinámicas juegan un papel secundario respecto a las intramoleculares o las que ocurren entre las moléculas de solvente. En otras palabras, cada molécula individual se encuentra muy separados de las otras y es libre de moverse independientemente. Cuando se aplica una cizalla a estos sistemas, el comportamiento de flujo de cada molécula no se afecta por la presencia de las demás, y la respuesta reológica total de la solución se puede considerar como la suma de las contribuciones individuales. Un incremento en la concentración del polímero conduce a un incremento de las probabilidades estadísticas de interacciones intermoleculares. Las

colisiones de las moléculas individuales se vuelven más frecuentes y causan que estos se interpenetren de una forma compleja, aumentando consecuentemente la resistencia a fluir y su viscosidad, como se muestra en la Figura 5 [43].

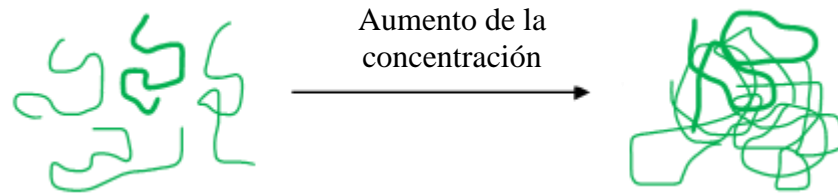


Figura 5: Representación esquemática del efecto de la concentración en una suspensión polimérica.

Dentro de todo este proceso de solubilización y aumento de la concentración del polímero, se pueden establecer tres dominios de concentración [45]:

Dominio diluido ($c < c^*$): En una solución demasiado diluida, el volumen disponible para cada cadena de polímero es mucho mayor que el de una molécula individual. Las cadenas permanecen estadísticamente lejos entre sí y los encuentros entre ellas no son frecuentes. Las moléculas mantienen las dimensiones de las cadenas aisladas. Estas condiciones prevalecerán hasta alcanzar la concentración crítica de superposición c^* , a la cual las moléculas llenan por completo el volumen de la solución.

Dominio semidiluido ($c^* < c < c^{**}$): Cuando la concentración del polímero sobrepasa el valor de c^* , se produce una interpenetración progresiva de las moléculas, de manera conjunta con una contracción del volumen individual. La solución se vuelve una red transitoria de cadenas enredadas, siendo esta superposición la restricción topológica correspondiente al punto de contacto entre dos cadenas. Un determinado polímero contrae estadísticamente un determinado número de moléculas enredadas a una concentración determinada $c > c^*$, pero debido a las fluctuaciones conformacionales, los enredos se forman y deshacen continuamente. El sistema mantendrá estas características hasta alcanzar la c^{**} , donde se formará una compleja red entrecruzada.

Dominio concentrado ($c > c^{**}$): A concentraciones mayores que c^{**} , las moléculas no se contraerán más, la solución del polímero se volverá una red entrelazada donde las cadenas perderán completamente su carácter individual.

2.3.3. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad

Con el aumento de la temperatura, y la consecuente cesión de energía al sistema polimérico, las cadenas de polisacáridos que se encuentran restringidas fuertemente por sus vecinos y las moléculas de solvente comienzan a aumentar sus movimientos, provocando que las interacciones intra e intermoleculares sean menores, por lo que el sistema ofrecerá una menor resistencia a la fluidez.

Para sistemas poliméricos homogéneos la viscosidad de cizalla decrece monótonamente al aumentar la temperatura (T). A excepción de los sistemas altamente diluidos, el comportamiento reológico de estos sistemas es adelgazante al flujo y por lo tanto el análisis de dependencia de la viscosidad η debe llevarse a cabo fijando el valor de $\dot{\gamma}$.

Existen diversos modelos matemáticos que pueden emplearse para ajustar los datos de viscosidad en función de la temperatura [51, 52], por ejemplo: la ecuación de Arrhenius (Ec. 1) y la ecuación de Williams-Landel-Ferry (WLF) (Ec. 2).

$$\eta = \eta_{\infty} \exp \frac{Ea}{RT} \quad (1)$$

donde, Ea es la energía de activación del flujo, R es la constante universal de los gases y η_{∞} es la viscosidad a $T = \infty$.

$$\ln \frac{\eta}{\eta(T_g)} = - \frac{C_1(T-T_g)}{C_2(T-T_g)} \quad (2)$$

siendo C_1 y C_2 dos constantes independientes de la temperatura, T_g la temperatura de transición del vidrio (temperatura de referencia) y $\eta(T_g)$ su viscosidad a esta temperatura.

Para sistemas diluidos, y específicamente para soluciones de polisacáridos la ecuación de Arrhenius ofrece resultados satisfactorios para ajustar los datos experimentales, equivalentes en calidad a los obtenidos por la de WLF y otras expresiones [21, 42, 47].

2.3.4. Efecto del pH y la fuerza iónica sobre la viscosidad

El estudio de factores químicos como el pH y la fuerza iónica sobre la viscosidad de polisacáridos y mucílagos es sumamente importante, debido a los medios en los que se pueden encontrar formulados para sus aplicaciones, que varían desde embutidos, salsas, cosméticos y productos para el cabello hasta excipientes farmacéuticos.

Los mucílagos al disolverse en agua forman largas cadenas enredadas entre sí, interaccionando de manera intra e intermolecular en virtud de la gran cantidad de grupos hidroxilos que poseen. Las soluciones resultantes poseen de manera característica mediana o alta viscosidad en dependencia de la naturaleza estructural del soluto. Esta viscosidad se puede ver modificada en gran extensión dependiendo de la acidez o basicidad del medio, así como por la presencia de iones metálicos [53].

Para analizar el efecto que estos factores tienen sobre el comportamiento reológico de las soluciones de mucílagos, se debe prestar atención a la composición y estructuras química de los mismos.

Así pues, un polisacárido que contenga grupos carboxilos en su estructura, por ejemplo, ácidos glucurónico o galacturónico, al encontrarse en un medio de pH básico, el exceso de iones hidroxilo provocará una ionización parcial de dichos grupos ácidos conduciendo a la formación de los carboxilatos correspondientes (Figura 6). Las densidades de carga negativa sobre los átomos de oxígeno en los iones carboxilatos de la estructura provoca una repulsión

interna que conduce a una estructura más expandida, lo que se traduce en términos reológicos en una mayor viscosidad [21, 45].

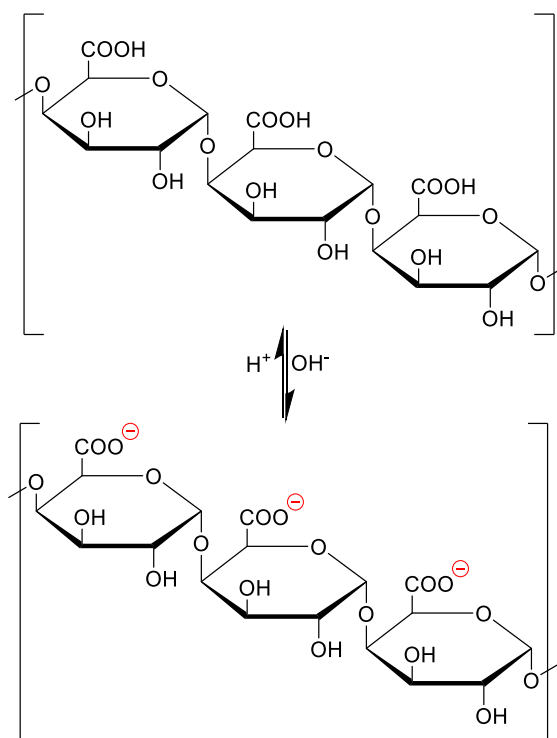


Figura 6: Proceso de ionización de una pectina tipo homogalacturano.

Como es de suponer un medio de pH ácido, ejercerá el efecto contrario. El exceso de iones hidronio revertirá la ionización que tuvo lugar por el agua, retornando los ácidos urónicos a sus formas no ionizadas. El resultado de esta reacción inversa es una disminución de la repulsión inter e intramolecular, lo que conduce a una distribución más compacta del polisacárido y una menor resistencia a la fluidez.

Por otra parte, el efecto de la concentración iónica en la viscosidad es importante no solo para determinar si el mucílago o polisacárido se comporta como una molécula polielectrolítica, sino además para estimar propiedades reológicas funcionales. La viscosidad de las moléculas cargadas tiende a mostrar una fuerte dependencia de la fuerza iónica del medio. Esta funcionalidad puede ser representada a través de la ecuación siguiente [21]:

$$\eta = \eta_{\infty} + SI^{-1/2} \quad (3)$$

donde, η_{∞} es la extrapolación de η a fuerza iónica infinita. S es la pendiente de la recta η vs. $I^{-1/2}$ y es una función de la rigidez de las cadenas del polímero.

A cero fuerzas iónicas o sin ningún contra ion, las cargas negativas producto de la ionización por el agua de los azúcares ácidos provocan gran repulsión y conducen a una estructura más expandida. En presencia de iones metálicos que actúan como contra iones,

neutralizando parcialmente las cargas negativas, se reducen las repulsiones internas y la estructura se contrae, reduciendo la viscosidad del sistema [1, 43, 46].

El efecto del pH y la fuerza iónica sobre la viscosidad se verá reflejado si el mucílago posee grupos ácidos en su estructura. Esto se ha evidenciado en caracterizaciones reológicas de soluciones de celulosa, la cual se encuentra únicamente compuesta por unidades de glucosa. Al no presentar grupos funcionales ácidos o básicos en su estructura, su viscosidad no se ve afectada al modificarse el pH del medio o por la presencia de iones [54].

2.3.5. Propiedades viscoelásticas

La mayoría de los materiales no son puramente viscosos ni puramente elásticos, mostrando generalmente un comportamiento intermedio. Tales materiales se denominan como viscoelásticos, y en ellos el tiempo de observación es un parámetro clave para determinar el comportamiento que prevalece.

En un material puramente viscoso, la deformación no es instantánea, es decir, la respuesta del material va a depender del tiempo. Este tipo de deformación no es reversible o recuperable. Tradicionalmente este tipo de comportamiento viscoso se ha representado mediante un amortiguador cuyo comportamiento se rige por la ley de Newton, Figura 9 [55].

Por otro lado, a un material elástico cuando se le aplica una carga y se mantiene constante, la deformación es instantánea y proporcional a la carga aplicada. Este comportamiento se ha representado tradicionalmente mediante un resorte, cuyo comportamiento se rige mediante la ley de Hooke, donde G representa el módulo de rigidez (ver Figura 7) [56].




Material viscoso	Material elástico	Material viscoelástico
		
Ley de Newton $\sigma = \eta \dot{\gamma}$	Ley de Hooke $\sigma = G\gamma$	Modelo de Maxwell $\gamma = \gamma_1 + \gamma_2 = \frac{\sigma}{G} + \int \frac{\sigma}{\eta} dt$ $\sigma = \sigma_1 = \sigma_2$ $\dot{\gamma} = \frac{\dot{\sigma}}{G} + \frac{\sigma}{\eta}$
σ (estrés), η (viscosidad), $\dot{\gamma}$ (velocidad de deformación), G (módulo elástico)		

Figura 7: Modelos matemáticos del comportamiento viscoso, elástico y viscoelástico.
 Adaptado de: <https://doi.org/10.4995/msel.2017.6315>

Así pues, los fluidos viscoelásticos son los formados por la suma de un componente elástico que absorbe la energía aplicada, el cual, durante la deformación, la transforma en energía potencial, de forma que cuando esta cesa, la deformación vuelve a su estado inicial; y un componente viscoso, que absorbe la energía aplicada transformándola en calor y fluyendo. Este comportamiento de muchos fluidos se puede representar adecuadamente a través del modelo de Maxwell, Figura 7 [55].

El término viscoelasticidad engloba el comportamiento de muchos fluidos que pueden exhibir a la par un comportamiento elástico y viscoso cuando son sometidos a un flujo. La mayor parte de las pastas y geles suelen mostrar viscoelasticidad, así como muchas soluciones de polisacáridos. Es decir: a bajas deformaciones, el fluido viscoelástico se comporta como un sólido elástico. A altas deformaciones, estos fluyen de forma viscosa (como líquidos). Este tipo de materiales poseen la característica de tener una estructura interna con la capacidad de almacenar energía al sufrir deformaciones, liberando dicha energía al cesar la acción deformante y adoptando su configuración original, de manera análoga a un resorte. Si la deformación provocada posee la magnitud suficiente, la estructura molecular interna colapsa y el material fluye [53].

La viscoelasticidad de los fluidos, puede ser medida empleando varios procedimientos experimentales, de los cuales pueden citarse los experimentos de relajación del esfuerzo, cedencia a la deformación, recuperación de la deformación y experimentos de flujo oscilatorios [46].

En un experimento de medición oscilatorio, el material es sometido a un esfuerzo sinusoidal y la respuesta es medida. El análisis mecánico dinámico analiza tanto la respuesta viscosa como elástica del material de manera simultánea. El comportamiento reológico bajo flujo oscilatorio se puede describir a través del modelo de Maxwell [57].

A partir de la medición del esfuerzo y la deformación aplicada puede obtenerse una serie de parámetros de interés. En un experimento oscilatorio, el corrimiento de fase se usa para determinar el módulo elástico o de almacenamiento del material (G'), el cual se relaciona con la capacidad del material para almacenar energía elásticamente. De manera análoga se obtiene el módulo de pérdida del material (G''), el cual se relaciona con la parte viscosa y con la capacidad del material para disipar estrés a través del calor. Si $G' > G''$ el material se puede considerar mayormente elástico y si $G' < G''$, entonces el material se comportará a esas condiciones como viscoso [57, 58].

2.3.5.1. Propiedades elásticas. El efecto Weissenberg

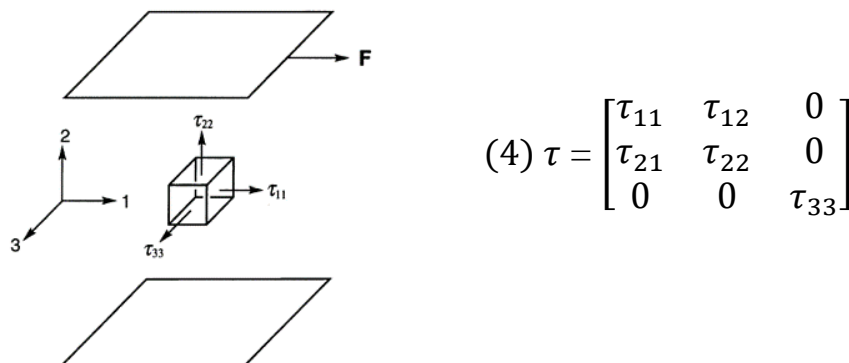
En la Figura 8 se observa el llamado efecto Weissenberg: cuando una varilla se usa para agitar el fluido, este tiende a ascender por la varilla, pero contrario a la dirección a la cizalla, en vez de ser desplazado por la varilla en virtud de las fuerzas centrífugas hacia las paredes del recipiente, en este caso el efecto aumenta con un aumento en la velocidad de agitación, siendo mayor la fuerza centrípeta [58].



Figura 8: Efecto Weissenberg en un fluido no newtoniano.
Tomado de <https://fluids.ac.uk/gallery/zoomify/665>

El efecto Weissenberg tiene varias implicaciones en la industria, tanto en el mezclado como la obtención de nuevos productos. A menudo los reactores poseen mezcladores giratorios de diferente geometría y tipo, por lo que un estudio reológico de los materiales es necesario para diseñar adecuadamente los reactores [59].

Este efecto se produce porque los esfuerzos normales ya no son despreciables, existe un esfuerzo asociado con las líneas de flujo que tiene su origen usualmente en la “Primera diferencia de esfuerzo normal (N_1)” y en ocasiones en la “Segunda diferencia de esfuerzo normal (N_2)”. Esto quiere decir que el fluido ejerce una fuerza perpendicular a la dirección del cizallamiento. En este fenómeno, aparecen fuerzas que actúan en la dirección de la cizalla y en la dirección perpendicular. Esto es equivalente a la aparición de un esfuerzo normal al flujo a la cizalla, pudiendo expresarse este por medio del tensor de estrés mostrado a continuación [43, 46]:



Esquema 3: Tensor de estrés en la cizalla de dos planos paralelos. Izquierda: Representación esquemática del modelo. Derecha: Representación matricial.

El primero y segundo subíndice de cada componente del tensor de estrés, τ_{ij} , en la matriz, identifica la fila (la dirección del vector fuerza) y la columna (la normal al plano sobre el cual actúa el componente de la fuerza), respectivamente. El tensor de estrés es simétrico, esto significa que $\tau_{ij} = \tau_{ji}$, y, por lo tanto, solo seis componentes de los nueve totales son independientes. Los componentes normales del esfuerzo son aquellos que yacen a lo largo de la diagonal de la matriz donde $i = j$ (esto es $\tau_{11}, \tau_{22}, \tau_{33}$). La consecuencia directa de este enfoque es que, en orden de caracterizar el efecto del estrés normal en el flujo de cizalla, no es su valor absoluto lo que realmente interesa, sino su diferencia lo que es más importante [46, 60].

La primera y segunda diferencia de estrés normal se definen como:

$$N_1 = \tau_{11} - \tau_{22} \quad (5)$$

$$N_2 = \tau_{22} - \tau_{33} \quad (6)$$

Para medir estas propiedades de los fluidos viscoelásticos en función de la velocidad de cizalla se utiliza una geometría cono-plato que permite determinar la fuerza con la que el fluido intenta separar las dos partes de la geometría. La primera diferencia de esfuerzo normal (N_1) es el origen de esta fuerza separadora ejercida perpendicularmente a la superficie, mientras que la segunda diferencia de esfuerzo normal (N_2) resulta ser mucho menos importante para aplicaciones prácticas debido a que $N_2 \ll N_1$ [60].

El esfuerzo normal puede ser usado como una medida directa de la energía elástica almacenada en el flujo del fluido. La expresión para la energía almacenada elásticamente, W , puede ser obtenida a partir de la ecuación de Lodge para un material elástico [46]:

$$W = \frac{N_1}{4} \quad (7)$$

Las propiedades elásticas de muchos polisacáridos se han evidenciado en diversos estudios y son la base de muchas aplicaciones dentro de la industria alimentaria y farmacéutica. Así, Song *et al.* demostraron a través de la primera diferencia normal de esfuerzo, las propiedades elásticas de la goma xantana en un rango de concentraciones de 1 a 4 %, siendo comparable su elasticidad a las de un polímero ordinario como el isobutileno. El flujo elástico exhibido por las soluciones de este biopolímero son importantes para muchas aplicaciones como alimentos (mayonesas, aderezos, siropes, salsas), medicamentos (agentes de liberación controlada de fármacos) y cosméticos (champús, cremas) [61]. Por otra parte, el mucílago de *O. ficus indica* ha sido objeto de un amplio estudio en los últimos años en virtud de las propiedades elásticas exhibidas por sus soluciones. Medina *et al.* estudiaron el comportamiento de este mucílago en un rango de concentraciones de 3 a 10% y revelaron excelentes propiedades elásticas al flujo, lo cual constituye la razón de sus propiedades funcionales en la industria química, excipientes farmacéuticos y biopelículas [62].

2.4. Actividades biológicas de mucílagos

Las plantas han jugado un papel importante desde la antigüedad en la nutrición y la salud. En años recientes se ha evidenciado un interés creciente en compuestos derivados de plantas

que sean biológicamente activos, biodegradables, biocompatibles, no tóxicos y amigables con el medio ambiente. Además, una gran atención ha recibido la búsqueda de fuentes renovables y con buena relación costo-beneficio de productos basados en plantas [18].

Los mucílagos y gomas pueden interactuar con diversas dianas moleculares, a través de las cuales ejercen sus actividades biológicas. Así, por ejemplo, el mucílago de Okra (*Abelmoschus esculentus*) ha demostrado propiedades funcionales para la salud en estudios *in vitro* e *in vivo*, tales como antitumoral, antioxidante, antimicrobiano e hipoglucemiante. La mayoría de los estudios sobre las propiedades funcionales del mucílago de Okra se enfocan en su potencial para controlar los factores bioquímicos de la diabetes tipo 2, siendo muy promisorio su uso en la terapia nutracéutica para el control de esta enfermedad [63]. Por otra parte, la de la goma obtenida a partir de la planta de “marañón” (*Anacardium occidentale*) se ha reportado su efecto antimicrobiano, antiinflamatorio, anti-úlceras y antidiarreico [64, 65]. Además, algunos autores han reportado que la goma Guar extraída de las semillas de *Cyamopsis tetragonolobus* posee la capacidad de inhibir la enzima α -amilasa, disminuyendo los niveles de glucosa en el organismo y convirtiendo este compuesto en un potencial agente antidiabético [66]. Por otro lado, estudios *in vivo* realizados con el mucílago del fenogreco (*Trigonella foenum graecum*) demostraron su acción antiinflamatoria y antioxidante en un modelo de artritis inducida en ratas. Este mucílago fue capaz de reducir el porcentaje de edema en mayor grado que el fármaco control de indometacina, además redujo las actividades de la 2-ciclooxigenasa y mieloperoxidasa, a la vez que aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes, demostrando el efecto potencial de este mucílago para el tratamiento de la artritis en ratas [67].

Otros estudios han evidenciado que los mucílagos muestran una excelente actividad contra bacterias grampositivas y gramnegativas, donde se ha supuesto que el modo de acción transcurre mediante la unión del mucílago a la membrana bacteriana y la consecuente introducción a la célula, resultando en daños al núcleo y deterioro del ADN, degradación de proteínas y daños mitocondriales [19].

Una de las aplicaciones donde el poder antibacteriano de muchos mucílagos ejerce su importancia es en la formulación de películas y recubrimientos comestibles para alimentos. Es aquí donde se ponen de manifiesto las propiedades funcionales que este tipo de compuestos exhiben: visco-elasticidad y antimicrobiano. Por ejemplo, una biopelícula elaborada con goma xantana mostró la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, lo cual sugiere su potencial uso como preservante en la industria alimentaria [68]. También otro estudio relacionado con la elaboración de películas protectoras a base de polisacáridos extraídos de la planta de Lili (*Lilii Bulbus*) evidenció de manera significativa las propiedades antibacterianas de estos contra *E. coli* y *Staphylococcus aureus* [69].

2.5. Citotoxicidad

Existe gran preocupación en la sociedad y la comunidad científica por el uso desmedido de polímeros sintéticos y sus efectos nocivos para la salud humana y el medio ambiente. Desde la antigüedad, los productos de origen natural se han mostrado como más confiables, aunque la toxicidad de algunos de ellos ha sido bien identificada. En las décadas pasadas, los

nuevos enfoques para el descubrimiento de fármacos y evaluación de nuevos materiales han provisto de información importante para determinar ciertas actividades biológicas y la seguridad de nuevas moléculas, basados en ensayos celulares para pruebas de citotoxicidad, los cuales son económicos y fiables [70].

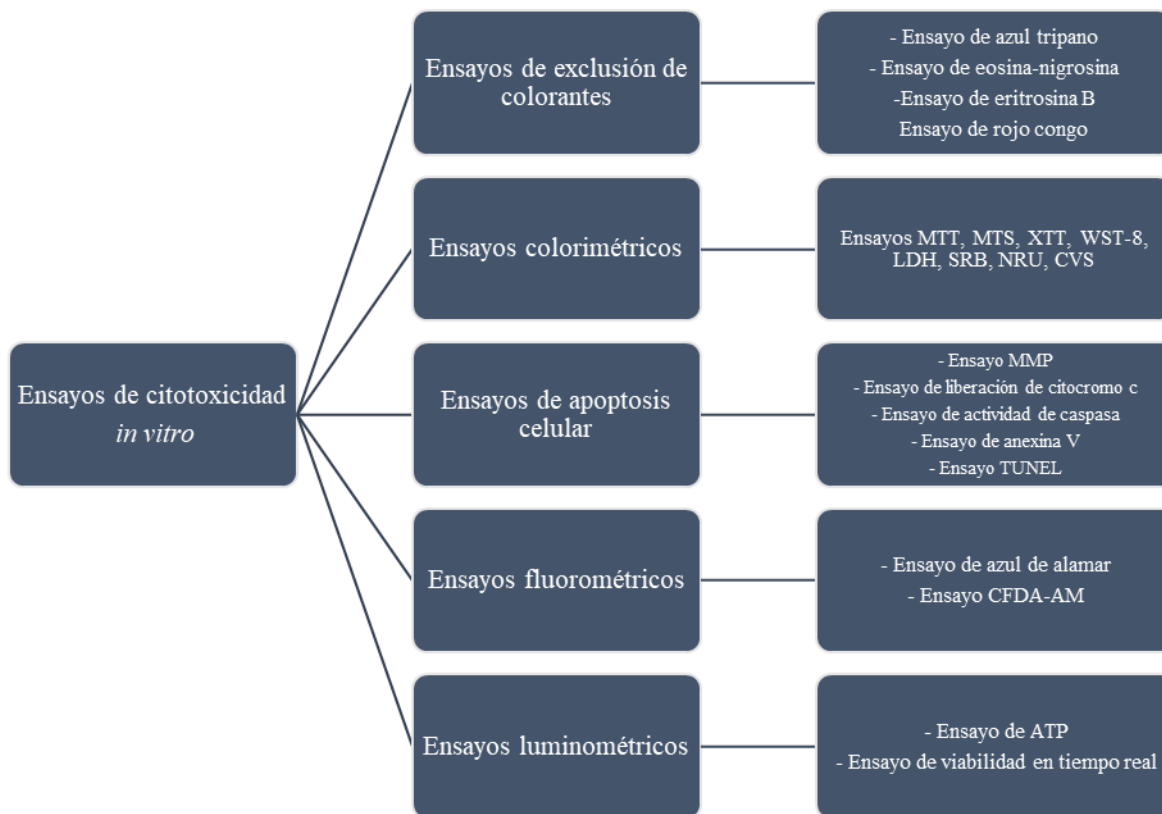


Figura 9: Métodos *in vitro* para la determinación de citotoxicidad.
Adaptado de doi.org/10.1002/cbdv.202201098

De manera general la citotoxicidad se puede definir como la capacidad de un agente quimioterapéutico de ser tóxico para las células, sean cancerosas o no [71]. Los estudios de citotoxicidad *in vitro* se implementan con el objetivo de evaluar el potencial tóxico de productos sintéticos y naturales en modelos de cultivo celular y así ayudar a detectar los efectos de estos productos sobre la viabilidad, crecimiento y daño celular. La capacidad de los extractos y compuestos naturales de inhibir la proliferación celular y la formación de colonias puede ser asociado como indicativo de citotoxicidad. Los compuestos naturales con efectos citotóxicos pueden prevenir la unión celular, causar alteraciones morfológicas, inhibir el ciclo celular y la replicación del ADN, conduciendo a una marcada disminución de la viabilidad celular. Los ensayos de toxicidad a nivel celular pueden ser utilizados como un indicador de los riesgos potenciales de extractos naturales. Además, este tipo de ensayos es dependiente de la concentración, mecanismo de acción, método de evaluación, tipo de célula, componentes y tiempo de exposición [72, 73].

Existe una amplia variedad de métodos para la determinación del potencial tóxico de extractos naturales sobre cultivos celulares [74], según se observa en la Figura 9. Estos se pueden clasificar en ensayos de exclusión de colorantes, ensayos colorimétricos, ensayos de

fluorescencia y ensayos de luminiscencia, teniendo cada uno sus ventajas y desventajas características.

2.5.1. Métodos de evaluación de citotoxicidad

2.5.1.1. Ensayos de exclusión de colorantes

Los ensayos de exclusión de colorantes son metodologías ampliamente usadas en la actualidad con el objetivo de estimar la viabilidad celular después de un tratamiento, o de una manera más apropiada, contabilizar las células muertas. De manera general en esta clase de técnica se emplean colorantes, los cuales tienen la capacidad de penetrar las células muertas y teñirlas, mientras que las células viables los excluirán.

La tinción selectiva del azul de tripano sobre las células muertas y la examinación microscópica en un hemocitómetro es uno de los métodos más usados para determinar el número y el porcentaje de viabilidad celular de una población de células, ver Figura 10. El azul de tripano es un colorante desarrollado en 1975 para determinar la viabilidad de cultivos de células en suspensión. Este colorante es de una naturaleza eléctrica altamente negativa, lo cual provoca que tiña solo las células no viables con membranas dañadas. En este ensayo las células viables con membranas intactas excluirán al azul de tripano, mientras que las células muertas con membranas dañadas no excluirán al azul de tripano. Debido a la pérdida en la selectividad de la proteína de la membrana, el azul de tripano es absorbido dentro del citoplasma de las células muertas y las tiñen de azules, mientras que las células viables poseen un citoplasma limpio debido a que excluyen el colorante. Si bien resulta en un método económico y simple, las principales desventajas de este método se concentran en los errores asociados al conteo celular, la dificultad para manejar grandes cantidades de muestras y los efectos tóxicos de este colorante sobre las células [74, 75].

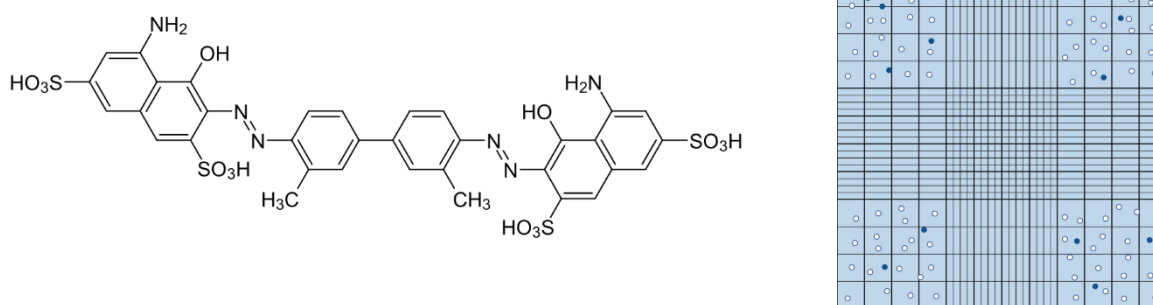


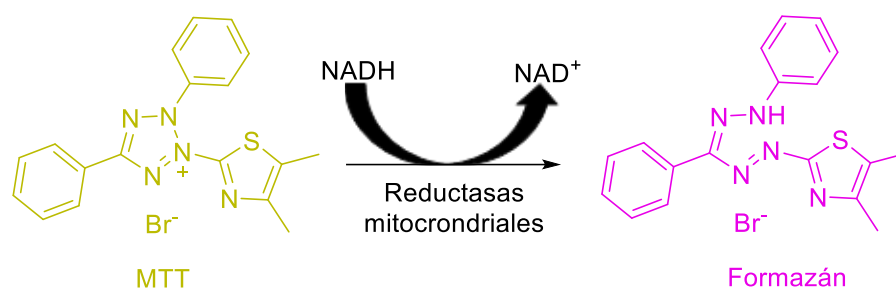
Figura 10: Estructura del colorante azul de tripano (izquierda) y tinción de células no viables bajo un hemocitómetro (derecha). Adaptado de https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1020-6_11

Otros ensayos de exclusión de colorantes han sido bien estandarizados para la determinación de viabilidad celular empleando diversos colorantes como son el ensayo de eosina-nigrosina para determinar la viabilidad del espermatozoide, el ensayo de eritrosina y de rojo Congo. En todos estos ensayos la integridad de la membrana celular juega un papel fundamental para

determinar la viabilidad celular, actuando de manera similar al azul de tripano anteriormente descrito [74].

2.5.1.2. Ensayos colorimétricos

Los ensayos colorimétricos son usados extensamente para evaluar la viabilidad celular e identificar la efectividad o la toxicidad de sustancias en el desarrollo de diferentes productos [74]. Para este propósito, diversas sales de tetrazolio han sido obtenidas y comercializadas. La primera sal de este tipo, el MTT o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio revolucionó los ensayos farmacológicos en células ofreciendo un ensayo colorimétrico aplicable al cribado de alto rendimiento y suficientemente sensible para llevarlo a cabo en placas de 96 pozos [76]. El procedimiento de este ensayo involucra la adición de un pequeño volumen de solución de MTT. Durante 1-4 horas de incubación a 37 °C, un conjunto de enzimas celulares mitocondriales y citosólicas reduce el tinte, inicialmente amarillo a su forma reducida de formazán, de color púrpura, ver Esquema 4. La reducción celular del MTT conduce al formazán insoluble en medio acuoso, con cristales visibles que se encuentran contenidos tanto dentro de las células como alrededor de estas. Por esta razón luego de la adición del MTT se precisa la adición de un disolvente adecuado que pueda solubilizar los cristales de formazán, el cual presenta su máximo de absorbancia a los 570 nm. Para este propósito diferentes soluciones pueden ser usadas como metanol, etanol, isopropanol acidificado o dimetilsulfóxido [77]. La adición de un disolvente orgánico más allá de disolver el formazán producido, se considera un punto final, no dejando oportunidad a lecturas adicionales si se llegara a necesitar mayor desarrollo de color. El ensayo colorimétrico de MTT se encuentra sumamente bien caracterizado, estandarizado y referenciado en la literatura, resultando en un estándar de elección para comparar cuando se desarrollan nuevos métodos [76].



Esquema 4: Reducción del MTT a formazán por las células viables. Adaptado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

Los problemas asociados al método del MTT, como la insolubilidad del producto formazán formado, hicieron que nuevas sales de tetrazolio se obtuvieran. En este sentido se desarrolló el XTT o 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida, el cual su producto formazán resulta ser soluble en agua. A pesar de esto ha tenido poca aceptación debido a su poca solubilidad en soluciones amortiguadoras y su limitada estabilidad como reactivo. Por otra parte, el MTS o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-

sulfofenil)-2H-tetrazolio y el WST-1 o 4-(3-4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio pertenecen al grupo de sales de tetrazolio de tercera generación y exhiben buena solubilidad, facilidad de preparación, y buena estabilidad [74].

2.5.1.3. Ensayos de apoptosis celular

La apoptosis se puede definir como un proceso coordinado, que involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas denominadas caspasas y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula. Durante el evento apoptótico ocurren una serie de cambios asociados a la compleja ruta, los cuales pueden ser caracterizados en base a su morfología y marcadores bioquímicos.

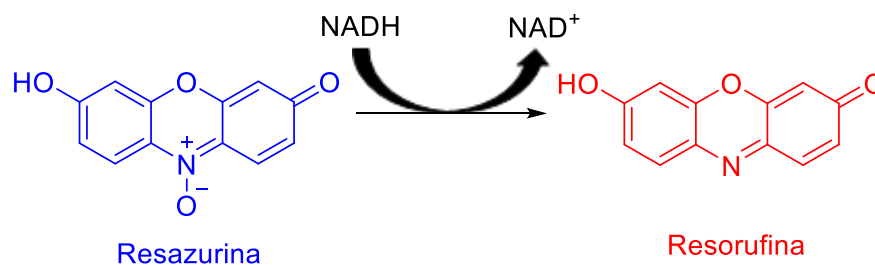
Una gran variedad de ensayos ha sido diseñada para medir niveles de apoptosis celular, los cuales incluyen: ensayo de potencial de membrana mitocondrial, ensayo de liberación del citocromo c, ensayo de actividad de caspasa, ensayo de anexina V y el ensayo TUNEL [74].

El ensayo del potencial de membrana mitocondrial resulta en una interacción específica la cual provee información importante acerca del estatus energético de la célula. Por otro lado, mientras que el citocromo c ayuda a identificar los cambios en las etapas tempranas de la cascada apoptótica, pueden ocurrir interacciones proteína-proteína entre proteínas nativas y conducir a cambios en la fluorescencia de proteínas marcadas. Un mecanismo esencial dentro de la apoptosis es la activación de las caspasas. Al preservar la cascada enzimática en la compleja ruta de señalización, se sabe que las actividades proteolíticas de las caspasas desencadenan y mejoran la respuesta apoptótica [74]. La determinación de la actividad enzimática de las caspasas puede determinarse fácilmente, por ejemplo, si se aplica el sustrato de reconocimiento Z-DEVD-AFC a la caspasa-3 [78]. Esta actividad puede ser determinada por varias técnicas como Western Blot, inmunoprecipitación e inmunohistoquímica. Otro de los ensayos significativos es el denominado TUNEL (en inglés Terminal dUTP Nick End-Labeling), el cual es implementado para determinar fragmentos de ADN cortados por la acción de endonucleasas, marcándose colorimétrica o fluorescentemente mediante un proceso enzimático y visualizándolos al microscopio. Este método es rápido pero costoso y poco sensible [78].

2.5.1.4. Ensayos fluorométricos

A pesar de que los ensayos de exclusión de colorantes son frecuentemente empleados para cuantificar células en suspensión, este método no es adecuado para bajas poblaciones de células. Para estudios de citotoxicidad a gran escala es conveniente el uso de métodos basados en fluorescencia, como es el caso del ensayo de Azul de Alamar. Este ensayo diseñado para medir células viables se basa en el uso del indicador redox resazurina, el cual puede ser reducido por el metabolismo activo a resorufina, ver Esquema 5. La resazurina es un tinte azul, permeable a las células y no fluorescente, mientras que el producto de su metabolismo, la resorufina, es de color rojo y altamente fluorescente, la cual puede cuantificarse usando un fluorómetro con una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Las principales ventajas del ensayo de

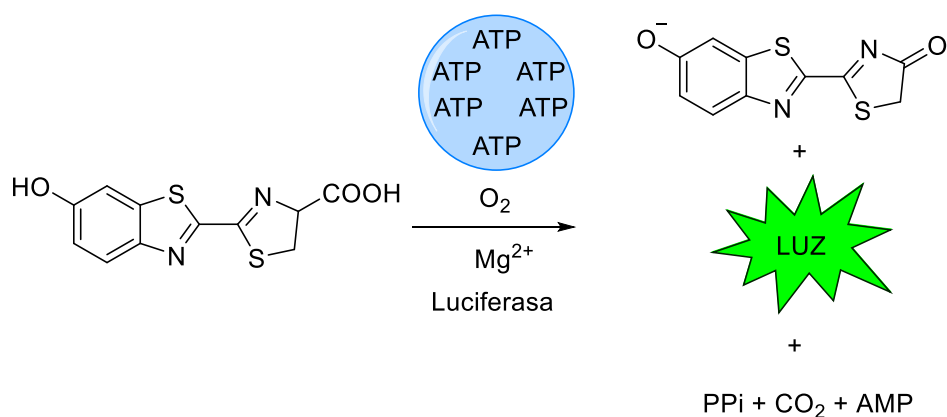
reducción de resazurina es que resulta relativamente económico, usa un formato homogéneo y resulta más sensible que los ensayos con sales de tetrazolio. Las desventajas de la resazurina incluyen la posibilidad de interferencia de la fluorescencia con el compuesto o tratamiento de prueba [79].



Esquema 5: Reducción de la resazurina a resorufina altamente fluorescente. Adaptado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

2.5.1.5. Ensayos luminométricos

Las células eucariotas que crecen *in vitro* contienen una cantidad relativamente constante de ATP. Este ATP puede ser cuantificado como una medida de la viabilidad celular, utilizando una reacción bioluminiscente entre el ATP, la luciferina y catalizada por la enzima luciferasa. Aunque la luciferasa ha sido usada por décadas para medir el ATP, recientes avances en el perfeccionamiento de la técnica han resultado en un protocolo que mantiene la señal luminiscente estable por horas. Este reactivo de detección de ATP contiene un detergente para destruir las células, inhibidores de la ATPasa para estabilizar el ATP liberado de las células, luciferina como sustrato, y una forma estable de luciferasa para catalizar la reacción que es capaz de generar fotones de luz, ver Esquema 6.



Esquema 6: Reacción de la luciferina con el ATP celular y catalizada por la luciferasa. Adaptado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

2.5.2. Citotoxicidad de mucílagos

El desarrollo de cualquier material con aplicaciones en biomedicina, industria farmacéutica o alimentaria requiere que posea una alta seguridad. Es por ello por lo que las pruebas de toxicidad para nuevos materiales o compuestos se vuelven elementos cruciales antes de diseñar futuras aplicaciones.

Los mucílagos y en general los polisacáridos no están exentos de presentar citotoxicidad, si bien la mayoría de los mucílagos se consideran altamente seguros en este sentido. Diversos estudios han llevado a cabo pruebas para determinar el posible daño celular que puedan ejercer estos compuestos e identificar riesgos potenciales o futuras aplicaciones. Por ejemplo, Ilango *et al.* estudiaron las propiedades del mucílago de *Coccinia grandis* con vistas a su utilización en la formulación de un excipiente farmacéutico, empleando células HEK para las evaluaciones de citotoxicidad. Los datos obtenidos por los autores revelaron que este mucílago no provocaba daños citotóxicos a las concentraciones empleadas (12.5-200 µg/ml), mostrando una viabilidad celular cercana al 100% [80]. También Carvalho *et al.* evaluaron los efectos del mucílago de *Pereskia aculeata* en búsqueda de propiedades cicatrizantes derivado de su uso etnobotánico, sin embargo, los efectos sobre un cultivo de células L929 fueron de carácter citostático más no hubo indicios de toxicidad [81]. Otro estudio demostró que el mucílago aislado de *Grewia optiva* a las dosis de 10, 20 y 30 µg/mL resultó no tóxico a la línea celular normal NIH3T3 [82].

Otros mucílagos, sin embargo, han evidenciado su actividad de aumento en la proliferación celular, lo cual posee implicaciones en sus usos como cicatrizantes. Hemmati *et al.* investigaron los efectos del mucílago de *Cydonia oblonga* en un rango de concentraciones de 50-400 µg/mL sobre la proliferación de la línea celular HNFF-P18 como un aspecto en el proceso de cicatrización, donde encontraron un incremento de la actividad proliferativa, sugiriendo su uso como agente cicatrizante [83]. También Lanzetta y colaboradores estudiaron las propiedades cicatrizantes del mucílago de *Opuntia ficus indica* a través de una monocapa de células HaCat, donde evidenciaron la estimulación celular y la actividad reparadora del mucílago [84].

La mayoría de los polisacáridos resultan ser no tóxicos y poseen actividad antitumoral. Este efecto antitumoral resulta de la capacidad de modular la respuesta inmune, debido a que no interactúan directamente en las células tumorales, pero juegan un importante papel activando el sistema inmunitario del organismo, promoviendo la maduración, diferenciación y reproducción de linfocitos, macrófagos y células *natural killer* [85]. Muchos polisacáridos de plantas poseen propiedades citotóxicas y antitumorales. Así lo demostró un estudio sobre los polisacáridos aislados de *Laminaria japonica*, los cuales demostraron un alto poder antiproliferativo contra células de carcinoma A375 [86]. De la planta *Hedysarum polybotrys* fue aislado un polisacárido que inhibió significativamente *in vitro* el crecimiento del carcinoma hepatocelular humano HEP-G2 y células de cáncer gástrico humano MGC-803, indicando su potencial terapéutico [87].

Con respecto a la especie *Q. funebris*, no existen hasta el momento reportes validados científicamente sobre las propiedades mecánicas, biológicas y actividad citotóxica de su mucílago. Si bien ha existido el consumo de la flor con distintos propósitos desde tiempos prehispánicos, el mucílago aislado de esta planta debe ser estudiado en virtud de las futuras aplicaciones y formas de administración en la industria farmacéutica y alimentaria.

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

El mucílago de las flores de *Quararibea funebris* estará formado por un heteropolisacárido, el cual será capaz de modificar las propiedades reológicas en medio acuoso y además será un material altamente seguro.

3.2. Objetivos

Para comprobar la veracidad de la hipótesis planteada se propuso el siguiente **objetivo general**: Aislar y caracterizar químicamente el mucílago presente en las flores de *Q. funebris*, así como determinar la influencia de factores químico-físicos sobre sus propiedades reológicas y evaluar su bioseguridad.

Para dar cumplimiento al objetivo general se diseñaron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Caracterizar mediante técnicas químicas y cromatográficas la composición del mucílago de *Q. funebris*.
- 2) Estudiar la influencia de la concentración, temperatura, pH y fuerza iónica sobre las propiedades al flujo de soluciones acuosas del mucílago de *Q. funebris*.
- 3) Evaluar la seguridad de la fracción mucilaginosa de *Q. funebris* a través de ensayos de citotoxicidad *in vitro* empleando células embrionarias de riñón humano (*HEK-293*).

4. Materiales y métodos

4.1. Material vegetal

Las flores de *Quararibea funebris* fueron colectadas en San Andrés Huayapam, Oaxaca (17°06.146', 096°39.847'). Una muestra de referencia se depositó en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Centro Médico Siglo XXI, con número de registro IMSSM16941. Las flores fueron secadas a la sombra y cortadas en pequeños pedazos manualmente.

4.2. Aislamiento y purificación del mucílago de *Q. funebris*

El aislamiento del mucílago se llevó a cabo siguiendo el procedimiento detallado en la sección 2.2.2. Brevemente se puede describir como sigue: se realizó una decocción de 10.0 g de flores secas y molidas con 200 ml de agua destilada (hasta cubrir la totalidad de la muestra), se mantuvo en ebullición la mezcla por 15 minutos y al final de este tiempo se permitió alcanzar la temperatura ambiente. Posteriormente se filtró el líquido viscoso de manera manual usando una tela de gasa para separar el resto del material vegetal. El extracto acuoso se precipitó con 100 ml de etanol absoluto, separándose una fracción mucilaginoso la cual se separó manualmente. Este procedimiento se realizó por triplicado. La fracción de mucílago separada se lavó tres veces con hexano y etanol, dejándose secar finalmente al aire para obtener un sólido de color amarillo oscuro.

4.3. Determinación de la composición del mucílago de *Q. funebris*

4.3.1. Análisis mediante Espectroscopía Infrarroja

La determinación de grupos funcionales en la fracción mucilaginoso de flores de *Q. funebris* fue llevado a cabo mediante el análisis de su espectro infrarrojo tomado en un espectrofotómetro Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR-ATR, con un rango de adquisición de entre 500 – 4000 cm^{-1} .

4.3.2. Análisis mediante CG-EM

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica y adquiridos en Sigma Aldrich. El mucílago (20.0 mg) se hidrolizó con ácido trifluoroacético 2M en exceso y se mantuvo en reflujo durante 6 horas para liberar las unidades de azúcares correspondientes. Luego de este tiempo se llevó a sequedad en un rotavapor y se obtuvieron los derivados sililados mediante reacción con el reactivo SigmaSil-A ® (mezcla de trimetilclorosilano: hexametildisilazano: piridina). Se calentó la mezcla a 60 °C por 10 minutos y luego se eliminó el exceso del reactivo a presión reducida. Para el análisis mediante CG-EM se disolvió la mezcla en diclorometano y se inyectó 1 μl mediante inyección automática en un cromatógrafo Perkin Elmer modelo Clarus 680-SQ8 con columna capilar HP-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm . La temperatura de inyección fue de 150 °C, la cual se mantuvo durante un minuto, luego se aumentó 25 °C/minuto hasta 300 °C durante 18 minutos para un tiempo total de corrida de 25 minutos. Se prepararon derivados sililados de estándares comerciales de ramnosa, glucosa, xilosa, galactosa, arabinosa y ácido galacturónico. De manera paralela se analizó una mezcla de *n*-alcanos C₁₄-C₃₀ para la obtención de los índices

de retención. La identificación de los componentes se llevó a cabo comparando los espectros de masas obtenidos con los reportados en la biblioteca NIST versión 2.2, tiempos de retención de los estándares y la consulta en literatura especializada. El porcentaje relativo de cada monosacárido se calculó en base a las áreas de los picos.

4.4. Estudio de las propiedades reológicas del mucílago de *Q. funebris*

Se evaluó la influencia de diversos factores sobre la viscosidad de soluciones acuosas del mucílago y cómo estos modificaban sus propiedades reológicas. El efecto de la concentración, la temperatura, el pH y la fuerza iónica fueron estudiados con este fin, siguiendo la metodología empleada por Medina *et al.* [21, 48, 88].

Para el estudio del efecto de la concentración y la temperatura sobre las propiedades reológicas, se prepararon soluciones acuosas del biopolímero a diferentes concentraciones en el rango de 0.5 hasta 3.0 % (m/m) disolviendo el biopolímero seco en agua caliente (80 °C) con agitación constante. En el estudio de la fuerza iónica (*I*) se emplearon soluciones de cloruro de sodio y cloruro de calcio, ambas con una concentración molar de 1.22 M, disolviéndose la cantidad necesaria del mucílago en estas soluciones salinas para alcanzar una concentración de 0.5 %.

Para el estudio del efecto del pH sobre la viscosidad de las soluciones del mucílago se emplearon una serie de soluciones amortiguadoras (SA), en las cuales el biopolímero fue disuelto hasta alcanzar una concentración del 0.5 %. Como referencia se tomó el pH de la solución 0.5 % de mucílago en agua destilada. Las soluciones amortiguadoras empleadas se prepararon según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y se listan a continuación:

SA de acetato de amonio-ácido acético - pH 3.0: En un matraz volumétrico de 1000 ml se disolvió 10.0 g de acetato de amonio en 80 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 3.0 con una solución de ácido acético 5.0 M y se llevó a volumen con agua destilada.

SA de fosfatos – pH 8.0: En un matraz volumétrico de 1000 ml, se disolvió 20.0 g de fosfato monobásico de potasio en 900 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 8.0 con ácido fosfórico y se llevó a volumen con agua destilada.

SA de fosfatos – pH 9: En un matraz volumétrico de 100 ml, se disolvieron 1.74 g de fosfato monobásico de potasio en 80 ml de agua. Se ajustó el pH con solución de hidróxido de sodio 1.0 M y se llevó a volumen con agua destilada.

4.4.1. Mediciones reológicas

Todas las mediciones reológicas fueron llevadas a cabo en un reómetro de esfuerzos controlados (TA Instruments, Mod. DHR3) usando una geometría cono/plato (ángulo = 2°, diámetro del plato = 60 mm, GAP = 60 µm) y un baño de control de temperatura. Las soluciones del mucílago fueron caracterizadas en flujo a la cizalla simple en función de su respuesta a la viscosidad en el rango de 0.1 a 300 s⁻¹. Por otro lado, las propiedades viscoelásticas, módulo de almacenamiento G' y módulo de pérdida G'' fueron

determinadas a partir de un flujo de corte oscilatorio de pequeña amplitud a frecuencias en el rango desde 0.1 hasta 300 rad/s.

La diferencia de esfuerzo normal primario (N_1) es una medida de las propiedades elásticas al fujo, esta medición fue realizada usando la misma geometría descrita anteriormente. Finalmente, para todas las mediciones reológicas, los valores reportados son el resultado de al menos tres réplicas.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo usando el software estadístico GraphPad Prism 9.

4.4.2. Estimación del peso molecular promedio

El peso molecular promedio del mucílago se determinó aplicando la ecuación de Mark-Houwink Sakurada, la cual relaciona la viscosidad intrínseca y el peso molecular.

$$\eta = KM^\alpha \quad (8)$$

Donde M es peso molecular promedio, mientras que K y α son parámetros constantes que dependen de la temperatura y las características del sistema soluto-solvente. Para la determinación se utilizó una solución 0.5 % (m/m) del mucílago de *Q. funebris* en agua destilada a una temperatura de 25 °C. Existen diversas publicaciones disponibles que detallan el fundamento matemático de esta aproximación [89, 90].

4.5. Evaluación citotóxica del mucílago de *Q. funebris*

La citotoxicidad del mucílago de *Q. funebris* se llevó a cabo midiendo la actividad metabólica celular, a través del método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y la línea celular HEK-293 (*Human embryonic kidney cell* en inglés). Este tipo de células ha sido ampliamente estudiada y caracterizada, empleándose como dianas para demostrar efectos citotóxicos de diversos compuestos químicos, además de ser una de las líneas celulares más utilizadas mundialmente por su resistencia, ser semiadherentes, de bajo mantenimiento y con rápida división, duplicándose aproximadamente cada 36 horas [91-93].

El cultivo de células HEK-293 fue sembrado en una monocapa (1×10^6 células por frasco de cultivo de 25 cm³). Las células se incubaron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium en inglés*) toda una noche a 37 °C en una incubadora Napco 3550, humidificada y con 5.0 % de CO₂. Una vez que los frascos fueron confluentes, las células fueron removidas con tripsina (0.25 % w/v) y contadas con una cámara de conteo Neubauer para ajustar la concentración a 10⁶ células/ml.

Luego, las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (10 000 células por pozo) y se dejaron en dichas condiciones toda la noche. Al día siguiente el mucílago de las flores de *Q. funebris* fue utilizado en las pruebas de citotoxicidad de acuerdo al método descrito por Meerloo *et al.* con algunas modificaciones [77]. Las células fueron tratadas con una solución acuosa del mucílago de *Q. funebris* y se evaluaron concentraciones de 5.0, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 y 0.04 mg/ml mediante diluciones seriadas. Un grupo de células

fueron tratadas con una solución acuosa de cafeína a 0.39 mg/ml como control de daño citotóxico [94, 95], mientras que se mantuvo otro grupo de células en DMEM como control positivo de crecimiento celular. Las células fueron incubadas a 37 °C por 48 horas, luego se agregó a cada pozo de la placa 20 µl de una solución de MTT en PBS (5.0 mg/ml) y se incubó por 2 horas (hasta que el color púrpura fuera visible bajo el microscopio). Después de esto, la solución de MTT fue retirada con cuidado de cada pozo y se agregaron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) con el objetivo de solubilizar los cristales de formazán, sometiendo la placa a agitación por 10 minutos en un agitador de microplacas IKA MS3.

Pasado este tiempo, la absorbancia de cada pozo fue medida a 565 nm en un lector de microplacas Bio-Rad 680. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células vivas presentes en cada pozo y puede ser usado para medir la viabilidad celular. El ensayo de viabilidad celular fue realizado por triplicado.

Como control positivo de crecimiento celular fueron usados grupos de células a concentración cero del tratamiento, mientras que como control negativo de crecimiento celular fue usado DMSO.

El porcentaje de viabilidad celular fue calculado considerando el 100 % de viabilidad celular en las células no tratadas. Los resultados se analizaron usando el software Graph Pad Prism versión 9.0, utilizando un análisis de varianza, seguido de una prueba de Dunnet ($p \leq 0.05$). Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media.

Los resultados de viabilidad celular se obtuvieron mediante la siguiente expresión:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{strat}} - \text{Abs}_{\text{DMSO}}}{\text{Abs}_{\text{cont}} - \text{Abs}_{\text{DMSO}}} \cdot 100 \quad (9)$$

Donde $\text{Abs}_{\text{strat}}$ es la media de absorbancia de los pozos con células tratadas, Abs_{cont} es la media de absorbancia de los pozos con células sin tratamiento y Abs_{DMSO} es la media de absorbancia del DMSO.

5. Resultados y discusión

El mucílago de las flores de *Q. funebris* se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo oscuro con un rendimiento promedio de 6.49 ± 0.09 % m/m en base al material vegetal seco. El mucílago por sus características se obtuvo como gránulos de una dureza apreciable, los cuales fueron reducidos a polvo con la ayuda de un mortero. La apariencia física del mucílago se puede apreciar en la Figura 11.



Figura 11: Aspecto físico del mucílago de *Q. funebris*

5.1. Composición química del mucílago de *Q. funebris*

5.1.1. Análisis mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica analítica ampliamente usada en la detección de grupos funcionales. El espectro IR obtenido del mucílago de *Q. funebris* se puede observar en la Figura 12.

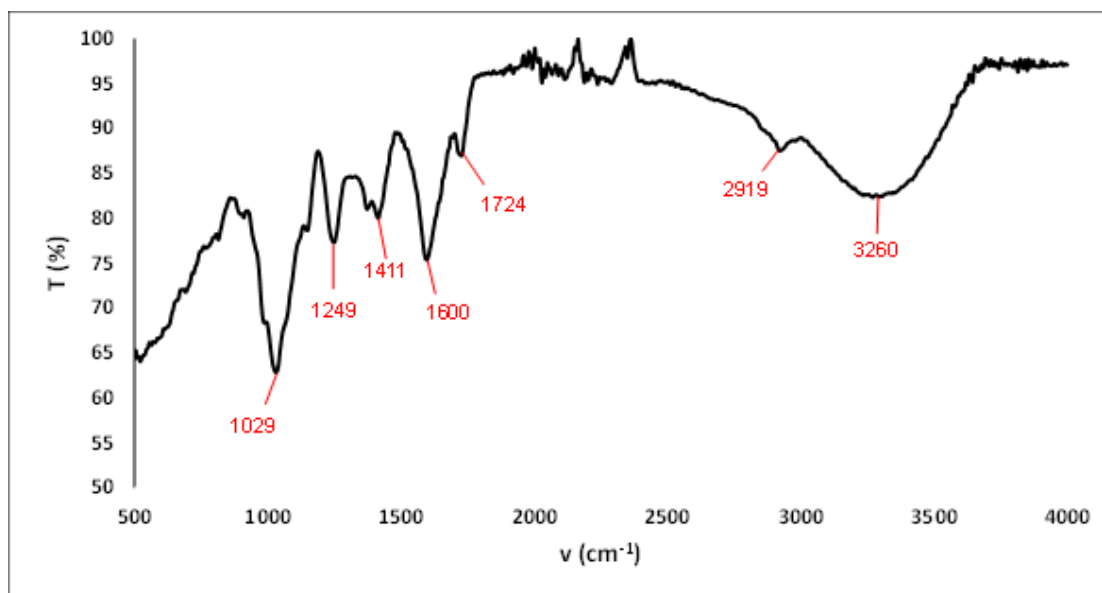


Figura 12: Espectro FTIR-ATR del mucílago de *Q. funebris*.

El espectro IR del mucílago muestra las bandas típicas de un polisacárido. La presencia de una banda ancha y centrada a 3260 cm^{-1} se atribuyó a la combinación de las vibraciones de grupos OH poliméricos tipo alcohol R-OH y los provenientes de residuos de ácidos carboxílicos (-C(O)-OH). Una señal débil a 2919 cm^{-1} es producto de los estiramientos asimétricos de los enlaces C-H. Las absorciones observadas a 1724 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} , así como la banda de intensidad media a 1411 cm^{-1} fueron asignadas a los estiramientos de los grupos carbonilo (C=O) y -COO- de los azúcares y de ácidos urónicos. La señal que aparece a 1249 cm^{-1} se atribuyó a las vibraciones de estiramiento características del anillo de piranosa, mientras que la banda intensa centrada a 1029 cm^{-1} se relaciona con el esqueleto del polisacárido [96, 97]. Las señales estructurales observadas en el espectro infrarrojo se encuentran en concordancia con las observadas para disímiles mucílago de plantas [49, 50, 82].

De los resultados evidenciados en el espectro IR se puede inferir que la gran presencia de grupos hidroxilos en estas macromoléculas y la alta capacidad de estos de formar puentes de hidrógeno brinda un indicio de sus buenas propiedades de bioadhesividad ya sea solo o en combinación con otros agentes para la formación de biopelículas o sistemas de liberación de fármacos [98].

5.1.2. Análisis mediante CG-EM

El primero paso en la elucidación estructural de un mucílago resulta en la determinación de los bloques de construcción que conforman la macromolécula. Con este objetivo, se llevó a cabo el análisis del mucílago mediante hidrólisis ácida, seguida de la obtención de sus derivados TMS para el posterior análisis mediante CG-EM. Un cromatograma de gases representativo se puede observar en la Figura 13.

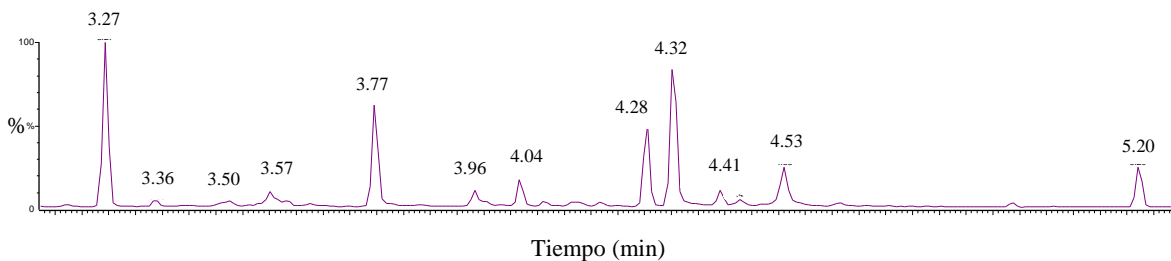


Figura 13: Cromatograma del mucílago de *Q. funebris* después de hidrólisis ácida y sililación.

En la figura anterior se aprecia que los productos de hidrólisis del mucílago resultan en una mezcla de mediana complejidad, con al menos cuatro componentes mayoritarios. Los espectros de masas mediante impacto electrónico de los monosacáridos-TMS fueron evaluados mediante comparación con los disponibles en la base de datos NIST. De igual manera la identidad de algunos de los componentes presentes fue confirmada mediante la comparación de los tiempos de retención y sus espectros de masas obtenidos con estándares de monosacáridos disponibles. Las diferencias estructurales entre los diferentes monosacáridos no son demasiado significativas para producir espectros de masas

marcadamente diferentes, si bien existen epímeros (por ejemplo: glucosa y galactosa en C4) y anómeros (por ejemplo: α -glucopiranososa y β -glucopiranososa). Es por esto por lo que la determinación de los índices de retención son un factor decisivo para poder diferenciar entre diferentes isómeros.

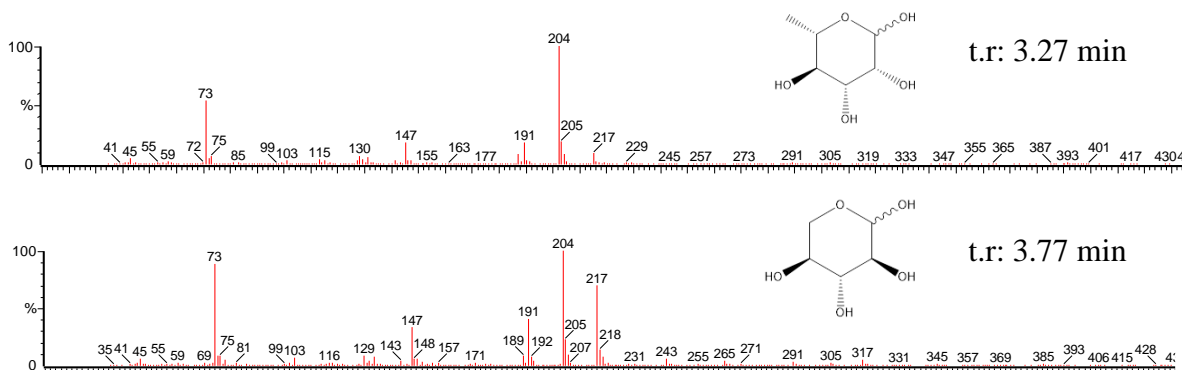
Del análisis del cromatograma mostrado en la Figura 13 y sus espectros de masas, se identificaron un total de siete carbohidratos, incluyendo cinco monosacáridos y un ciclitol. Los compuestos mayoritarios del mucílago de *Q. funebris* resultaron ser la ramnosa, xilosa, galactosa y glucosa, a la vez que se identificaron otros compuestos en menor proporción como son la alosa, el ácido galacturónico y *mio*-inositol, en base al porcentaje sobre las áreas de sus picos. Estos resultados se pueden resumir como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3: Composición del mucílago de *Q. funebris* basado en derivados TMS.

t. r ^{exp.} (min)	t. r ^{est.} (min)	IR ^{exp.}	IR ^{lit.}	Nombre carbohidrato-TMS	%	Método de identificación
3.27	3.26	1645	1658	Ramnosa	21.74	t.r., IR, EM
3.77	3.64	1763	1763	Xilosa	15.11	t.r., IR, EM
4.04	-	1828	1829	Alosa	3.68	IR, EM
4.28	4.27	1894	1898	Galactosa	12.03	t.r., IR, EM
4.32	4.38	1900	1895	Glucosa (α -piranososa)	22.16	t.r., IR, EM
4.53	4.64	1952	1943	Ácido galacturónico	8.35	t.r., IR, EM
5.20	-	2131	2130	<i>mio</i> -inositol	6.22	IR, EM

$t.r^{exp.}$ = Tiempo de retención experimental, $t.r^{est.}$ = Tiempo de retención del estándar,
 $IR^{exp.}$ = Índice de retención obtenido experimentalmente,
 $IR^{lit.}$ = Índice de retención reportado en la literatura, EM = Espectro de masas.

Los espectros de masas obtenidos para cada componente del mucílago estudiado se muestran en la Figura 14 a continuación. Como se puede apreciar, estos espectros de masas no muestran patrones de fragmentación lo suficientemente diferentes para ser usados como elementos definitorios en la elucidación estructural, esto debido a las pocas diferencias estructurales encontradas entre los monosacáridos y por consiguiente sus derivados de trimetilsilicio.



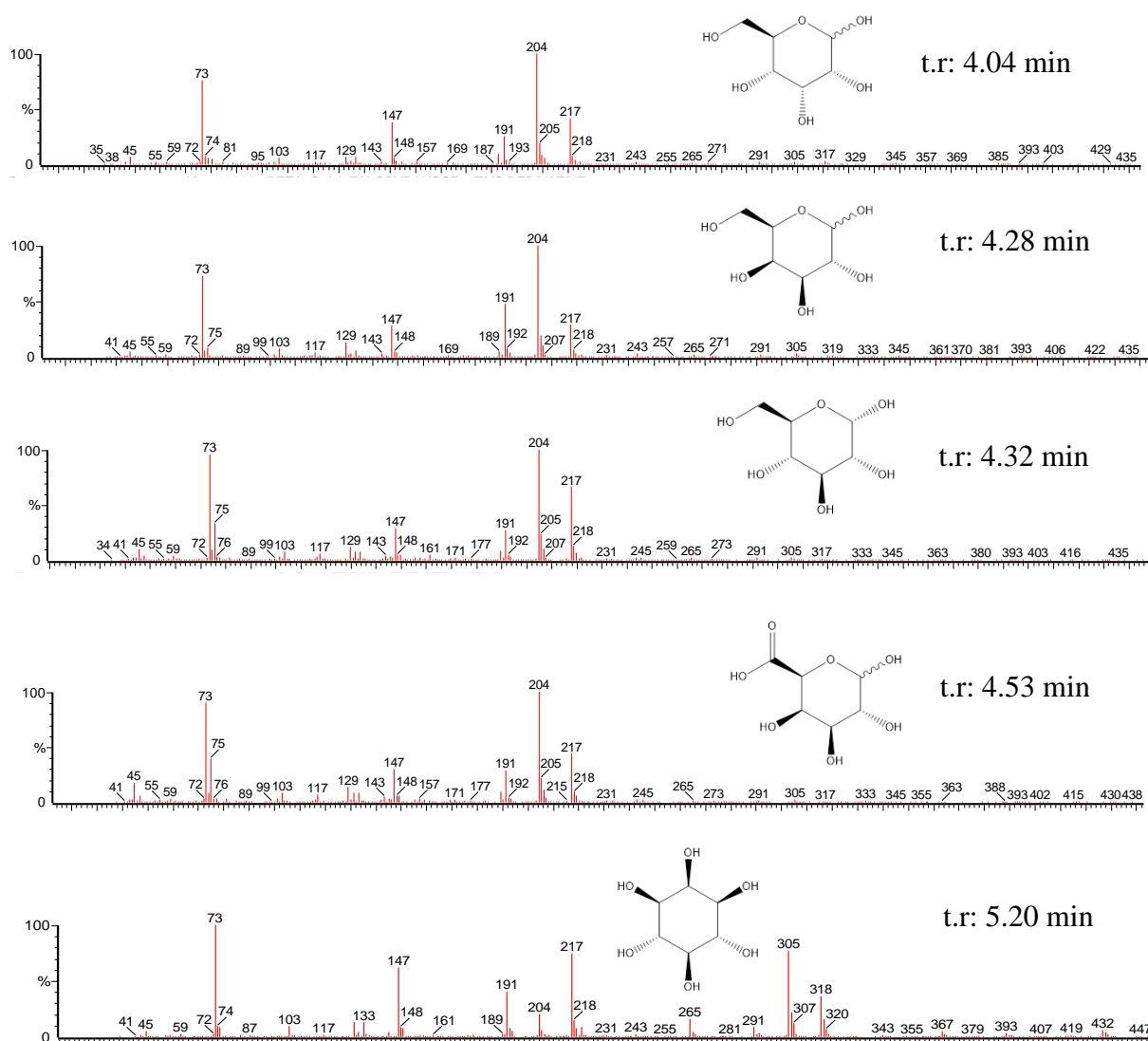
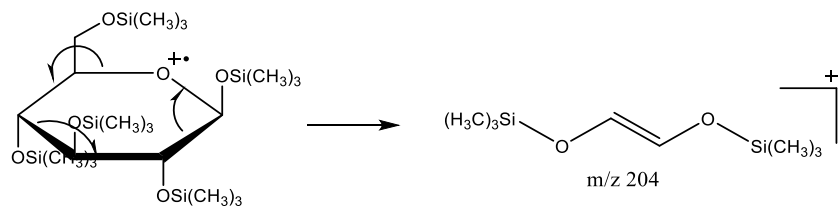


Figura 14: Espectros de masas por impacto electrónico de carbohidratos-TMS del mucílago de *Q. funebris*.

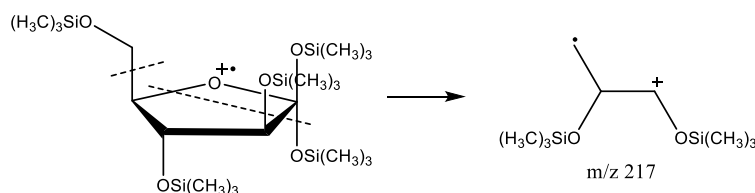
De manera general el ion molecular de los derivados TMS de carbohidratos se encuentra ausente en los espectros de masas, pero sus iones $[M-15]^+$ generalmente están presentes, al igual que sus productos de eliminación de TMS-OH de ambos M^+ y $[M-15]^+$. Debido a que la mayoría de estos compuestos son cíclicos, esto deja un amplio margen para reordenamientos de hidrógeno y TMS [99]. El espectro de masas de azúcares con anillo tipo pirano están mayormente caracterizados por el ion fragmento m/z 204, mientras que la fragmentación de anillos tipo furano está predominada por el ion m/z 217. De hecho, estos dos iones son claves para identificar azúcares en muestras naturales [100].

El ion m/z 204 es un fragmento de dos átomos de carbonos y proviene fundamentalmente de C₂-C₃ y C₃-C₄ en las piranosas de acuerdo con el Esquema 7:



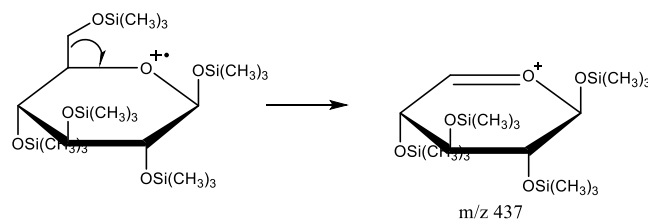
Esquema 7: Mecanismo de fragmentación propuesto para la formación del ion m/z 204 en derivados TMS de carbohidratos.

El ion a m/z 217 es un fragmento de tres carbonos, muy común en los espectros de carbohidratos y proviene fundamentalmente de C₂, C₃ y C₄ [101].



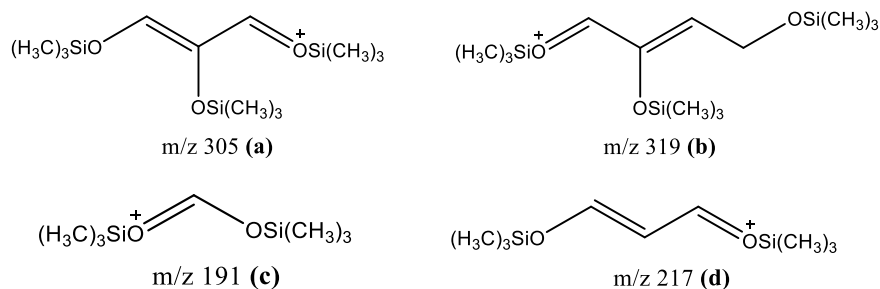
Esquema 8: Mecanismo de fragmentación propuesto para la formación del ion m/z 217 en derivados TMS de carbohidratos.

La pérdida de la unidad C₆ de las hexopiranosas y ácidos urónicos produce el ion a m/z 437, el cual puede eliminar una o dos moléculas de TMS-OH para dar m/z 347 y 257 respectivamente.

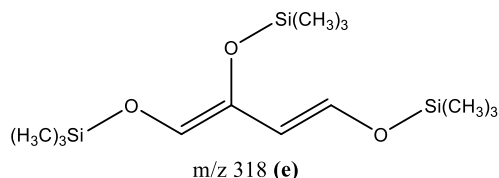


Esquema 9: Formación del ion m/z 437 a partir del derivado TMS de la glucosa.

La pérdida de las unidades C₅-C₆ conducen a m/z 408, el cual posee una baja abundancia relativa y es el progenitor de los iones m/z 305 (a), 319 (b), 191 (c) y 217 (d) [99].



La mayoría de estos iones se encuentran presentes en los espectros de los derivados TMS de inositoles. Sin embargo, el fragmento a m/z 318 (e), el cual es un fragmento minoritario en los espectros de las hexosas derivatizadas, resulta un ion mayoritario en los espectros de los inositoles-TMS [99].



Los resultados obtenidos durante el análisis de composición del mucílago de *Q. funebris* se encuentran en gran concordancia con las unidades de monosacáridos encontrados en otros mucílagos y gomas. Así por ejemplo, el mucílago de *O. ficus indica* en un estudio realizado por Medina-Torres *et al.* reveló estar formado principalmente por arabinosa, xilosa, galactosa, ramnosa y ácido galacturónico como estructura central, siendo los dos primeros los compuestos mayoritarios [21]. Al igual que el mucílago de *Q. funebris*, la cantidad de ácido galacturónico en *O. ficus indica* fue mucho menor comparado a los demás componentes. Cabe mencionar que, el rol de las unidades con grupos ácidos (carboxilo, sulfato) es relevante en las propiedades funcionales de los polisacáridos ya que influyen de manera directa en la viscosidad de sus soluciones. Por otro lado, el mucílago de *Plantago psyllium*, un polisacárido de alto valor comercial y farmacológico pertenece a la familia de los arabinosidos y está compuesto fundamentalmente por arabinosa y xilosa, lo cual representa un mucílago simple en términos de composición química [23]. El mucílago producido por la semilla de *Salvia hispanica*, con un alto valor comercial y alimenticio reveló en su composición xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa y los ácidos glucurónico y galacturónico, como las unidades constituyentes de esta macromolécula [22]. Por otra parte, el mucílago de *Q. funebris* no presentó en su composición el monosacárido manosa, una unidad muy común en algunos polisacáridos naturales, como en el mucílago de *Aloe vera*, el cual posee polisacáridos formados por manosa, glucosa y galactosa [102].

Destaca la presencia en el hidrolizado del mucílago de *Q. funebris* de *mio*-inositol, un compuesto perteneciente a la familia de los ciclitoles. Este tipo de carbohidratos no suelen ser comunes en la composición de los mucílagos. Sin embargo, se ha detectado su presencia en cantidades considerables en el mucílago de la planta carnívora *Drosera capensis*. Este compuesto es un metabolito primario y es el precursor directo del ácido glucurónico, un componente de diversos mucílagos. Estos autores sugieren que la presencia de este ciclitol puede estar asociada a su función como agente entrecruzante o hidrogelante entre las hebras de polisacárido en función de extensas redes mediante enlace de hidrógeno [103]. También se ha detectado este ciclitol como constituyente del exopolisacárido aislado del alga *Chlorella sorokiniana*, el cual en conjunto a otros monosacáridos forman una envoltura alrededor de esta y le permite llevar a cabo asociaciones simbióticas [104].

Si bien no existen estudios previos sobre el mucílago de *Q. funebris* o mucílagos de otras especies del género, se dificulta la comparación de los resultados obtenidos. Dentro de los resultados más cercanos taxonómicamente se encuentra un estudio llevado a cabo por

Rawat *et al.* sobre el mucílago de la especie *Hibiscus cannabinus* perteneciente a la familia Malvaceae, donde se reveló en su composición la presencia de glucosa, fructosa y xilosa [105], similar a los componentes encontrados en el presente estudio. De manera general los resultados de composición química y las unidades de monosacáridos identificadas en el presente estudio, no se desvían de los componentes identificados en otros mucílagos reportados en la literatura científica.

5.2. Estudio de las propiedades reológicas del mucílago de *Q. funebris*

5.2.1. Peso molecular promedio del mucílago de *Q. funebris*

A partir de la ecuación de Mark-Houwink Sakurada se estimó el peso molecular promedio del mucílago de *Q. funebris*, obteniéndose un valor de 17.5 kDa. Es necesario aclarar que el valor obtenido en este tipo de medición no es absoluto, ya que es dependiente del disolvente y la temperatura, por lo tanto, las mediciones de viscosidad proporcionan valores relativos. Sin embargo, la dependencia de la viscosidad (η) del peso molecular (M), lo convierte en un método simple y rápido para estimar este valor.

El peso molecular de los mucílagos puede variar en dependencia de las condiciones ambientales donde se encuentre la planta y también con el método de extracción empleado, siendo particularmente afectado por impurezas como proteínas y minerales. El mucílago estudiado presentó un peso molecular bajo en comparación a los reportados para otras especies como, por ejemplo: *Opuntia dillenii* (1900 kDa), *Salvia hispanica* ($3.8 \cdot 10^3$ kDa) y *Senna tora* (198 kDa) [90, 106, 107]. El peso molecular puede ejercer influencia en determinadas propiedades de importancia como la viscosidad, solubilidad, comportamiento mecánico, estabilidad y actividades biológicas. Por lo tanto, al diseñar o formular productos que involucren mucílagos, es fundamental considerar cómo el peso molecular afectará las propiedades y el desempeño del biopolímero en ese contexto particular.

5.2.2. Mediciones de flujo de cizalla

5.2.2.1. Efecto de la concentración sobre la viscosidad

En la Figura 15 se muestra una clara dependencia de la concentración sobre la viscosidad de soluciones del mucílago de *Q. funebris*, donde aumentando la concentración del mucílago aumenta significativamente su viscosidad a la cizalla simple. Los mucílagos son polisacáridos con gran cantidad de grupos hidroxilo (OH^-) en su estructura molecular, por lo que a medida que se incrementa la concentración, las interacciones por puentes de hidrógeno serán cada vez mayores, potenciando su resistencia a fluir.

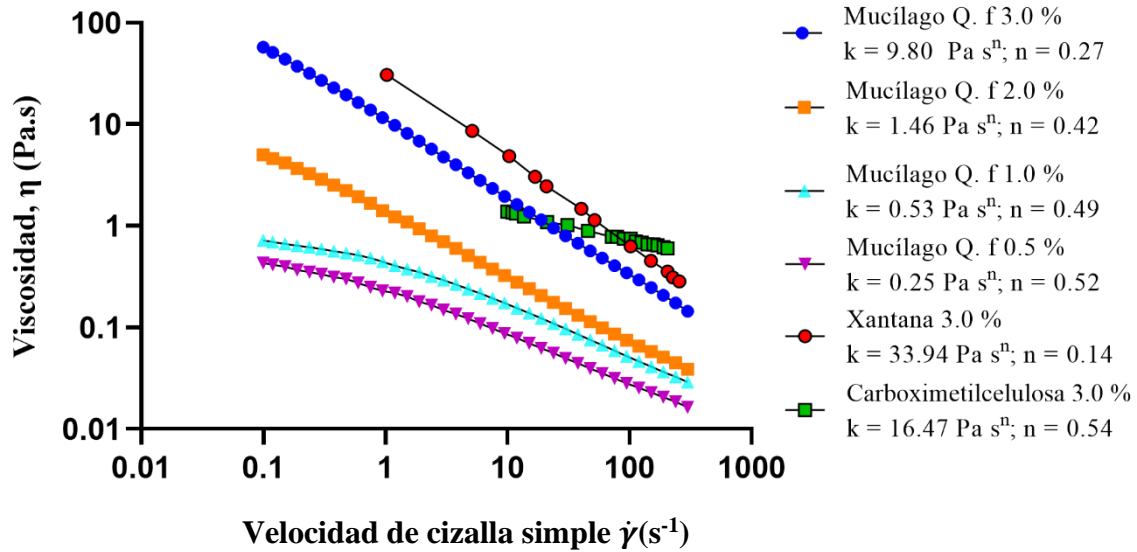


Figura 15: Efecto de la concentración en la viscosidad de soluciones acuosas de mucílago a 25°C. Datos de xantana y carboximetilcelulosa insertados como comparación.

Las curvas de viscosidad a la cizalla simple mostradas anteriormente reflejan que las soluciones acuosas del mucílago se comportan como un fluido adelgazante al flujo ($n < 1$), lo cual significa que su viscosidad disminuye al aumentar la velocidad a la cizalla. El comportamiento mostrado por las soluciones de este biopolímero se puede ajustar adecuadamente al modelo de Ostwald-de Waele o “ley de potencia”, mostrado en la Tabla 2 y que se presenta a continuación:

$$\eta = k\dot{\gamma}^{n-1} \quad (10)$$

Donde k es el índice de consistencia del flujo (Pa.sⁿ), el cual indica la consistencia del fluido; es decir, si el valor de k es alto, el fluido es más “viscoso” y viceversa. Por otra parte, n es el índice de comportamiento de flujo y representa la desviación del comportamiento del fluido respecto al comportamiento newtoniano. Si el valor de n es 1, se trata de un fluido newtoniano, mientras que, si el valor de n se encuentra entre 0 y 1, se trata de un fluido adelgazante al flujo (pseudoplástico) siendo obtenidos estos parámetros a través de un análisis de regresión lineal.

Los datos experimentales obtenidos para el mucílago estudiado revelan que los valores de k aumentan a medida que la concentración de mucílago se hace mayor. Por otra parte, todas las soluciones estudiadas muestran valores de $n < 1$, lo cual de acuerdo con el modelo indica un comportamiento adelgazante al flujo (pseudoplástico), y la tendencia observada en este caso es que a medida que aumenta la concentración del biopolímero disminuye el índice de comportamiento de flujo.

Diversos estudios reportados en la literatura para mucílagos de otras plantas pertenecientes a distintas familias, han mostrado tendencias semejantes al comportarse sus soluciones como adelgazantes de flujo, por ejemplo, el mucílago de *Opuntia ficus indica* mostró valores de k en el rango de 0.15-25.47 Pa.s⁻ⁿ y n entre 0.56-0.22, para concentraciones entre

1-10.0 % (m/m) [21]. Un comportamiento semejante fue encontrado al estudiar el mucílago de *Alyssum homolocarpum*, los valores de los índices de comportamiento de flujo, n , fueron inferiores a 1, en un rango de 0.39-0.33 para un rango de concentraciones estudiadas de 1.5-4.0 %. El aumento de la concentración de esta goma disminuyó los valores del índice de comportamiento de flujo y aumentó el coeficiente de consistencia desde 2.61 hasta 26.30 Pa.sⁿ [47]. En la Figura 15 se comparó la respuesta del mucílago de *Q. funebris* estudiado con otros biopolímeros de importancia comercial, donde una solución de goma xantana 3.0 % y carboximetilcelulosa 3.0 % (CMC), también muestran propiedades adelgazantes al flujo ($n < 1$) y de una manera comparable al mucílago de *Q. funebris*.

Así pues, los valores bajos de los índices de comportamiento del flujo representan la gran desviación del flujo del comportamiento newtoniano y, como muchos otros hidrocoloides, tienen una alta viscosidad a bajas velocidades de cizallamiento la cual disminuye drásticamente a medida que aumenta el flujo a la cizalla. Se ha reportado que un comportamiento no newtoniano se vuelve importante cuando el índice de comportamiento de flujo es inferior a 0.6 [108].

En la Tabla 4 se comparan los datos obtenidos de índice de consistencia e índice de comportamiento de flujo del mucílago de *Q. funebris* estudiado respecto a otros mucílagos estudiados por diversos autores, a concentraciones iguales a 1.0 % en todos los casos. Los valores de n y k dependen de la naturaleza del mucílago en cuestión, pero esta comparación nos puede brindar una idea a la hora de explotar recursos naturales con aplicaciones industriales. En este sentido se observa que, el mayor valor de índice de consistencia y el menor de índice de comportamiento de flujo de los mostrados corresponde al mucílago de *Salvia hispanica*, lo cual indica que, para obtener un sistema con una viscosidad determinada y comportamiento adelgazante al flujo, será este mucílago el cual lo logrará con la menor cantidad de biopolímero, representando un ahorro considerable de materia prima y preservación de los recursos naturales.

Tabla 4: Parámetros n y k de soluciones de mucílagos al 1.0 % a 25 °C.

Mucílago 1%	k (Pa s ⁿ)	n	Referencia
<i>Q. funebris</i>	0.53	0.49	Este estudio
<i>O. ficus indica</i>	0.15	0.56	[21]
<i>Salvia hispanica</i>	2.43	0.44	[42]
<i>Hoheria populnea</i>	1.04	0.60	[26]

5.2.2.2. Efecto de la temperatura sobre la viscosidad

El efecto de la temperatura en las propiedades reológicas de los biopolímeros se puede manifestar durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos y formulaciones que los contengan. En base a esto, se evaluó el efecto de la temperatura sobre el perfil de viscosidad a la cizalla simple en soluciones del mucílago de *Q. funebris*, estudiándose su comportamiento a 15, 25, 37 y 45 °C, y modelándose de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (1):

$$\eta = A \exp\left[\frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T}\right)\right] \quad (1)$$

$$\log \eta = \log A + \frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (11)$$

Al incrementarse la temperatura desde 15 a 45 °C manteniendo una concentración fija se observó una disminución en la viscosidad de las soluciones del mucílago. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Arrhenius, con un coeficiente de correlación ($R^2 > 0.98$), ver Ecuación 11. A partir de esta ecuación se obtuvieron los parámetros de energía de activación al flujo (Ea) y una constante (A), siendo la Ea la que refleja la energía necesaria para el movimiento de las unidades del biopolímero bajo flujo de cizalla. Es decir, a mayores valores de Ea corresponde un cambio más rápido de la viscosidad con la temperatura. La Figura 16 muestra la relación $\log \eta$ vs. $1/T$ para soluciones de 0.5, 2.0 y 3.0 % (m/m) de mucílago de *Q. funebris* en agua a una velocidad de cizalla de 30 s^{-1} . Mediante un análisis de regresión lineal se determinaron los valores de Ea y A . Un alto valor de R^2 indica que los datos de viscosidad obtenidos en función de la temperatura se ajustan adecuadamente la ecuación de Arrhenius.

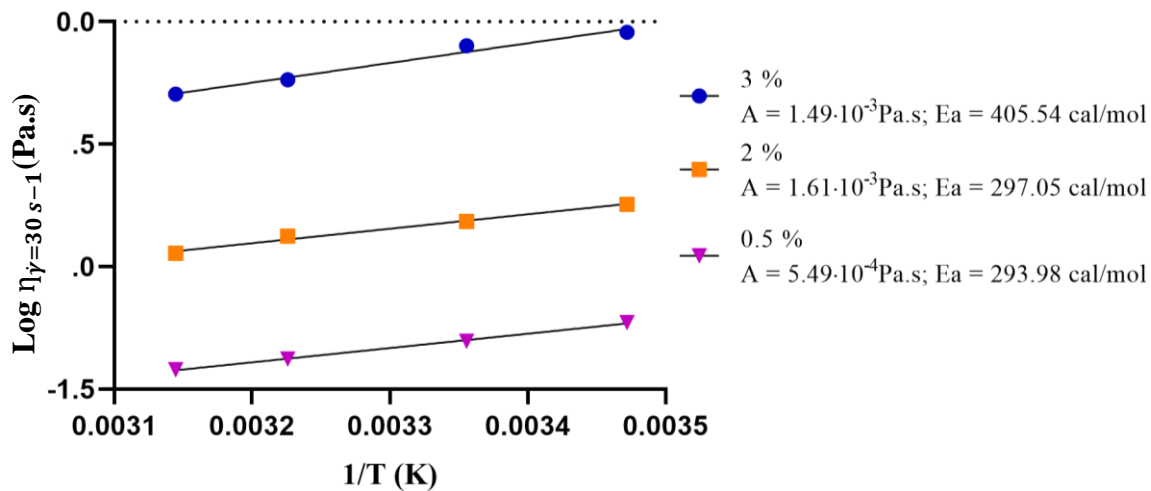


Figura 16: Efecto de la temperatura sobre la viscosidad de soluciones acuosas de mucílago. Datos a velocidad de cizalla = 30 s^{-1} .

Las soluciones de mucílago de 0.5-2.0 % muestran valores de Ea muy similares y comparables, según se observa en la Figura 16, indicando que la temperatura no afectará la viscosidad a estas concentraciones. Por otro lado, la solución de mucílago al 3.0 % presentó el mayor valor de Ea con un valor de 405.54 cal/mol. Esto indica que la solución de mucílago al 3.0 % variará en menor grado su viscosidad con la variación de la temperatura. La Tabla 5 muestra, a modo de comparación, los valores de Ea para algunos mucílagos reportados en la literatura, así como de algunos biopolímeros de importancia comercial. Como se observa, existe una gran diferencia entre los valores reportados para diferentes biopolímeros y el obtenido para el mucílago de *Q. funebris* al 3.0 %. Esto indica que las soluciones del mucílago estudiado presentan poca estabilidad térmica en cuanto a su viscosidad.

Tabla 5: Valores de energía de activación al flujo para diferentes biopolímeros

Solución de Mucílago 3.0 %	E_a (cal/mol)	Referencia
<i>Q. funebris</i>	405.54	Este estudio
<i>O. ficus indica</i>	1280.00	[21]
<i>Pereskia aculeata</i>	1080.00	[109]
<i>Alyssum homolocarpum</i>	1565.55	[47]
Pectina	7982.79	[110]
Carragenina	13121.41	[110]
Gelatina	4015.30	[110]

5.2.2.3. Efecto del pH sobre la viscosidad

El efecto del pH sobre la viscosidad de la solución de mucílago de flores de *Q. funebris* al 0.5 % fue determinado. Los datos de viscosidad obtenidos a una velocidad de cizalla fija de $\dot{\gamma} = 30 \text{ s}^{-1}$ fueron graficados vs. pH del medio, obteniéndose el perfil del efecto del pH mostrado en la Figura 17.

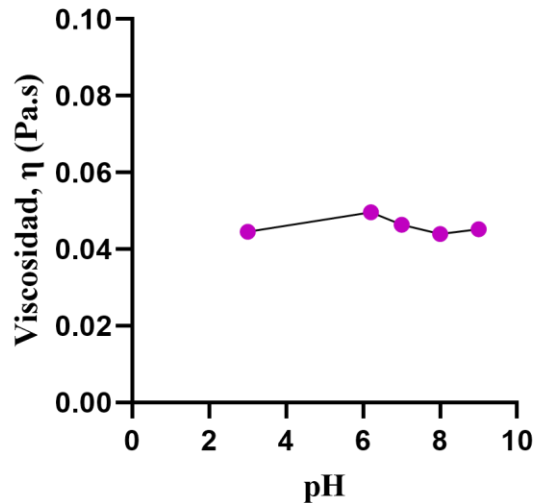


Figura 17: Efecto del pH sobre la viscosidad de una solución de mucílago al 0.5 %. Datos a 25 °C y a $\dot{\gamma} = 30 \text{ s}^{-1}$

La variación de la viscosidad no fue muy significativa según se puede apreciar, aunque se observó un decaimiento en la viscosidad tanto a pH ácido como básico. A valores de pH por debajo de 6.0, la supresión de las cargas resulta en una conformación del biopolímero más pequeña, conduciendo a una reducción de la viscosidad [21, 48]. Esto posiblemente se deba a que a valores de pH mayores ocurren reacciones de despolimerización alcalina. Un estudio llevado a cabo por BeMiller reporta la influencia del pH sobre las pectinas, indicando que a pH por encima de 6.0, ocurren importantes reacciones de despolimerización, incluso a temperatura ambiente, aumentando la velocidad de estas con el aumento de la alcalinidad [111]. Otro estudio llevado a cabo por Biliaderes y Fedeniuk ensayó las propiedades del mucílago de *Linum usitatissimum*, donde se encontró que estaba compuesto por ramnosa,

fucosa, arabinosa, xilosa, galactosa y ácido galacturónico. El efecto del pH sobre la solución al 1.0 % de este mucílago reveló un comportamiento similar al observado en el mucílago de *Q. funebris*, reflejando un pico de viscosidad alrededor de $\text{pH} = 6$ y decreciendo a ambos lados de la escala. Estos autores también atribuyen esta disminución de la viscosidad a pH básicos debido a reacciones de despolimerización [112].

Estos fenómenos no se evidencian de igual manera en otros mucílagos y gomas reportados en la literatura, así por ejemplo, el mucílago de *Opuntia ficus indica* alcanza su mayor valor de viscosidad a $\text{pH} = 9$ y su menor valor a $\text{pH} = 2$ [21]. Esto se encuentra estrechamente relacionado con la estructura intrínseca del biopolímero y las conformaciones adoptadas por este en el medio acuoso.

5.2.2.4. Efecto de la fuerza iónica sobre la viscosidad

El efecto de la fuerza iónica sobre la viscosidad de las soluciones de mucílago es importante para determinar si el mucílago se comporta como una molécula polielectrolítica, y también para estimar propiedades reológicas funcionales. Se ha evidenciado que la viscosidad de moléculas cargadas muestra una fuerte dependencia de la concentración iónica del medio. Los datos obtenidos del comportamiento de flujo fueron ajustados al modelo de ley de la potencia con valores de R^2 superiores a 0.99. Las curvas de flujo, así como los valores de índice de consistencia e índice de comportamiento se muestran en la Figura 18. La adición de iones Na^+ y Ca^{2+} , provocó una reducción en la viscosidad con respecto a la solución del mucílago en medio acuoso, lo cual queda demostrado a través de la disminución de los índices de consistencia de flujo k que varían desde $0.25 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ inicialmente hasta $0.07 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ con la adición de Ca^{2+} . Los resultados obtenidos demuestran que tanto iones monovalentes como iones divalentes son capaces de reducir la viscosidad de las soluciones del biopolímero, estos resultados sugieren que la estructura molecular del mucílago de *Q. funebris* se comporta como un polielectrolito cargado negativamente, por lo que la adición de iones positivos reduce la repulsión y la expansión molecular, causando una disminución de la viscosidad. El análisis de la composición del mucílago reveló la presencia de ácido glucurónico en pequeñas cantidades como fragmento de la estructura del mucílago, siendo el componente responsable de la variación observada en la viscosidad al modificarse por la presencia de iones.

Por otra parte, el índice de comportamiento de flujo n se vio aumentado al agregarse al medio iones Na^+ y Ca^{2+} de forma independiente, manteniendo las propiedades adelgazantes al flujo. Los resultados indican que la presencia de iones mono- y divalentes reducen la naturaleza pseudoplástica de las soluciones del biopolímero extraído de *Q. funebris*, siendo este efecto mayor en presencia de iones divalentes (Ca^{2+}). Esto debido a que la fuerza iónica es función de la carga eléctrica de los iones presentes, siendo mayor para iones divalentes que monovalentes a concentraciones de sales equimolares.

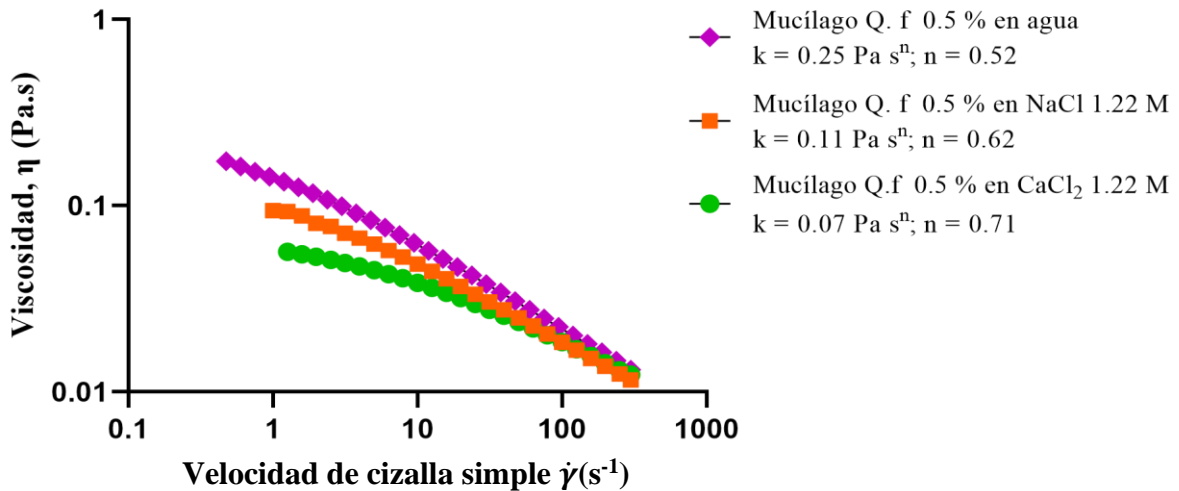


Figura 18: Efecto de la fuerza iónica sobre la viscosidad de una solución de mucílago al 0.5 %. Datos a 25 °C.

Efectos similares han sido observados en otros mucílago estudiados, por ejemplo, Alpizar-Reyes *et al.* demostraron que la viscosidad de las soluciones del mucílago de tamarindo disminuía notablemente en presencia de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , asimismo observaron que la adición de las sales disminuía la naturaleza pseudoplástica de las soluciones del mucílago, incluso llegando a tener comportamientos cercanos al Newtoniano a concentraciones mayores de sales [113]. Taherian *et al.* demostraron también que la viscosidad de las soluciones del mucílago de *Alyssum homolocarpum* decaían con la adición de sales (Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y Mg^{2+}), aumentando este efecto con la concentración salina. Los autores concluyeron que este comportamiento proviene de la formación de contraiones con los residuos ácidos en la molécula polimérica, lo que conduce a una disminución en las repulsiones electrostáticas de los grupos cargados en las cadenas del polímero [47]. Medina-Torres *et al.* evaluaron el efecto de la fuerza iónica en soluciones del mucílago de nopal encontrando que la reducción de la viscosidad era más dependiente de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} que de los iones Na^+ y K^+ . De manera similar estos autores explican el efecto observado a través de la formación de pares iónicos y la disminución de las repulsiones internas [21].

5.2.2.5. Propiedades elásticas al flujo de cizalla simple

El estudio de las propiedades elásticas de los materiales resulta de una gran importancia para aplicaciones industriales. La recuperación de las propiedades elásticas del mucílago de flores de *Q. funebris* aislado se manifestó a través del efecto Weissenberg con un incremento de la diferencia normal (N_1) bajo flujo de cizalla simple. Es conocido que las propiedades elásticas han sido la razón de la elaboración de productos a base de mucílago de nopal, como champús y pinturas. El efecto Wissenberg se manifestó en todo el intervalo de concentraciones estudiado para el mucílago de *Q. funebris*, siendo más evidente a una concentración de 3.0 %, lo cual indica que este efecto es dependiente de la concentración de mucílago y aumenta con esta. Sin embargo, este efecto observado fue mucho menor en

comparación con el obtenido para una solución del mucílago de *Opuntia ficus indica* al 10.0 % y su comparación con un estándar comercial de poliisobutileno, conocido por sus excelentes propiedades elásticas (datos obtenidos por Medina-Torres *et al.* [21]). Estos resultados se ilustran en la Figura 19.

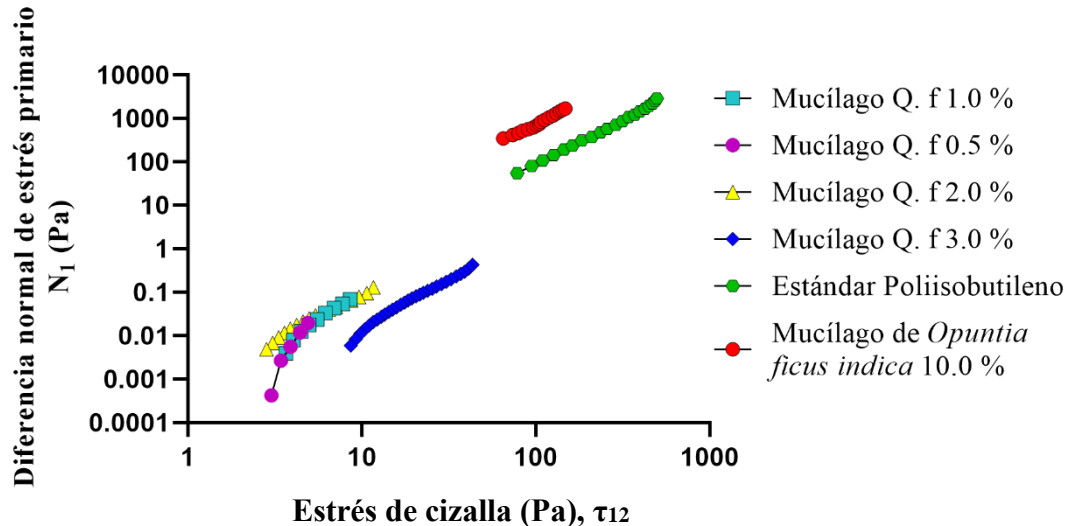


Figura 19: Diferencia normal de estrés primario en función del estrés de cizalla y la concentración del mucílago. Datos de poliisobutileno y mucílago de *O. ficus indica* insertados para comparación.

Otras soluciones de mucílagos han evidenciado similares propiedades elásticas al flujo, así, por ejemplo, el mucílago de pitahaya (*Hylocereus undatus*) en un rango de concentraciones de 6.0-8.0 % exhibe un diferencia normal de alrededor de 0.1 Pa, comparable al mucílago de *Q. funebris* estudiado [88]. También el mucílago de *Aloe vera* a una concentración de 0.05 % demostró propiedades elásticas entre 0.01 y 0.1 Pa, similares a las obtenidas en este trabajo de investigación [48]. Las propiedades elásticas pueden variar de un mucílago a otro, e incluso para un mismo mucílago de una especie determinada si es obtenido por diferentes métodos, siendo la estructura intrínseca y la conformación adoptada por el biopolímero los factores determinantes que exhiben la elasticidad al flujo [21, 48, 88].

5.2.3. Mediciones de flujo oscilatorias

5.2.3.1. Efecto de la concentración

El comportamiento viscoelástico de las soluciones del mucílago de *Q. funebris* en función de la concentración se presentan en la Figura 20. Se puede observar que, para todas las concentraciones estudiadas, tanto el módulo elástico o de almacenamiento (G') y el módulo viscoso o de pérdida (G''), muestran una dependencia con la frecuencia oscilatoria, siendo este efecto más marcado para la solución de mucílago al 0.5 %. Además, se observa un incremento de ambos módulos con la concentración, debido a la formación de estructuras cada vez más complejas en solución con el aumento de la concentración, con una conformación de hebra aleatoria. Es decir, a bajas concentraciones, existen muchas regiones intermoleculares que no pueden participar en las uniones no-covalentes, mientras que a mayores concentraciones se formarán el máximo número de uniones posibles [50]. Asimismo, se observa que, con el incremento de la concentración, la diferencia entre G' y

G'' se vuelve mayor, especialmente a altas frecuencias, indicando una clara tendencia a la formación de redes intermoleculares.

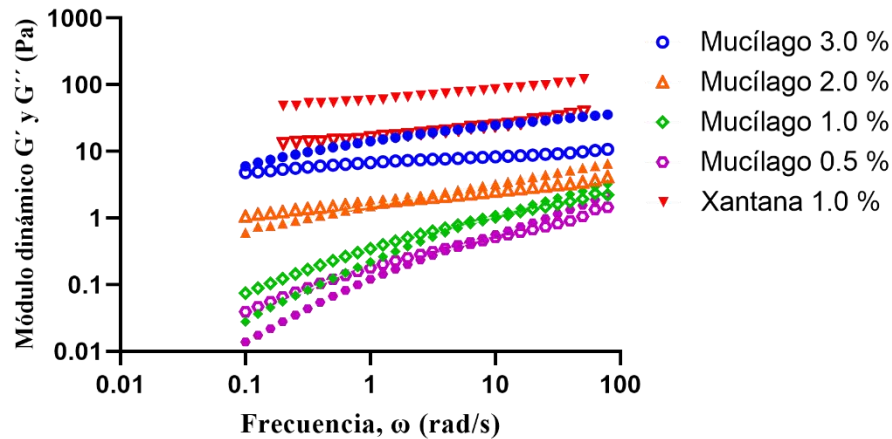


Figura 20: Dependencia del módulo de almacenamiento G' (símbolos llenos) y pérdida G'' (símbolos vacíos) de la frecuencia para diferentes concentraciones de mucílago. Datos a 25 °C.

Además, para concentraciones menores a 3.0 %, G'' es siempre superior a G' , indicando una prevalencia del comportamiento viscoso a estas concentraciones, similar a los resultados reportados para el mucílago de nopal [21]. Esto implica que durante el uso del mucílago de *Q. funebris* en una aplicación determinada y a concentraciones por debajo de la señalada, las soluciones mostrarán mayores propiedades viscosas y un comportamiento tipo líquido viscoelástico. Por otro lado, con el incremento de la concentración de mucílago, G' se vuelve superior a G'' , indicando una clara tendencia a manifestar propiedades elásticas, con la formación de extensas redes macromoleculares y un comportamiento tipo gel débil.

También se puede observar que para concentraciones menores a 3.0 % existe un punto de cruce entre ambos módulos G' y G'' , el cual se recorre a la izquierda según aumenta la concentración de mucílago, lo cual indica que a bajas concentraciones ocurren cambios conformacionales en la solución del biopolímero, provocando transiciones entre el comportamiento viscoelástico. El conocimiento de estos datos es de gran importancia para el desarrollo de productos con características reológicas específicas, ya que dependiendo de las condiciones del proceso de producción el sistema manifestará distintos comportamientos viscoelásticos, influyendo en la calidad del producto final.

Los resultados obtenidos para el mucílago de *Q. funebris* resultan ser bastante similares en comparación a los comportamientos viscoelásticos evidenciados por otros polisacáridos. Así, por ejemplo, la goma xantana, un importante bioplímero comercial, el cual exhibe un comportamiento semejante al mostrado por la solución de mucílago de *Q. funebris* al 3.0 %. Las propiedades elásticas de la goma xantana son las responsables de la gran capacidad de sus soluciones para suspender sólidos en el medio acuoso donde esta goma interviene, siendo una propiedad física altamente explotada para propósitos comerciales en diversas formulaciones [61]. En la figura 20 se comparan los datos reológicos para una solución de goma xantana al 1.0 % (Tomado de Medina-Torres *et al.* [21]). Finalmente, estudios reológicos realizados al mucílago de nopal demostraron un comportamiento muy similar al mucílago de *Q. funebris*, indicando de igual manera la prevalencia de propiedades viscosas

a bajas concentraciones y propiedades elásticas por encima de cierto valor de concentración [21]. Otros mucílago como el de pitahaya han mostrado también una tendencia en mayor grado a la formación de sistemas donde predomina el componente viscoso respecto al elástico. En cambio, el mucílago de *Alyssum homolocarpum* en un rango de concentraciones de 0.5-5.0 % mostró predominantemente un comportamiento elástico con tendencia a la formación de un gel débil [50]. De manera similar el mucílago de chíá mostró un comportamiento tipo gel para concentraciones entre 0.25 y 1.0 % [42].

5.2.3.2. Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre los módulos elástico G' y viscoso G'' de una solución de mucílago de *Q. funebris* al 3.0 % también fue notable, y este se puede apreciar en la Figura 21.

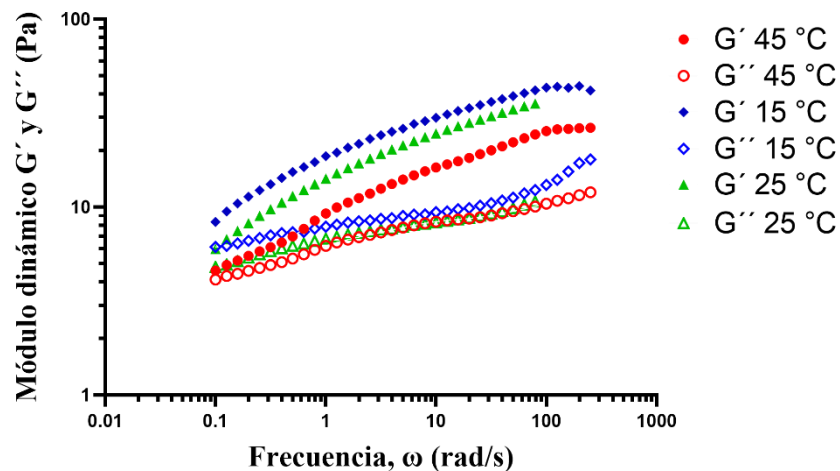


Figura 21: Efecto de la temperatura sobre el módulo dinámico de una solución de mucílago al 3.0 %.

Nuevamente se observa la dependencia de estos módulos respecto a la frecuencia en función de la temperatura. A medida que se incrementa la temperatura, la magnitud del módulo viscoelástico disminuye, sin embargo, el módulo elástico G' se mantiene siempre superior a G'' a lo largo de todo el rango de frecuencias y temperaturas, lo cual es indicativo de que a esa concentración del mucílago de *Q. funebris* el comportamiento tipo gel débil se preserva incluso a altas temperaturas y las conformaciones de sus estructuras no sufren demasiados cambios estructurales. En el rango de la temperatura evaluado no se observan puntos de cruce, lo cual es evidencia de la estabilidad térmica de la muestra y, además, no se observan cambios conformacionales a las condiciones impuestas. Comportamientos similares se han observado en el mucílago del *Assylum homolocarpun*, el cual preserva sus propiedades viscoelásticas en un amplio rango de temperaturas [50]. También fue observado un efecto similar en el mucílago de *O. ficus indica* al estudiarse en un rango de temperaturas desde 5 - 35 °C, donde los autores exponen que este efecto es característico de soluciones de polisacáridos con conformaciones de hebra aleatoria [21].

Estas características evidenciadas por el mucílago estudiado implican que, para una determinada aplicación de este, existe un amplio rango de flujo y temperatura en soluciones

concentradas en las que este polisacárido mantiene sus propiedades elásticas tipo gel débil. Esto puede tener un impacto positivo en las condiciones de almacenamiento de una determinada formulación a base de este mucílago, no siendo necesario un control demasiado estricto para mantener sus propiedades elásticas ($G' > G''$).

De manera general, los experimentos reológicos realizados a las soluciones del mucílago de *Q. funebris* revelaron información de interés para futuras aplicaciones, tratándose de soluciones pseudoplásticas (adelgazantes al flujo) con una notable viscosidad, evidenciando su posible utilización como agente espesante en diferentes formulaciones. Además, la viscosidad de estas soluciones de mucílago mostró baja estabilidad térmica respecto a otros mucílagos conocidos, lo cual indica la necesidad de un control estricto de temperatura en productos formulados con este mucílago. Por otra parte, factores químicos como la presencia de iones metálicos y la variación del pH del medio no afectaron significativamente la viscosidad de las soluciones del mucílago, lo cual es un indicador positivo para la formulación de productos dentro de la industria farmacéutica y alimentaria. Las pruebas oscilatorias, de manera conjunta con los datos de esfuerzo normal, evidenciaron las propiedades elásticas al flujo para las soluciones de mayor concentración de mucílago, en las cual se preservó el comportamiento tipo gel débil con la variación de la temperatura. La elasticidad de formulaciones viscoelásticas se debe a la deformación elástica de las macromoléculas, favoreciéndose esta característica si los materiales están constituidos por moléculas de cadena larga cuyos enlaces puedan rotar libremente y si presentan fuerzas intermoleculares débiles, como lo es el mucílago estudiado. Dicha propiedad elástica puede ser explotada en su utilización como agente gelante de manera aislada o combinada con otros productos que intensifiquen dicho efecto. En resumen, los experimentos reológicos llevados a cabo con las soluciones de mucílago de *Q. funebris* han revelado propiedades atractivas con un potencial significativo en diversas aplicaciones industriales. Sin duda, este estudio proporciona un sólido punto de partida para explorar aún más las propiedades y aplicaciones de este recurso natural.

5.3. Efecto citotóxico del mucílago de *Q. funebris*

La seguridad del mucílago extraído de las flores de *Q. funebris* se evaluó a través de un ensayo de citotoxicidad empleando la línea celular HEK-293. Esta clase de células procedentes de riñón de embrión humano se encuentran bien caracterizadas y han sido implementadas en múltiples ensayos de actividad citotóxica mostrando resultados satisfactorios [92, 93].

Las células HEK-293 fueron expuestas al mucílago de *Q. funebris* a diferentes concentraciones (0.04-5.0 mg/ml) por 48 horas y sus cambios morfológicos fueron examinados mediante un microscopio de contraste de fases. La Figura 22 muestra los cambios ocurridos, de manera significativa respecto al grupo control (Figura 22-A), en la morfología de estas células luego de estar en contacto con el mucílago. La pérdida de las características morfológicas normales se hace más evidente a partir de la concentración de 0.08 mg/ml, las cuales se fueron convirtiendo más significativas con el aumento de la concentración del mucílago. Después de la exposición al polisacárido, se observó la liberación de células de la superficie del pozo (Figura 22 B-I), lo que es consistente con patrones de comportamiento previamente observados en estas células cuando se exponen a

otros agentes citotóxicos [114, 115]. Este efecto fue más notable a la concentración de 5.0 mg/ml, lo que sugiere que el efecto citotóxico fue concentración-dependiente. La cafeína fue empleada en el estudio como un control de daño citotóxico, donde las células que fueron tratadas con este alcaloide mostraron un comportamiento similar a las que fueron tratadas con el mucílago de *Q. funebris*, evidenciándose de igual manera el desprendimiento de la superficie. Existen controversias considerables en la literatura respecto a la toxicidad de la cafeína, incluyendo posibles propiedades carcinogénicas, anticarcinogénicas y apoptóticas, siendo dependientes de la concentración y el tiempo [116, 117]. En el presente estudio, la cafeína ejerció un efecto citotóxico frente a células HEK-293, el cual fue útil para validar internamente el protocolo de trabajo.

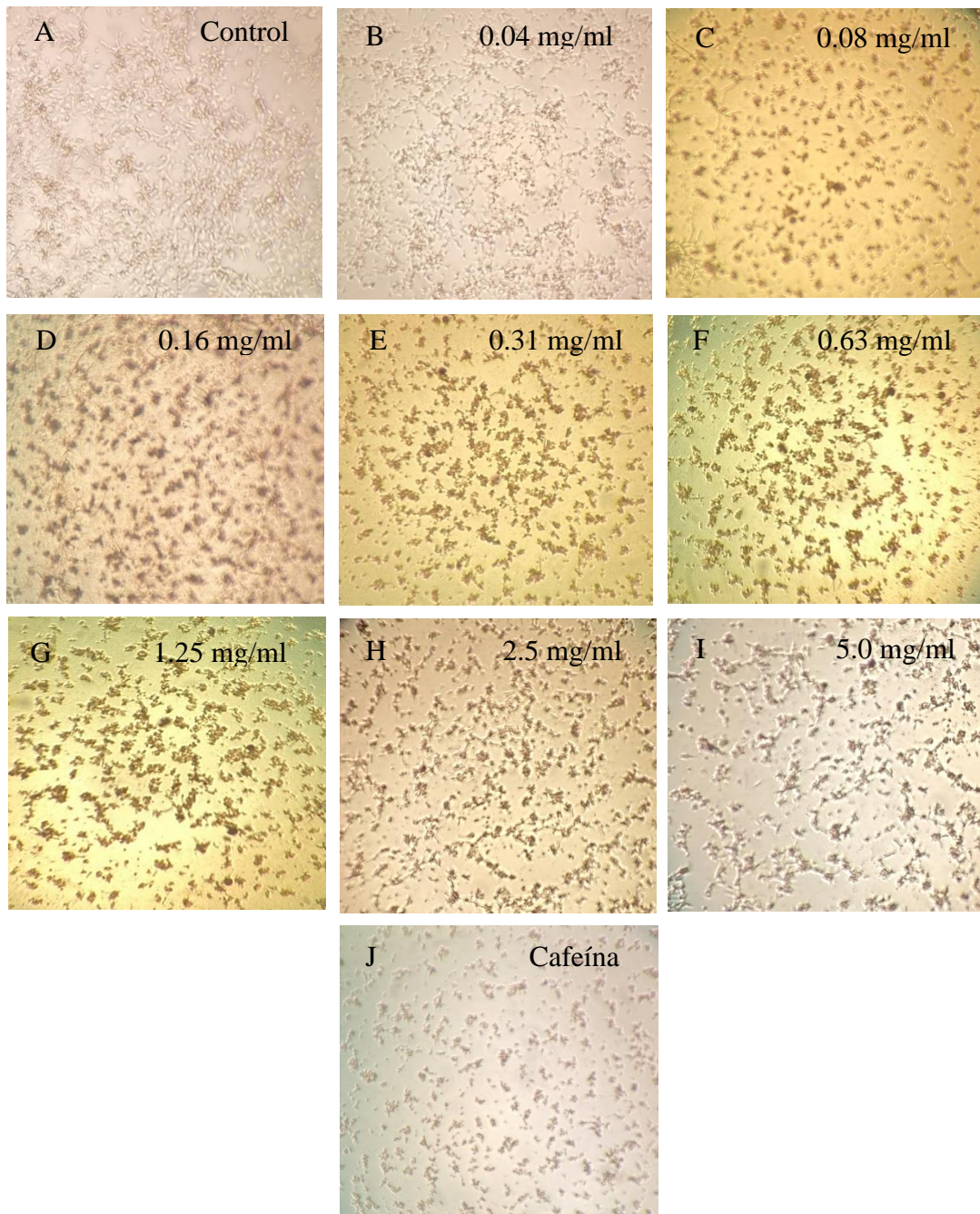


Figura 22: Cambios en el comportamiento de células HEK-293 tras exposición al mucílago de *Q. funebris* por 48 horas y a diferentes concentraciones. Se evidencia el desprendimiento de la superficie. Cambios similares se observan con la cafeína como agente citotóxico.

Los resultados obtenidos durante los experimentos con el mucílago estudiado se muestran en la Figura 23. El porcentaje de viabilidad celular fue calculado para cada concentración estudiada y se comparó respecto al grupo control de crecimiento celular (barra de color morado claro), el cual se mantuvo en medio de cultivo DMEM durante el tiempo de duración del experimento. En la Figura 23 también fueron insertados los datos correspondientes a la cafeína, la cual fue implementada como control de producto natural con daño citotóxico (barra de color rojo oscuro).

Como se evidencia en el gráfico de viabilidad celular, existe una tendencia a la disminución de la viabilidad y aumento de la toxicidad con el incremento de la concentración del mucílago, existiendo diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones de 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 mg/ml y con una $CL_{50} = 1.51 \pm 0.30$ mg/ml. Es importante destacar que debido a la viscosidad de las soluciones acuosas de este mucílago no resultó posible evaluar concentraciones superiores a 5.0 mg/ml, lo cual trascendería en la correcta administración de la muestra. Por otro lado, las menores concentraciones evaluadas, 0.04-0.31 mg/ml, manifestaron un comportamiento semejante al grupo control en DMEM, lo cual indica que no es hasta aproximadamente 0.63 mg/ml donde la concentración del biopolímero citotóxico ejerce un efecto notable provocando una disminución significativa del número de células viables. Por otro lado, las concentraciones más elevadas del mucílago en este experimento, 2.5 y 5.0 mg/ml, mostraron niveles de viabilidad celular similares estadísticamente al grupo con daño citotóxico inducido con cafeína.

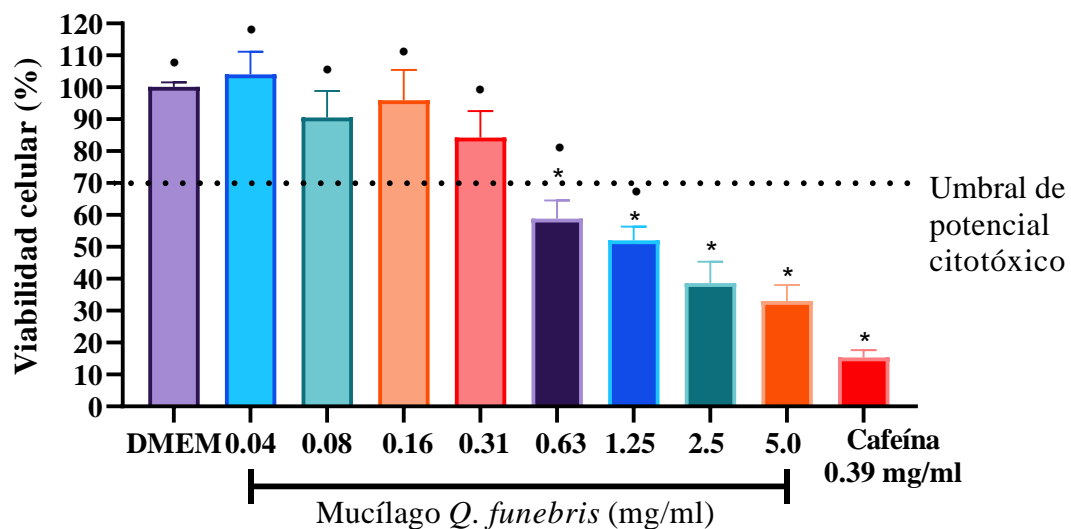


Figura 23: Efecto del mucílago de *Q. funebris* sobre la viabilidad celular de células HEK-293 incubadas a 48 horas. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc de Dunnet. * Se observa diferencia significativa respecto al control DMEM, $p < 0.05$. • Se observa diferencia significativa con respecto al grupo control cafeína. Líneas discontinuas: Umbral de citotoxicidad de acuerdo con ISO: 10993-5: 2009.

De acuerdo con la norma ISO: 10993-5: 2009 (Evaluación biológica de dispositivos médicos- Parte 5: Pruebas de citotoxicidad *in vitro*), las sustancias de prueba que reduzcan el nivel de viabilidad celular por debajo de un 70.0 % respecto al control, serán sustancias

potencialmente citotóxicas [118]. Esto se evidencia en el mucílago de *Q. funebris* a concentraciones ≥ 0.63 mg/ml, lo cual está en acuerdo con el desprendimiento celular evidenciado.

Los mucílagos al estar formados por largas cadenas de azúcares y por ser de origen natural, pudiera inferirse que son completamente seguros y no tóxicos. Sin embargo, teniendo en cuenta los disímiles reportes que existen sobre los efectos tóxicos de diversos polisacáridos naturales, podemos afirmar que algunos de ellos pueden presentar efectos tóxicos para las células, incluso a relativamente bajas concentraciones. Por ejemplo, el polisacárido aislado de *Laminaria japonica* resultó ser medianamente tóxico para células HEK-293, provocando su redondez e incremento de tamaño, con una $CL_{50} = 1.76$ mg/ml [119]. También varios polisacáridos aislados de *Paeonia suffruticosa* mostraron gran mortalidad de varias líneas celulares incluyendo cáncer de próstata (Pc-3), cáncer de colon (HCT-116), cáncer de mama humano (MCF-7), cáncer cérvico (HeLa) y células de embrión de riñón humano (HEK-293), a través de la estimulación de mecanismos apoptóticos [120]. Por otro lado, Yuan *et al.* aseveran que un peso molecular relativamente bajo del polisacárido y una composición química compleja incrementa la actividad citotóxica, la cual se encuentra también estrechamente relacionada con la capacidad antioxidante del polisacárido. Asimismo, aislaron un polisacárido de *Ligusticum chuanxiong* con alta toxicidad *in vitro* para la línea celular de cáncer hepatocelular HepG2 con un valor de $CL_{50} = 0.085$ mg/ml [121].

Muchos mucílagos conocidos con potenciales usos dentro de la industria farmacéutica y alimentaria han sido explorados en función de su citocompatibilidad. Tal es el caso del mucílago de la semilla de *Salvia hispanica* (chía) el cual en ensayos de viabilidad celular con la línea de fibroblastos L929, mostró tasas de supervivencia cercanas al 100 % en el rango de concentraciones de 0.06-1.00 mg/ml, ubicándose como un candidato para el desarrollo de distintas formulaciones [122]. Además, Carvalho *et al.* evaluaron el efecto tóxico y cicatrizante del mucílago de *Pereskia aculeata* sobre fibroblastos L929, donde los resultados arrojaron nula toxicidad a las concentraciones evaluadas, conjuntamente con una mejora en la cicatrización microscópica [81]. Por otro lado, el mucílago de *Coccinia grandis* fue evaluado en orden de establecer su seguridad para su uso como excipiente en la fabricación de tabletas. Para ello se evaluó su citotoxicidad en células HEK-293, mostrando porcentajes de viabilidad celular cercanos al 100 % sin cambios morfológicos en las células tratadas, en un rango de concentraciones de 0.01-0.2 mg/ml [80].

A pesar de los resultados de citotoxicidad *in vitro* evidenciados en este estudio, es poco probable que el mucílago muestre rasgos de toxicidad *in vivo*, principalmente mediante una administración vía oral. Los mucílagos al ser fibras solubles alcanzan el intestino grueso intactos, donde son intensamente metabolizados por la microflora intestinal, a la vez que manifiestan un efecto prebiótico [123]. El potencial de los mucílagos como prebióticos se atribuye a su naturaleza de polisacárido, donde el alto contenido de heteropolisacáridos solubles, el principal progenitor de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), ayuda a promover el crecimiento de bacterias probióticas intestinales beneficiosas. Este efecto prebiótico ha sido demostrado en diversos estudios, por ejemplo, el mucílago de *Aloe vera* y de *Opuntia ficus indica* incrementaron de manera *in vitro* los niveles de ácido acético, propanoico y butanoico, a la vez que estimularon el crecimiento de las colonias bacterianas beneficiosas del colon [124, 125]. Por otra parte, se estudió la seguridad del mucílago de

Linum usitatissimum mediante estudios *in vivo* de toxicidad oral aguda en ratones empleando una única dosis de 5000 mg/kg, los cuales no indicaron cambios significativos en los parámetros conductuales, clínicos o histopatológicos de los grupos de control y experimentales, aseverando la seguridad de este mucílago [126]. Otro estudio llevado a cabo por Noreen *et al.* evidenció la seguridad del mucílago de *Abelmoschus esculentus*, al evaluarse su toxicidad *in vivo* en ratones a una dosis de 10 mg/kg, tras lo cual los animales de prueba no mostraron indicios de toxicidad [127]. Los resultados evidenciados anteriormente reflejan la alta seguridad de los mucílagos, lo cual los convierte en atractivos materiales para desarrollar formulaciones innovadoras dentro de la industria farmacéutica y alimentaria.

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio y la información disponible en la literatura consultada, se teoriza que el efecto citotóxico observado en el mucílago de *Q. funebris* puede estar más relacionado con un efecto físico que bioquímico. Esto debido a la viscosidad intrínseca del mucílago a concentraciones más altas, lo cual puede ser un factor de estrés para las células, además de interferir con la absorción de nutrientes del medio. Otros experimentos deberán ser llevado a cabo para esclarecer esta teoría.

Es importante señalar que las concentraciones de mucílago empleadas durante los experimentos reológicos están muy por encima del umbral de potencial citotóxico señalado en este epígrafe. Estas concentraciones se seleccionaron deliberadamente para comprender mejor las propiedades reológicas y la aplicación potencial de este mucílago en diversas formulaciones. No obstante, cuando se considera el metabolismo *in vivo* de esta clase de compuestos químicos, se puede establecer con mayor confianza su seguridad. Los estudios de toxicidad *in vitro* a menudo utilizan concentraciones elevadas para evaluar posibles efectos adversos en las células en condiciones extremas. En la práctica, las concentraciones de mucílago utilizadas en productos formulados para uso humano o industrial suelen estar dentro de rangos mucho más bajos y seguros. Además, es fundamental llevar a cabo estudios de toxicidad *in vivo* y ensayos clínicos adecuados para evaluar la seguridad y la eficacia de los productos que contengan mucílago de *Q. funebris*.

Cabe resaltar que hasta el momento no existen reportes sobre ensayos de citotoxicidad del mucílago de *Q. funebris*, por lo que los resultados de viabilidad celular obtenidos en este trabajo constituyen el primer análisis de su tipo en esta planta, no siendo posible la comparación directa con ensayos realizados por otros autores. A pesar de esto, los resultados obtenidos permiten establecer un rango de uso seguro para este mucílago en futuras aplicaciones, el cual se encuentra comprendido entre 0.04 y 0.31 mg/ml, en base a los experimentos de citotoxicidad llevados a cabo.

6. Conclusiones

Las flores de *Quararibea funebris* contienen 6.49 ± 0.09 % m/m de mucílago en base al material seco y está compuesta mayormente por unidades estructurales de ramnosa 21.74 %, xilosa 15.11 %, galactosa 12.03 %, glucosa 22.16 %, y ácido galacturónico 8.35 %.

Las soluciones acuosas de mucílago en el rango 0.5-3.0 % m/m reflejaron un comportamiento no-Newtoniano del tipo adelgazante al flujo ($n < 1$), el cual se correlacionó adecuadamente con el modelo de ley de la potencia. La viscosidad de estas soluciones mostró dependencia de la temperatura y de la concentración de mucílago, y en menor grado de la fuerza iónica y el pH. Las propiedades elásticas (N1) al flujo se manifestaron en todo el rango de concentraciones estudiadas, siendo más importantes para una concentración de 3.0 % m/m, sin embargo, fueron mucho menores a las mostradas por un polímero comercial como lo es el poliisobutileno. Las propiedades viscoelásticas al flujo en función de la concentración y la temperatura mostraron un comportamiento tipo fluido (G'') y sólido viscoelástico (G') dependiendo de la concentración y el tiempo.

El mucílago fue capaz de disminuir significativamente la viabilidad de células HEK-293 a concentraciones mayores o iguales a 0.63 mg/ml, lo cual pudiera estar relacionado con un daño físico y no tóxico, debido a la alta viscosidad de sus soluciones.

Finalmente, los resultados obtenidos constituyen un aporte a la fitoquímica del género *Quararibea*, además de sentar las bases para futuras aplicaciones de este material mucilaginoso en virtud de las propiedades mecánicas que exhibe al flujo.

7. Perspectivas y recomendaciones

En base a los resultados presentados en este trabajo de tesis se sugiere lo siguiente:

- Determinar el patrón de conectividad del mucílago de *Q. funebris*. Esto con el propósito de profundizar en la química estructural de este material y poder establecer nuevas aplicaciones.
- Evaluar diferentes propiedades funcionales del mucílago de *Q. funebris* como la capacidad de retención de agua-aceite, el poder emulsificante y la capacidad de formación de espuma. Estas son propiedades importantes en la tecnología farmacéutica y de alimentos desde el punto de vista de la estabilidad, el rendimiento, la textura y la evaluación sensorial.
- Estudiar el efecto prebiótico del mucílago de *Q. funebris* en modelos *in vitro* e *in vivo*. Además de su impacto en la salud, esta investigación podría tener aplicaciones en la formulación de alimentos funcionales, suplementos dietéticos y productos farmacéuticos destinados a mejorar la salud intestinal y la microbiota.

Referencias bibliográficas

1. Razavi, S.M., *Emerging natural hydrocolloids: rheology and functions*. 2019: John Wiley & Sons.
2. Saha, D. and S. Bhattacharya, *Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review*. Journal of food science and technology, 2010. **47**: p. 587-597.
3. Choudhary, P.D. and H.A. Pawar, *Recently investigated natural gums and mucilages as pharmaceutical excipients: An overview*. Journal of pharmaceutics, 2014. **2014**.
4. Raffauf, R.F. and T.M. Zennie, *The phytochemistry of Quararibea funebris*. Botanical Museum Leaflets, 1983. **29**(2): p. 151-158.
5. Gallardo-Hernández, C. and F.G. Lorea-Hernández, *Dos especies nuevas de Quararibea (Malvaceae) del sur de México*. Brittonia, 2010. **62**(2): p. 183-191.
6. Schultes, R.E., *The genus Quararibea in Mexico and the use of its flowers as a spice for chocolate*. Botanical Museum Leaflets, Harvard University, 1957. **17**(9): p. 247-264.
7. Cervantes Servin, L.M. and R.A. Bye Boettler, *Estudio etnobotánico, histórico, de manejo y explotación de rosita de cacao Quararibea funebris (La Llave) Vischer, Bombacaceae en los valles centrales de Oaxaca*. 1999.
8. Lascurain-Rangel, M., et al., *Plantas americanas utilizadas como condimento en la cocina mexicana*. Revista Mexicana de Biodiversidad, 2022. **93**: p. e933949-e933949.
9. Rosengarten, F., *An unusual spice from Oaxaca: The flowers of "Quararibea funebris"*. Botanical Museum Leaflets, Harvard University, 1977. **25**(7): p. 183-202.
10. Raffauf, R.F. and T.M. Zennie, *The phytochemistry of Quararibea funebris*. Botanical Museum Leaflets, Harvard University, 1983. **29**(2): p. 151-158.
11. García, F., C. Pedraza, and J. Navarro, *Actualización del ácido gamma-hidroxi-butírico*. Rev Neurol, 2006. **43**(1): p. 39-48.
12. García, F.B., et al., *Efectos de la administración subcrónica de ácido gammahidroxi-butírico (GHB) sobre la memoria de trabajo espacial en ratas*. Psicothema, 18 (3), 2006.
13. Zennie, T.M., J.M. Cassady, and R.F. Raffauf, *Funebral, a new pyrrole lactone alkaloid from Quararibea funebris*. Journal of natural products, 1986. **49**(4): p. 695-698.
14. Raffauf, R.F., et al., *Funebrine, a structurally novel pyrrole alkaloid, and other gamma-hydroxyisoleucine-related metabolites of Quararibea funebris (Llave) Vischer (Bombacaceae)*. The Journal of Organic Chemistry, 1984. **49**(15): p. 2714-2718.
15. Zennie, T.M. and J.M. Cassady, *Funebradiol, a new pyrrole lactone alkaloid from Quararibea funebris flowers*. Journal of natural products, 1990. **53**(6): p. 1611-1614.
16. Singh, R. and D. Barreca, *Analysis of gums and mucilages*, in *Recent Advances in Natural Products Analysis*. 2020, Elsevier. p. 663-676.

17. Wasupalli, G.K. and D. Verma, 3 - *Polysaccharides as biomaterials*, in *Fundamental Biomaterials: Polymers*, S. Thomas, P. Balakrishnan, and M.S. Sreekala, Editors. 2018, Woodhead Publishing. p. 37-70.
18. Dybka-Stępień, K., et al., *The renaissance of plant mucilage in health promotion and industrial applications: A review*. *Nutrients*, 2021. **13**(10): p. 3354.
19. Tosif, M.M., et al., *A Comprehensive Review on Plant-Derived Mucilage: Characterization, Functional Properties, Applications, and Its Utilization for Nanocarrier Fabrication*. *Polymers*, 2021. **13**(7): p. 1066.
20. Quinzio, C., et al., *Physicochemical and rheological properties of mucilage extracted from Opuntia ficus indica (L. Miller). Comparative study with guar gum and xanthan gum*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018. **12**(1): p. 459-470.
21. Medina-Torres, L., et al., *Rheological properties of the mucilage gum (Opuntia ficus indica)*. *Food hydrocolloids*, 2000. **14**(5): p. 417-424.
22. Timilsena, Y.P., et al., *Molecular and functional characteristics of purified gum from Australian chia seeds*. *Carbohydrate polymers*, 2016. **136**: p. 128-136.
23. Kumar, D., et al., *Psyllium mucilage and its use in pharmaceutical field: an overview*. *Curr Synthetic Sys Biol*, 2017. **5**(134): p. 2332-0737.1000134.
24. Manhivi, V.E., et al., *Composition, thermal and rheological properties of polysaccharides from amadumbe (Colocasia esculenta) and cactus (Opuntia spp.)*. *Carbohydrate polymers*, 2018. **195**: p. 163-169.
25. Shaker, K., A. Al-Jobouri, and I. Al-Aubadi, *Chemical composition of extracted flaxseed mucilage and its application in yoghurt processing*. *Iraq Journal of Agricultural Research*, 2014. **19**(7).
26. Sims, I.M., et al., *Structural and rheological studies of a polysaccharide mucilage from lacebark leaves (Hoheria populnea A. Cunn.)*. *International journal of biological macromolecules*, 2018. **111**: p. 839-847.
27. Kurzyna-Szklarek, M., J. Cybulska, and A. Zdunek, *Analysis of the chemical composition of natural carbohydrates—an overview of methods*. *Food Chemistry*, 2022: p. 133466.
28. Liu, D., et al., *Monosaccharide composition analysis of polysaccharides from natural sources: Hydrolysis condition and detection method development*. *Food Hydrocolloids*, 2021. **116**: p. 106641.
29. Panagiotopoulos, C. and R. Sempéré, *The molecular distribution of combined aldoses in sinking particles in various oceanic conditions*. *Marine Chemistry*, 2005. **95**(1-2): p. 31-49.
30. Raessler, M., *Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011. **30**(11): p. 1833-1843.
31. Ruiz-Matute, A.I., et al., *Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses*. *Journal of Chromatography B*, 2011. **879**(17-18): p. 1226-1240.
32. Harvey, D.J., *Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B*, 2011. **879**(17-18): p. 1196-1225.
33. Sanz, M.L. and I. Martínez-Castro, *Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1153**(1-2): p. 74-89.

34. Guadalupe, Z., et al., *Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size exclusion chromatography (SEC)*. Food Chemistry, 2012. **131**(1): p. 367-374.
35. Ebrahimzadeh, H., V. Niknam, and A. Maassoumi, *Mucilage content and its sugar composition in Astragalus species from Iran*. Pakistan Journal of Botany, 2000. **32**(1): p. 131-140.
36. Yousefi, A., et al., *Study on the impact of temperature, salts, sugars and pH on dilute solution properties of Lepidium perfoliatum seed gum*. Food Science & Nutrition, 2022. **10**(11): p. 3955-3968.
37. Dammak, M.I., et al., *Partial characterization and antitumor activity of a polysaccharide isolated from watermelon rinds*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **136**: p. 632-641.
38. Amamou, S., et al., *Effect of extraction condition on the antioxidant, antiglycation and α -amylase inhibitory activities of Opuntia macrorhiza fruit peels polysaccharides*. Lwt, 2020. **127**: p. 109411.
39. Otálora, M.C., A. Wilches-Torres, and J.A.G. Castaño, *Extraction and Physicochemical Characterization of Dried Powder Mucilage from Opuntia ficus-indica Cladodes and Aloe Vera Leaves: A Comparative Study*. Polymers, 2021. **13**(11): p. 1689.
40. Bazezew, A.M., et al., *Extraction, phytochemical analysis, monosaccharide composition and functional properties of X. americana seed mucilage*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2022. **27**: p. 100302.
41. Behrouzian, F. and S.M. Razavi, *Steady shear rheological properties of emerging hydrocolloids*. Emerging natural hydrocolloids: Rheology and functions, 2019: p. 81-100.
42. Capitani, M.I., et al., *Rheological properties of aqueous dispersions of chia (Salvia hispanica L.) mucilage*. Journal of food engineering, 2015. **149**: p. 70-77.
43. Lapasin, R. and S. Pricl, *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*. 2020, Springer.
44. Goh, E. and W. Wan Nik, *A generalized model for viscosity as a function of shear rate*. ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences, 2018. **13**(9): p. 3219-3223.
45. Lefebvre, J. and J.-L. Doublier, *Rheological behavior of polysaccharides aqueous systems*. Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility, 2005: p. 357-394.
46. Malkin, A.Y. and A.I. Isayev, *Rheology: concepts, methods, and applications*. 2022: Elsevier.
47. Koocheki, A., et al., *Rheological properties of mucilage extracted from Alyssum homolocarpum seed as a new source of thickening agent*. Journal of food engineering, 2009. **91**(3): p. 490-496.
48. Cervantes-Martínez, C., et al., *Study of spray drying of the Aloe vera mucilage (Aloe vera barbadensis Miller) as a function of its rheological properties*. LWT-Food Science and Technology, 2014. **55**(2): p. 426-435.
49. Razavi, S.M.A., S.W. Cui, and H. Ding, *Structural and physicochemical characteristics of a novel water-soluble gum from Lallelantia royleana seed*. International journal of biological macromolecules, 2016. **83**: p. 142-151.

50. Anvari, M., et al., *Compositional characterization and rheological properties of an anionic gum from Alyssum homolocarpum seeds*. Food Hydrocolloids, 2016. **52**: p. 766-773.
51. Tcharkhtchi, A., et al., *Epoxy/amine reactive systems for composites materials and their thermomechanical properties*, in *Advances in Composites Manufacturing and Process Design*. 2015, Elsevier. p. 269-296.
52. Peleg, M., *Temperature–viscosity models reassessed*. Critical reviews in food science and nutrition, 2018. **58**(15): p. 2663-2672.
53. Dumitriu, S., *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. 2004: CRC press.
54. Jia, X., et al., *Rheological properties of an amorphous cellulose suspension*. Food Hydrocolloids, 2014. **39**: p. 27-33.
55. Fombuena, V., et al., *Utilidad de los modelos de viscoelasticidad en el aprendizaje de la ingeniería de materiales poliméricos*. Modelling in Science Education and Learning, 2017. **10**(1): p. 137-148.
56. Franck, A., *Normal stresses in shear flow*. TA Instruments-Technical Note AN007 (Accessed on 18 Feb 2019), 2014.
57. Franck, A. and T. Germany, *Viscoelasticity and dynamic mechanical testing*. TA Instruments, New Castle, DE, USA AN004, 1993.
58. Phan-Thien, N. and N. Mai-Duy, *Understanding viscoelasticity: an introduction to rheology*. 2013: Springer.
59. Tadros, T.F., *Rheology of dispersions: principles and applications*. 2011: John Wiley & Sons.
60. Shaw, M.T., *Introduction to polymer rheology*. 2012: John Wiley & Sons.
61. Song, K.-W., Y.-S. Kim, and G.-S. Chang, *Rheology of concentrated xanthan gum solutions: Steady shear flow behavior*. Fibers and Polymers, 2006. **7**: p. 129-138.
62. Procacci, S., et al., *Opuntia ficus-indica pruning waste recycling: Recovery and characterization of mucilage from cladodes*. Natural Resources, 2021. **12**(4): p. 91-107.
63. Dantas, T.L., F.C. Alonso Buriti, and E.R. Florentino, *Okra (Abelmoschus esculentus L.) as a potential functional food source of mucilage and bioactive compounds with technological applications and health benefits*. Plants, 2021. **10**(8): p. 1683.
64. Torquato, D., et al., *Evaluation of antimicrobial activity of cashew tree gum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004. **20**(5): p. 505-507.
65. Schirato, G.V., et al., *The polysaccharide from Anacardium occidentale L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing*. Ciencia Rural, 2006. **36**: p. 149-154.
66. Singh, P. and R.M. Gilhotra, *Potent a amylase inhibition activity of natural gums: An in vitro anti diabetic study*. International Journal of Pharmaceutical Research, 2020. **12**(1).
67. Sindhu, G., et al., *Anti-inflammatory and antioxidative effects of mucilage of Trigonella foenum graecum (Fenugreek) on adjuvant induced arthritic rats*. International immunopharmacology, 2012. **12**(1): p. 205-211.
68. Munir, M., et al., *Xanthan gum biochemical profiling, antioxidant, antibacterial, biofilm inhibition and mutagenic potential*. Curr. Sci, 2017. **114**: p. 1903-13.

69. Cui, H., et al., *Improving packing performance of lily polysaccharide based edible films via combining with sodium alginate and cold plasma treatment*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **206**: p. 750-758.
70. Li, J., et al., *Research progress of natural products for the treatment of ischemic stroke*. Journal of Integrative Neuroscience, 2022. **21**(1): p. 14.
71. Mukherjee, P., *Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs*. Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019: p. 515-537.
72. Li, M., et al., *Apoptosis triggering, an important way for natural products from herbal medicines to treat pancreatic cancers*. Frontiers in Pharmacology, 2022. **12**: p. 3835.
73. Pilut, C.N., et al., *Comparative Evaluation of the Potential Antitumor of Helleborus Purpurascens in Skin and Breast Cancer*. Plants, 2022. **11**(2): p. 194.
74. Gavanji, S., et al., *Cytotoxic Activity of Herbal Medicines as Assessed in Vitro: A review*. Chemistry & Biodiversity, 2023.
75. Riss, T., et al., *Cytotoxicity assays: in vitro methods to measure dead cells*. Assay guidance manual [internet], 2019.
76. Niles, A.L., R.A. Moravec, and T.L. Riss, *Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development*. Expert opinion on drug discovery, 2008. **3**(6): p. 655-669.
77. Van Meerloo, J., G.J. Kaspers, and J. Cloos, *Cell sensitivity assays: the MTT assay*. Cancer cell culture: methods and protocols, 2011: p. 237-245.
78. Martínez Salazar, M., *Techniques for detecting in vitro apoptosis and cell senescence and their importance in health biotechnology*. Revista colombiana de biotecnología, 2009. **11**(2): p. 152-166.
79. Riss, T.L., et al., *Cell viability assays*. Assay Guidance Manual [Internet], 2016.
80. Ilango, K.B., et al., *Mucilage of Coccinia grandis as an efficient natural polymer-based pharmaceutical excipient*. Polymers, 2022. **14**(1): p. 215.
81. Carvalho, E.G., et al., *Wound healing properties and mucilage content of Pereskia aculeata from different substrates*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2014. **24**(6): p. 677-682.
82. Kumar, P. and G.T. Kulkarni, *Characterization of mucilage from Grewia optiva as pharmaceutical excipient*. Journal of Chronotherapy and Drug Delivery, 2012. **3**(2): p. 55-67.
83. Ghafourian, M., P. Tamri, and A. Hemmati, *Enhancement of human skin fibroblasts proliferation as a result of treating with quince seed mucilage*. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 2015. **10**(1).
84. Di Lorenzo, F., et al., *The polysaccharide and low molecular weight components of Opuntia ficus indica cladodes: Structure and skin repairing properties*. Carbohydrate polymers, 2017. **157**: p. 128-136.
85. Huang, R., et al., *Recent progress in the research of yam mucilage polysaccharides: Isolation, structure and bioactivities*. International journal of Biological macromolecules, 2020. **155**: p. 1262-1269.
86. Peng, Z., et al., *In vitro antioxidant effects and cytotoxicity of polysaccharides extracted from Laminaria japonica*. International journal of biological macromolecules, 2012. **50**(5): p. 1254-1259.

87. Li, S.-g., et al., *Characterization and anti-tumor activity of a polysaccharide from Hedysarum polybotrys Hand.-Mazz.* Carbohydrate Polymers, 2008. **73**(2): p. 344-350.
88. García-Cruz, E., et al., *Rheological and physical properties of spray-dried mucilage obtained from Hylocereus undatus cladodes.* Carbohydrate polymers, 2013. **91**(1): p. 394-402.
89. Oberlerchner, J.T., T. Rosenau, and A. Potthast, *Overview of methods for the direct molar mass determination of cellulose.* Molecules, 2015. **20**(6): p. 10313-10341.
90. Kalegowda, P., A.S. Chauhan, and S.M.N. Urs, *Opuntia dillenii (Ker-Gawl) Haw cladode mucilage: Physico-chemical, rheological and functional behavior.* Carbohydrate Polymers, 2017. **157**: p. 1057-1064.
91. Davis, R.A., et al., *Convolutamines I and J, antitrypanosomal alkaloids from the bryozoan Amathia tortusa.* Bioorganic & medicinal chemistry, 2011. **19**(22): p. 6615-6619.
92. Chen, Y., et al., *The toxic potentials and focus of disinfection byproducts based on the human embryonic kidney (HEK293) cell model.* Science of the Total Environment, 2019. **664**: p. 948-957.
93. Zulkarnain, N.N., et al., *Cytotoxicity evaluation of ketoprofen found in pharmaceutical wastewater on HEK 293 cell growth and metabolism.* Environmental toxicology and pharmacology, 2020. **80**: p. 103498.
94. Ojeh, N., et al., *The effects of caffeine on wound healing.* International wound journal, 2016. **13**(5): p. 605-613.
95. Chen, J.-C. and J.-H. Hwang, *Effects of caffeine on cell viability and activity of histone deacetylase 1 and histone acetyltransferase in glioma cells.* Tzu Chi Medical Journal, 2016. **28**(3): p. 103-108.
96. Hong, T., et al., *Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective.* Food chemistry: X, 2021. **12**: p. 100168.
97. Monograph, N., *Infrared Spectroscopy Of Carbohydrates A Review of the Literature.* 1968.
98. Archana, G., et al., *Preparation and characterization of mucilage polysaccharide for biomedical applications.* Carbohydrate polymers, 2013. **98**(1): p. 89-94.
99. Harvey, D.J. and P. Vouros, *Mass spectrometric fragmentation of trimethylsilyl and related alkylsilyl derivatives.* Mass spectrometry reviews, 2020. **39**(1-2): p. 105-211.
100. Medeiros, P.M. and B.R. Simoneit, *Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2007. **1141**(2): p. 271-278.
101. Mogoşanu, G.D., et al., *Identification of sugars from Silene albae herba using GC–MS technique.* UPB Scientific Bulletin, Series B, 2011. **73**: p. 101-108.
102. Jales, S.T.L., et al., *Natural Polysaccharides From Aloe vera L. Gel (Aloe barbadensis Miller): Processing Techniques and Analytical Methods.* Polysaccharides: Properties and Applications, 2021: p. 1-22.
103. Kokubun, T., *Occurrence of myo-inositol and alkyl-substituted polysaccharide in the prey-trapping mucilage of Drosera capensis.* The Science of Nature, 2017. **104**(9-10): p. 83.

104. Watanabe, K., et al., *Composition of the sheath produced by the green alga Chlorella sorokiniana*. Letters in applied microbiology, 2006. **42**(5): p. 538-543.
105. Chaudhary, S., M.P. Singh, and A. Rawat, *Qualitative and quantitative gas chromatography-mass spectroscopy analysis and characterization of naturally isolated mucilage in Hibiscus cannabinus L.(Malvaceae)*. Malvaceae). Tropical Plant Research, 2019. **6**(1): p. 101-105.
106. Pawar, H.A. and K. Lalitha, *Extraction, characterization, and molecular weight determination of Senna tora (L.) seed polysaccharide*. International Journal of Biomaterials, 2015. **2015**.
107. Masuelli, M.A., *Intrinsic viscosity determination of high molecular weight biopolymers by different plot methods. Chia gum case*. 2018.
108. Chhinnan, M.S., K.H. McWatters, and V.N.M. Rao, *Rheological Characterization of Grain Legume Pastes and Effect of Hydration Time and Water Level on Apparent Viscosity*. Journal of Food Science, 1985. **50**(4): p. 1167-1171.
109. Junqueira, L.A., et al., *Effects of temperature and concentration on the rheological properties of mucilage extracted from Pereskia aculeata Miller*. Journal of Food Measurement and Characterization, 2019. **13**: p. 2549-2562.
110. Marcotte, M., A.R.T. Hoshahili, and H. Ramaswamy, *Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature*. Food Research International, 2001. **34**(8): p. 695-703.
111. BeMiller, J.N., *An introduction to pectins: structure and properties*. 1986, ACS Publications.
112. Fedeniuk, R.W. and C.G. Biliaderis, *Composition and physicochemical properties of linseed (Linum usitatissimum L.) mucilage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994. **42**(2): p. 240-247.
113. Alpizar-Reyes, E., et al., *Rheological properties of tamarind (Tamarindus indica L.) seed mucilage obtained by spray-drying as a novel source of hydrocolloid*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **107**: p. 817-824.
114. Wang, F., et al., *Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells*. Toxicology in vitro, 2009. **23**(5): p. 808-815.
115. Zhang, X., et al., *Cellular and molecular mechanisms of bromate-induced cytotoxicity in human and rat kidney cells*. Toxicology, 2010. **269**(1): p. 13-23.
116. Fernandez, M., A. Lopez, and A. Santa-Maria, *Apoptosis induced by different doses of caffeine on Chinese hamster ovary cells*. Journal of Applied Toxicology: An International Journal, 2003. **23**(4): p. 221-224.
117. Lu, G.-Y., et al., *Caffeine induces tumor cytotoxicity via the regulation of alternative splicing in subsets of cancer-associated genes*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014. **47**: p. 83-92.
118. Standard, I., *Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization, 2009.
119. Cao, Y.-g., et al., *Antiviral activity of polysaccharide extract from Laminaria japonica against respiratory syncytial virus*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016. **84**: p. 1705-1710.

120. Zhang, F., et al., *Anti-cancerous potential of polysaccharide fractions extracted from peony seed dreg on various human cancer cell lines via cell cycle arrest and apoptosis*. *Frontiers in Pharmacology*, 2017. **8**: p. 102.
121. Yuan, J.-F., et al., *Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from Ligusticum chuanxiong Hort*. *Carbohydrate Polymers*, 2008. **74**(4): p. 822-827.
122. da Silveira Ramos, I.F., et al., *New properties of chia seed mucilage (Salvia hispanica L.) and potential application in cosmetic and pharmaceutical products*. *Industrial Crops and Products*, 2021. **171**: p. 113981.
123. Kassem, I.A., et al., *Mucilage as a functional food hydrocolloid: Ongoing and potential applications in prebiotics and nutraceuticals*. *Food & function*, 2021. **12**(11): p. 4738-4748.
124. Gullón, B., et al., *In vitro assessment of the prebiotic potential of Aloe vera mucilage and its impact on the human microbiota*. *Food & function*, 2015. **6**(2): p. 525-531.
125. Guevara-Arauz, J.C., et al., *Prebiotic effect of mucilage and pectic-derived oligosaccharides from nopal (Opuntia ficus-indica)*. *Food Science and Biotechnology*, 2012. **21**(4): p. 997-1003.
126. Tulain, U.R., et al., *Formulation and evaluation of Linum usitatissimum mucilage-based nanoparticles for effective delivery of ezetimibe*. *International Journal of Nanomedicine*, 2021: p. 4579-4596.
127. Noreen, S., et al., *pH Responsive Abelmoschus esculentus Mucilage and Administration of Methotrexate: In-Vitro Antitumor and In-Vivo Toxicity Evaluation*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022. **23**(5): p. 2725.