

Lej. 6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Polisacáridos (Gomas y Mucilagos) de las Plantas del Género *Opuntia*. (Estudio Monográfico)

T E S I S

Que para Obtener el Título de:

QUIMICO

P r e s e n t a

Antonio Rafael Tapia Benavides

Director de Tesis: Q. Victoria O. Hernández Palacios



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 está 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.

I N D I C E

| | | |
|------|--|-----|
| I. | INTRODUCCION. | 1. |
| II. | GENERALIDADES | 3. |
| | 1. Las Opuntias. | 3. |
| | 2. Los carbohidratos | 5. |
| | 3. Gomas y Mucílagos | 10. |
| | 4. Substancias pécticas. | 12. |
| III. | GOMAS Y MUCILAGOS DE OPUNTIAS | 15. |
| | 1. Mucílago de la O. ficus-indica. | 16. |
| | 2. Goma de la O. fúlgida | 38. |
| | 3. Gomas y mucílagos de otras especies de Opuntias | 47. |
| | 4. Substancias pécticas en Opuntias. | 51. |
| IV. | ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS GOMAS Y MUCILAGOS DE LAS OPUNTIAS. | 53. |
| | 1. Localización biológica. | 53. |
| | 2. Función biológica | 56. |
| V. | TECNICAS ANALITICAS EN POLISACARIDOS (GOMAS Y MUCILAGOS). | 59. |
| | 1. Proceso de aislamiento. | 59. |
| | 2. Degradación específica. | 66. |
| | 3. Metilación exhaustiva | 76. |
| VI. | CONCLUSIONES. | 80. |
| VII. | BIBLIOGRAFIA. | 82. |

I. INTRODUCCION.

Las gomas y mucílagos son polisacáridos de origen vegetal, algunos de los cuales son de alto valor a nivel industrial, ya que estos compuestos se emplean en la elaboración de un buen número de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos; se obtienen de numerosas fuentes vegetales, siendo además de importancia económica para aquellas zonas en donde estas plantas se desarrollan. El alto grado de aprovechamiento de varios de estos compuestos, va directamente relacionado con el nivel de conocimientos que se tiene sobre ellos; se han realizado diversos estudios sobre este tipo de sustancias, investigándose tanto las características físicoquímicas y biológicas como su posible aprovechamiento a nivel industrial.

Aproximadamente el 40 % del territorio nacional (95 millones de hectáreas) está constituido de zonas áridas o semiáridas(60); en estas regiones, las cosechas obtenidas de los cultivos tradicionales normalmente son pobres, sin embargo, abunda otro tipo de flora especial, entre la que podemos mencionar a las Opuntias, plantas cactáceas resistentes a la sequía cuya siembra y cultivo no requiere de cuidados especiales, teniendo además una alta productividad(16, 60). Las Opuntias son vegetales conocidos y utilizados por la población mexicana desde la antigüedad básicamente como alimento y forraje, pero representa un potencial alimentario y energético, base para el desarrollo agroindustrial de zonas áridas del país, por lo que se han realizado diversos trabajos de investigación encaminados a lograr un aprovechamiento racional e integral del producto. Ejemplo de esto último son los

trabajos realizados en la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán(63, 80).

Las diferentes especies de Opuntias son productoras de gomas y mucílagos; estos polisacáridos desempeñan papeles biológicos de importancia para la sobrevivencia de las Opuntias en las zonas áridas y semiáridas. Debido a esto, desde hace tiempo se han realizado estudios sobre las características fisicoquímicas y biológicas de algunos de estos compuestos, tratando de establecer su estructura química.

Este trabajo tiene como finalidad efectuar una revisión bibliográfica de las investigaciones realizadas hasta la fecha sobre las gomas y mucílagos de Opuntias, contribuyendo al conocimiento general de la química de estos carbohidratos que permitan un estudio posterior de sus propiedades funcionales, para establecer la posibilidad de su utilización industrial, lo que representaría un aprovechamiento mas adecuado de estos recursos naturales del país, así como la comprensión de su función biológica y de la relación función-estructura. Se incluye en el trabajo un resumen de los diversos análisis estructurales empleados en estos estudios, planteando en forma breve sus fundamentos y consideraciones.

II. GENERALIDADES.

1. Las Opuntias.

Las cactáceas, son plantas xerófitas, suculentas y resistentes a la sequía, se les puede localizar en diversos climas, pero, es en las zonas áridas y semiáridas en donde se encuentran el mayor número de géneros y especies de estos vegetales. Son originarias de América en donde están distribuidas desde el Canadá (latitud 56° N) hasta la Patagonia (latitud 50° S), actualmente se les puede hallar en otros lugares del mundo, su desarrollo en algunos países de África, Oceanía y Asia, ha sido tan grande, que han llegado a ser consideradas como plagas(16). Uno de los géneros de cactáceas que mayor importancia económica han tenido en México son las Opuntias, debido a que sus diversas especies representaron para los antiguos habitantes de la República, no sólo una fuente de alimentos, sino que su existencia propició la formación de asentamientos humanos(9, 16, 19).

Las Opuntias, gracias a sus características morfológicas y fisiológicas, pueden soportar condiciones ambientales en donde la precipitación pluvial es muy escasa y las temperaturas pueden llegar a ser muy altas durante el día y muy bajas en la noche, además, poseen una notable adaptabilidad a los suelos calcáreos y pobres. El desarrollo de sus raíces ayuda a la permeabilidad y enriquecimiento de los terrenos, de tal manera que contribuyen a formar una firme barrera contra la erosión(60).

Existen dos subgéneros de Opuntias: las *Cylindropun* -

tias y las *Platyopuntias*, las primeras son plantas arbustivas o achaparradas cuyas ramas están formadas por artículos cilíndricos, crecen en condiciones de extrema sequía, por lo cual, forman parte de la vegetación del altiplano así como la del desierto de Sonora, en los estados del norte del país se les denomina vulgarmente "chollas" a las especies de tallos gruesos; "tasajos, tasajillos y chirrioncillos" a las de ramas delgadas, en tanto, en los estados del centro de la República a las especies arbustivas se les llama "cardenches, cardos o cardocillos" y a las rastreras "abrojos", las *Cylindropuntias* no han sido muy utilizadas, no obstante, algunos de sus frutos se han aprovechado como forraje, y algunas ramas lignificadas como madera. Las *Platyopuntias*, por su parte, tienen artículos aplanados (cladiodos), vulgarmente se conocen como "nopales" y se desarrollan en casi todos los habitats. Se han identificado una gran cantidad de especies de *Opuntias*; en el territorio nacional para algunas de ellas no está bien determinada su clasificación botánica. Las más importantes por su abundancia y/o importancia comercial son:

| Nombre científico | Nombre común |
|-------------------------|-------------------|
| <i>O. ficus-indica</i> | nopal de castilla |
| <i>O. robusta</i> | nopal camueso |
| <i>O. megacantha</i> | nopal manso |
| <i>O. streptocantha</i> | nopal cardón |
| <i>O. amyclaea</i> | nopal fafaycuco |

A este tipo de plantas cactáceas, se les han atribuido ciertas propiedades curativas y se han utilizado como: eupép

ticos (agente que favorece la digestión), antipiréticos (contra la fiebre), antidiarreicos, diuréticos, etc. (23). En la actualidad se continúan investigando estas propiedades, como es el caso del tratamiento de la diabetes mellitus con opales(42).

2. Los carbohidratos.

Los carbohidratos son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos vegetales y animales, tienen gran importancia biológica ya que desempeñan una diversidad de funciones vitales. Químicamente son polihidroxi aldehydos o polihidroxicetonas así como aquellas sustancias que producen estos compuestos al hidrolizarse(36, 41).

Clasificación:

A los carbohidratos se les puede clasificar en tres grupos de acuerdo al número de unidades de los que están formados, estos son: monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

a) Los monosacáridos, también conocidos como azúcares sencillos, son aquellos carbohidratos que no pueden ser hidrolizados en moléculas más sencillas, tienen la fórmula empírica: $(CH_2O)_n$, en donde n es mayor o igual a tres, aunque algunos monosacáridos, como la L-ramnosa ($C_6H_{12}O_5$) y el ácido D-galacturónico ($C_6H_{10}O_7$), son la excepción. Se dividen en: triosas, tetrasas, pentosas, hexosas, o heptosas, según el número de átomos de carbono de los cuales están constituidos, y aldosas o cetosas, si el grupo carbonilo es un aldehy

do o una cetona.

Existen varias formas de representar la fórmula estructural de los monosacáridos, la estructura de cadena abierta propuesta por Fisher (figura 1), explica algunas de las características fisicoquímicas de los monosacáridos, sobre todo, la existencia de los isómeros D y L que son de gran importancia biológica. La designación de un isómero D o L en un monosacárido depende de la orientación de los grupos -H y -OH alrededor del átomo de carbono quiral más alejado del grupo carbonilo, de este modo, un monosacárido será un isómero D si en la representación de Fisher el grupo -OH aparece colocado a la derecha.

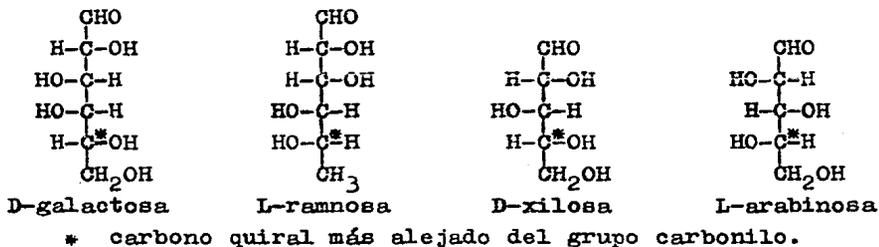


Figura 1. Proyección de Fisher de algunos monosacáridos.

Termodinámicamente se favorece la formación de una estructura cíclica, producto de la reacción entre el grupo carbonilo y un grupo hidroxilo del monosacárido, de este modo, las aldohexosas y aldopentosas pueden formar anillos de cinco y seis miembros (llamados furanosas y piranosas respecti-

vamente), en tanto, algunos monosacáridos como las cetohe-
 xosas sólo pueden formar anillos de cinco miembros. La repre-
 sentación cíclica fue propuesta por Haworth para explicar el
 fenómeno de la mutrorrotación, el cual se debe a la existen-
 cia de dos formas isoméricas (α y β) con diferente rotación-
 óptica en cada monosacárido (figura 2), y se conoce como iso-
 mería anomérica(84).

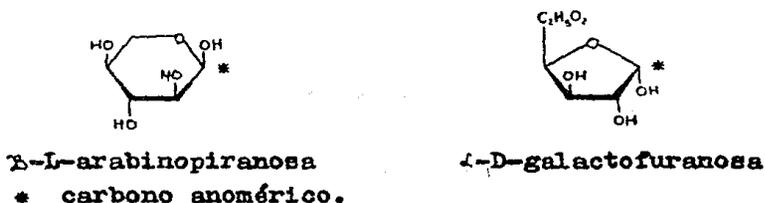


Figura 2. Proyecciones de Haworth de algunos monosacáridos.

Por otra parte, un análisis por difracción con rayos X
 puede mostrar que en realidad las piranosas y las furanosas
 no tienen una forma plana, normalmente los anillos toman en
 el espacio la forma más estable termodinámicamente, siendo -
 ésta la conformación de silla para las piranosas (figura 3).

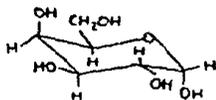


Figura 3. Conformación en el espacio de la α -D-galactopira-
 nosa.

Existen tres tipos importantes de monosacáridos ácidos: los aldónicos, aldáricos y los urónicos. Cuando las aldosas son oxidadas en el carbono aldehídico por agentes oxidantes débiles, como el hipoyodito de sodio o enzimas específicas, producen ácidos aldónicos. Si el agente oxidante es fuerte, tal como el ácido nítrico, los átomos de carbono aldehídico y aquel que tiene el alcohol primario serán oxidados hasta sus respectivos grupos carboxílicos produciendo los ácidos aldáricos. Los ácidos urónicos son aquellos monosacáridos que tienen un grupo carboxilo en la posición más alejada del grupo carbonilo (figura 4), se pueden obtener mediante la oxidación de la aldosa cuyo grupo carbonilo está protegido (esto último generalmente se efectúa haciendo reaccionar al monosacárido con acetona en medio ácido para formar el acetal)(20, 67).

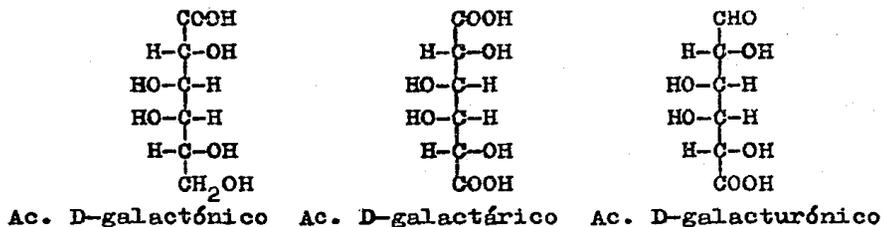
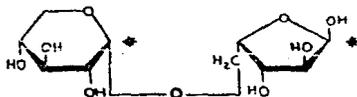


Figura 4. Ejemplos de algunos monosacáridos ácidos.

b) Los oligosacáridos son pequeños polímeros formados de dos a diez monosacáridos, van unidos entre sí por enlaces formados de la condensación entre un grupo hemiacetal y un grupo hidroxilo denominado enlace glicosídico. La represen-

tación escrita de un enlace glicosídico normalmente se realiza escribiendo primero la posición del carbono anomérico (1 para las aldosas y 2 para las cetosas), seguido por una flecha y en tercer lugar anotando la posición del átomo de carbono que donó el grupo hidroxilo (figura 5).

Cualquier carbohidrato que posee un grupo hemiacetal libre es susceptible de mayor oxidación, de tal modo, que en condiciones apropiadas son capaces de reducir iones como el Cu^{2+} (solución de Fehling) hasta Cu^+ , por lo que se les denomina "azúcares reductores". Los oligosacáridos son clasificados en reductores y no reductores, en la figura 5 se muestran dos ejemplos de estos tipos de oligosacáridos(13).



O-α-D-xilopiranosil-(1→5)-β-D-arabinofuranosa



O-α-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-fructofuranosa
* carbono anomérico.

Figura 5. Ejemplos de oligosacáridos reductor y no reductor.

c) Los polisacáridos son aquellos carbohidratos que están constituidos por más de diez monosacáridos, a su vez, los polisacáridos pueden dividirse en: homopolisacáridos y heteropolisacáridos.

Los homopolisacáridos son aquellos polisacáridos que tienen sólo un tipo de monosacáridos, por ejemplo: la celulosa, glicógeno y almidón (polímeros de glucosa), inulina (polímero de fructosa), hemicelulosas (polímero de xilosa), etc. A los homopolisacáridos se les puede clasificar por el tipo de polímeros del cual están constituidos, así, los pentosanos son aquellos polímeros constituidos por pentosas (xilano, arabano), los hexosanos constituidos exclusivamente por hexosas (glucosanos, fructosanos, mannanos, galactanos, etc.).

Los heteropolisacáridos, por su parte, están constituidos por dos o más tipos diferentes de monosacáridos, ejemplos de estos tipos de polisacáridos son las gomas vegetales, mucílagos, arabinogalactanos, etc.

3. Gomas y Mucílagos.

En general, las gomas, mucílagos y sustancias pécticas son heteropolisacáridos de origen vegetal, que pueden estar compuestos por residuos de hexosas, pentosas, metilpentosas y ácidos urónicos. Estructuralmente, estas sustancias están constituidas por una cadena central, formada ya sea por uno o más tipos de monosacáridos, a la cual, es común que se unan oligo y/o polisacáridos cuya presencia puede ocasionar que el heteropolisacárido tenga una estructura muy compleja.

Existe cierta confusión en el empleo de los términos goma y mucílago, ya que se ha encontrado que las estructuras químicas de unos y otros son muy parecidas, esto ha ocasionado que algunos autores utilicen indistintamente ambos términos(26).

Sin embargo, se puede definir a las gomas como aquellos hidrocoloides que son obtenidos al ser exudados del fruto, tronco o ramas de una planta, ya sea bajo condiciones de stress (calor, sequía, etc.) o por un daño físico producido sobre esta (remoción de alguna rama o fruto, cualquier insición sobre el tronco, o después del ataque de bacterias u hongos)(30, 32).

Químicamente las gomas son sales de polisacáridos ácidos, que generalmente poseen como ácido urónico al ácido D-glucurónico(4, 5, 30), sin embargo, algunas gomas contienen ácido D-galacturónico(6, 54, 55, 56, 61) o ambos ácidos urónicos(2, 3). Por otro lado, estos polisacáridos son sustancias hidrofílicas que se caracterizan por disolverse en agua, aunque, algunas gomas sólo se disuelven parcialmente (30).

En tanto, los mucílagos son compuestos que no son exudados como las gomas, se les puede encontrar en el vegetal formando membranas secundarias o dentro de células especiales (30). Estos heteropolisacáridos pueden tener naturaleza neutra, ácida (en cuyo caso, el ácido D-galacturónico es el que proporciona las características ácidas), o encontrarse en la forma de sulfato ésteres. Al contrario de las gomas, los mucílagos son poco solubles en agua, pero tienen la cualidad -

de embeberla e hincharse en su presencia, o formar disoluciones coloidales.

Clasificación:

Se han hecho varios intentos para clasificar tanto a las gomas como a los mucílagos; de acuerdo a sus propiedades de disolución, a las gomas se les ha clasificado en dos grupos: a) las gomas verdaderas, las cuales forman disoluciones claras en agua fría y b) aquellas gomas que no se disuelven totalmente en agua. Por otra parte, respecto a sus características químicas, a los mucílagos se les ha clasificado en tres grupos: 1) mucílagos neutros, 2) ácidos y 3) aquellos que están en la forma de sulfato ésteres y que comúnmente provienen de algas marinas(30).

Aspinall(7) ha clasificado a las gomas y mucílagos de acuerdo al tipo de cadena principal del cual están formados, así, ha identificado cinco grupos fundamentales de estos heteropolisacáridos: 1) galactanos, 2) glucuronomananos, 3) galacturonarannanos, 4) xilanos y 5) xiloglucanos.

4. Substancias pécticas.

El término "substancias pécticas" se da a un grupo heterogéneo de polisacáridos, encontrados en algunas paredes celulares de vegetales inferiores y en las capas intercelulares de los vegetales superiores en donde actúan como material de unión entre célula y célula, tienen, además, la propiedad de formar geles con sacarosa o potasa(21, 33, 45, 52, 57). La diferencia entre ellas radica principalmente en el-

grado de esterificación que presentan los grupos carboxilos del poligalacturonano, de este modo, se llama ácido péctico a aquellos ácidos poligalacturónicos que contienen muy pocos grupos metil ester, ácido pectínico cuando el grado de esterificación es alto y protopectina a las sustancias pécticas insolubles en agua que pueden formar ácidos pectínicos cuando son sometidas a hidrólisis parcial(21, 45, 52, 57).

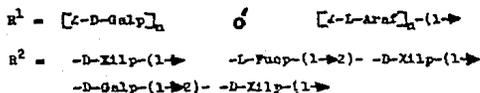
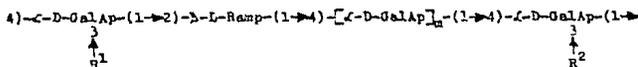
Se denominan pectinas a los ácidos pectínicos solubles en agua, los cuales, si poseen un grado de esterificación mayor al 50 % (denominadas regularmente como pectinas de alto grado de metoxilo (AM)), forman geles en concentraciones elevadas de azúcar y ácido, pero si su grado de esterificación está entre 30 y 50 % (pectinas de bajo metoxilo (BM)), forman las geles en presencia de cationes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (52).

La cadena central de las sustancias pécticas está constituida por un galacturonarannano(21, 29, 32, 52, 57, 58), por lo cual, se les puede comparar con algunos mucílagos (7), sin embargo, las sustancias pécticas tienen una mayor proporción de ácido D-galacturónico y están poco ramificadas. Kennedy(32) ha propuesto una estructura generalizada para este tipo de carbohidratos (figura 6).

Uso y empleo industrial.

La aplicación industrial de las gomas, mucílagos y sustancias pécticas se fundamenta en que imparten características especiales que modifican la textura del producto final.- El espectro de aplicaciones específicas de estas sustancias es bastante amplio, éstas van desde su empleo como adhesivos

en la elaboración de *glasé* para productos de panadería hasta su utilización como agentes enturbiantes en jugos de frutas. Las gomas y mucílagos son usadas con mayor frecuencia como - agentes espesantes para mermeladas y colorantes de la industria textil, emulsificantes para tintes, saborizantes y helados, así como estabilizadores de dispersiones en ensaladas y preparaciones de cosméticos. En tanto, las sustancias pécticas se utilizan generalmente como agentes gelantes en la - industria alimentaria, no obstante, es común su empleo como agentes engrosantes en la fabricación de productos farmacéuticos(26).



NOMENCLATURA

| abreviatura | residuo |
|-------------|---------------------------------|
| D-GalAp | = Ac. D-galactopiranosilurónico |
| L-Ramp | = L-rannopiranososa |
| L-Fucp | = L-fucopiranososa |
| D-Xilp | = D-xilopiranososa |
| D-Galp | = D-galactopiranososa |
| L-Araf | = L-arabinofuranosa |

Figura 6. Estructura propuesta por Kennedy para las sustancias pécticas.

III. GOMAS Y MUCILAGOS DE OPUNTIAS.

Desde hace tiempo se han estudiado las gomas y mucílagos de algunas Opuntias, sin embargo, el interés por estos polisacáridos ha aumentado en una buena medida recientemente. Las investigaciones realizadas sobre gomas y mucílagos de Opuntias que se encuentran publicadas en la literatura se limitan básicamente a ocho especies que son:

| | |
|---------------------------|------------|
| O. ficus-indica | - mucílago |
| O. fúlgida | - goma |
| O. aurantiaca | - mucílago |
| O. brasilliensis | - mucílago |
| O. megacantha | - goma |
| O. dillenii | - mucílago |
| O. monocantha | - mucílago |
| O. nopalea-coccinillifera | - mucílago |

Siendo la primera de ellas la más ampliamente estudiada y de la cual se han determinado tanto propiedades como estructura del mucílago, por lo que se verá en primer lugar y de manera amplia. La goma de la O. fúlgida también ha sido estudiada en gran medida, principalmente su estructura química, por lo que también se ha optado en dedicarle una sección; las otras seis especies se resumirán de manera conjunta ya que existe un menor número de referencias que tratan sobre ellas, encontrándose de manera general sus propiedades y propuesto sólo en algunos casos una posible estructura.

1. Mucílago de la *O. ficus-indica*.

a) Propiedades fisicoquímicas.

El mucílago de la *O. ficus-indica* es una sustancia amorfa(1, 46, 71) la cual al extraerse presenta colores que van desde el blanco-cremoso(1) hasta el café claro(46), es poco soluble en agua, aunque lo es mucho más en disoluciones acuosas de álcalis y puede formar complejos de cobre que también son solubles en agua(1).

Este polisacárido es un polielectrolito(76) localizado en células especiales de la *Opuntia*(71), caracterizadas por producirlo y almacenarlo como sales de calcio y magnesio (70, 76), sin embargo, durante el proceso de extracción del mucílago suele suceder que el calcio y el magnesio sean eliminados(70), por lo que generalmente se reportan bajas cantidades de estos iones, al igual que de cenizas, en el mucílago (tabla I).

No obstante que el mucílago no contiene proteínas(70, 71), se ha reportado en algunos trabajos la presencia de nitrógeno (tabla I), esto no es raro ya que frecuentemente los polisacáridos al ser extraídos están contaminados con proteínas del citoplasma y la pared celular de la planta(70). Frecuentemente, la cantidad de nitrógeno en un polisacárido es una medida de la pureza de éstas, por ejemplo en la tabla I se muestra la diferencia en la cantidad de nitrógeno reportada por Amin(1) y McGarvie(46), quienes para aislar al mucílago utilizan dos métodos diferentes, pero se debe de tener mucho cuidado por que es común que polisacáridos y proteína -

sean parte de una misma molécula(18), aunque no es el caso - para el mucílago de la *O. ficus-indica*.

| Referencia | Amin (1) | McGarvie (46) | Trachtenberg (70) |
|------------|-------------|------------------|----------------------|
| nitrógeno | 0.08 % | 0.87 - 1.57 % | |
| calcio | | | 0.022 % |
| magnesio | | | 0.013 % |
| cenizas | 0.06 % | | |

Tabla I. Contenido de N, Ca, Mg y cenizas en el mucílago de la *O. ficus-indica*.

Karawya(31) en las dos fracciones por él aisladas, de - terminó que el mucílago está parcialmente esterificado por - grupos metoxilos (0.31 % para la fracción extraída a tempera - tura ambiente con HCl 3.16×10^{-4} M (extracción en frío (E.- F.)) y 0.62 % para la fracción extraída con agua hirviente - (extracción en caliente (E. C.)), esto es lógico debido a - las características ácidas que presenta el polisacárido debi - do a la presencia del ácido D-galacturónico en su estructu - ra, McGarvie(46), por su parte, ha encontrado que el mucíla - go también está parcialmente acetilado (OAc, 5.06 %).

Algunas características fisicoquímicas importantes del - mucílago han sido determinadas en distintos trabajos, en la - tabla II se muestran los diversos resultados obtenidos, y - a pesar de que éstos varían de acuerdo al método de extrac - ción, podemos darnos una idea del comportamiento ácido-base,

de la posible relación estequiométrica y tal vez hasta la pu
reza de esta macromolécula.

| Referencia | Amin (1) | McGarvie (46) | Trachtenberg (70) |
|-----------------------|-------------|------------------|----------------------|
| $[\alpha]_D$ (grados) | -170 | -62 a -50 | |
| peso equivalente | | 1735 | |
| pK | | | 4.8 |

Tabla II. Algunas características fisicoquímicas del mucíla
go.

La viscosidad de las disoluciones acuosas del mucílagos es alta (aproximadamente $6470 \text{ gcm}^{-1}\text{seg}^{-1}$ en concentraciones de $1 \times 10^{-3} \text{ g/cm}^3$), disminuyendo grandemente con la presencia de cationes (Ca^{2+} y Na^+) hasta una concentración 10 mM del ion, sobre la cual la viscosidad permanece constante, la dependencia de la viscosidad del mucílagos con respecto a la concentración del ion se atribuye a que el mucílagos es un polielectrolito cargado negativamente, así, cuando el mucílagos está diluido solo en agua las cargas negativas ocasionan una fuerte repulsión molecular produciendo el estiramiento de la molécula y aumentando la rigidez de la misma, por otro lado, la presencia de un catión que neutralice las cargas negativas de la molécula elimina su efecto reduciendo la viscosidad de la disolución, de este modo también se puede explicar la dependencia de la viscosidad de la disolución con respecto al pH, ya que entre los valores 7.0 y 1.9 la viscosidad disminuye rápidamente, siendo ésta constante en el intervalo

alcalino(76).

A través del microscopio electrónico las moléculas del mucílago se ven claramente alargadas, por lo cual estas pueden tener la forma de una larga varilla o la de una prolongada elipsoide de revolución. Por el método de dispersión de luz, utilizando un haz de rayos Laser ($\lambda_0 = 5145 \text{ \AA}$) y benceno como referencia, Trachtenberg(76) determinó que cuando la molécula presenta su forma más corta (pH 7.4 y $|\text{Ca}^{2+}| = 100\text{-mM}$) tiene una longitud de 2945 \AA si fuese una varilla y asumiendo que tuviese la forma de una elipsoide los semiejes a y b ($a > b$) tendrían las dimensiones de 1900 y 24 \AA respectivamente. Cuando la molécula está totalmente expandida (en ausencia de cationes) es tres veces mas grande que en su forma contraída(76).

La concentración del catión complejante y el pH afectan el tamaño y la forma de la molécula, este comportamiento del mucílago puede deberse a que la molécula quizás tiene una estructura helicoidal (como si fuese un resorte). Los espectros de dicroísmo circular (CD) del mucílago, cuando el polisacárido está complejado por distintos cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+), tienen la misma forma, lo que confirma la estructura helicoidal del mucílago, por otra parte, la distinta intensidad de las bandas indican que el mucílago enlaza con diferente fuerza a los cationes y que tiene preferencia por el Ca^{2+} sobre los otros(76).

El peso molecular del mucílago calculado por el método de coeficientes de sedimentación es de 4.3×10^6 a pH 7.4 y una concentración de 10 mM de Na^+ o Ca^{2+} (76), pero no se de-

be olvidar que la viscosidad y los coeficientes de sedimentación dependen de la forma de las moléculas, así, cuando ésta presenta su menor tamaño (pH 7.4 y $|\text{Ca}^{2+}| = 100 \text{ mM}$) el peso molecular calculado por los métodos de coeficientes de sedimentación y viscosidad intrínseca es de 1.77×10^6 . El hecho de que el mismo peso molecular sea obtenido en la presencia de Ca^{2+} o Na^+ a pH 7.4 muestra que el ion Ca^{2+} forma puentes intramoleculares en la molécula, sin embargo, a valores de pH mayores de 8, la presencia del ion Ca^{2+} hace que aumente la viscosidad de la disolución, esto tal vez se deba a que el ion Ca^{2+} en estas condiciones se enlaza ya de manera intermolecular(76). En México, Latorre(35) también ha calculado el peso molecular de este polisacárido de la *O. ficus-indica*, pero los resultados por él obtenidos son bastante pequeños en comparación con los reportados por Trachtenberg(76).

Las disoluciones acuosas del mucílago son dispersiones moleculares, este compuesto además puede formar geles mecánicamente muy fuertes en la presencia del ion Ca^{2+} y una baja cantidad de agua. También en la ausencia del ion y con un mayor contenido de agua puede formar geles pero estas son mecánicamente débiles.

La capacidad de retención de agua del mucílago es baja, así, cuando la humedad relativa del medio es del 100 % la molécula sólo puede retener el 75.5 % ya sea en presencia o ausencia del ion Ca^{2+} (70).

b) Estructura química.

Los trabajos realizados por Amin(1), Karawya(31), Smedted(64), Trachtenberg(70) y en mayor medida McGarvie(46, 47, 48, 49) han contribuido a la determinación de la estructura de el mucílago de esta Opuntia.

Para la elucidación de la estructura de los polisacáridos, se usan técnicas químicas tales como: la hidrólisis total y parcial, metilación, acetilación, oxidación, reducción, complejación, etc., y físicas como: polarografía, cromatografía (en todas sus modalidades), espectroscopía, viscosimetría, diálisis, centrifugación, etc. Cabe señalar que el análisis estructural de estos polímeros es como una especie de rompecabezas, en el cual no basta con utilizar una sola técnica de análisis, sino que es necesario emplear varias a la vez para poder proponer una estructura química. La secuencia analítica, comprende varios pasos que se expondrán a continuación; la metodología de las técnicas y su interpretación se revisarán en otro capítulo.

i) Determinación de residuos constituyentes del mucílago.

Para conocer la composición del mucílago, comúnmente se le efectúa al polisacárido una hidrólisis total, la cual rompe la mayoría de los enlaces glicosídicos de la macromolécula produciendo monosacáridos libres, los residuos se identifican a partir del hidrolizado por cromatografía en papel(1, 46), capa fina(31, 70), de gases y por la preparación de derivados químicos(1), también a partir del hidrolizado se cuantifican los monosacáridos por cromatografía de gases (46, 31, 70, 66) de sus derivados acetilados, en la figu

ra 7 se presenta un diagrama en donde se muestra el proceso-
utilizado para identificar y cuantificar los residuos consti-
tuyentes del mucílago de la O. ficus-indica.

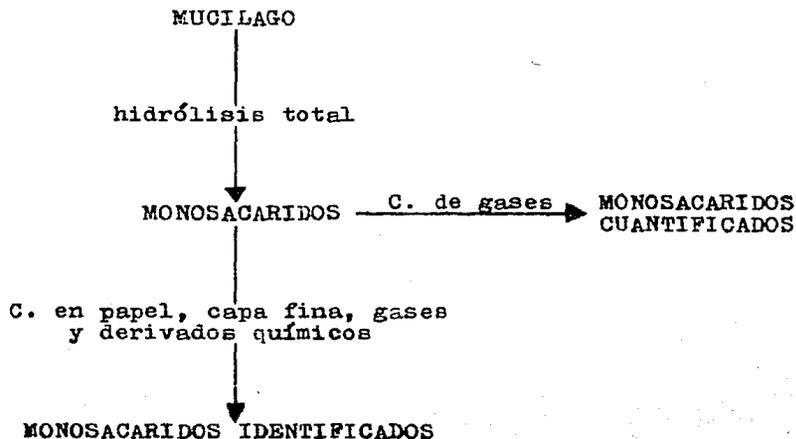


Figura 7. Diagrama del proceso de análisis de los residuos-
constituyentes del mucílago de la O. ficus-indi -
ca.

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición del
mucílago de la O. ficus-indica son mostrados en el tabla -
III. Las diferencias se deben principalmente a la manera de
aislar el polisacárido y al método analítico utilizado para
la cuantificación. Karawya(31) utilizó dos extracciones pa-
ra aislar al mucílago de esta Opuntia, una de ellas a tempe-

ratura ambiente con disolución acuosa de HCl a pH 3.5 - (extracción en frío (E. F.)) y a los desechos sólidos obtenidos de esta primera extracción les agrega agua caliente, lo cual constituye la segunda extracción (extracción en caliente (E. C.)), por lo tanto, como se observa en la tabla III, - obtiene dos fracciones constituidas por los mismos residuos - pero en diferente proporción.

| Referencia | Amin (1) | Karawya (31) | | McGarvie (46) | Trachtenberg (70) |
|---------------------|-------------|-----------------|---------------|------------------|----------------------|
| | % mol | % mol E.F. | % mol E.C. | % mol | % mol |
| D-galactosa | 35.7 | 13.4 | 22.5 | 18.4 - 25.2 | 40.1 |
| L-arabinosa | 37.5 | 32.1 | 14.9 | 40.0 - 42.8 | 24.6 |
| D-xilosa | 15.5 | 11.0 | 12.1 | 20.0 - 24.5 | 22.2 |
| L-ramnosa | 11.5 | | | 6.4 - 7.3 | 13.1 |
| Ac. D-galacturónico | | 9.6 | 13.5 | 6.8 - 8.4 | |

* E. F. extracción en frío.
E. C. extracción en caliente.

Tabla III. Composición del mucílago de la *O. ficus-indica* - (% mol).

Cabe señalar que Amin(1) y Trachtenberg(70) no detectaron al ácido D-galacturónico en el hidrolizado del mucílago, por lo mismo, este último autor cuantificó al ácido urónico - directamente del mucílago sin degradar, en la tabla IV se - muestran los resultados obtenidos aplicando tres métodos diferentes.

| | | |
|------------|----------------------|-----------------------|
| Referencia | Trachtenberg (70) | |
| | % mol | método utilizado: |
| | a) 19.5 | a) carbazol |
| | b) 12.7 | b) m-hidroxidifenilo |
| | c) 10.7 | c) valoración directa |

Tabla IV. Contenido de ácido urónico (% mol) en el mucílago de la *O. ficus-indica* reportado por Trachtenberg.

Es pertinente mencionar que algunos autores como: Karawya(31) y Smestad(64), han reportado la existencia de glucosa en las muestras del mucílago de la *O. ficus-indica*, no obstante, su presencia debe considerarse como un contaminante, ya que no se ha encontrado rastro alguno de que la glucosa forme parte de la estructura química de este polisacárido, por lo que es posible que la glucosa sea parte de restos celulares contaminantes del mucílago.

ii) Hidrólisis parcial del mucílago.

En condiciones de hidrólisis no drásticas se ha comprobado que los enlaces glicosídicos débiles y aquellos que están localizados en la periferia de la molécula del polisacárido se rompen fácilmente, ya que, cuando se le practica la hidrólisis parcial al mucílago de la *O. ficus-indica*(46) y utilizando la cromatografía en papel para conocer el avance de la reacción con el transcurso del tiempo, se nota como la L-arabinosa es muy fácilmente liberada; formando parte prime

ro de un oligosacárido (5-O- β -D-xilopiranosil-L-arabinosa) y después como un monosacárido, lo que indica que ésta se encuentra en su mayor parte en la forma furanosa, posteriormente, con el transcurso del tiempo, aparece la D-xilosa y después lo hace la D-galactosa, mostrando que estos residuos están presentes en el polisacárido en la forma piranosa y situados en las cadenas externas de éste. Cuando la totalidad de la L-arabinosa y la D-xilosa y una gran parte de la D-galactosa han sido liberadas de la molécula (aproximadamente - 30 horas de reacción), se obtiene lo que McGarvie(46) denomina "polisacárido degradado", el cual es un polisacárido constituido por ácido D-galacturónico, L-ramnosa y D-galactosa - (tabla V).

| Referencia | McGarvie (46) |
|---------------------|------------------|
| | % mol |
| D-galactosa | 41.3 |
| L-arabinosa | trazas |
| D-xilosa | trazas |
| L-ramnosa | 34.1 |
| Ac. D-galacturónico | 24.5 |

Tabla V. Composición del polisacárido degradado (% mol).

iii) Hidrólisis del polisacárido degradado.

La hidrólisis total del polisacárido degradado seguida-

por una separación con una resina de intercambio iónico (Amberlite IRA-400 en la forma de acetato) produce tres fracciones; una neutra y dos ácidas, la fracción neutra está constituida por L-ramnosa y D-galactosa, y las ácidas por el ácido D-galacturónico y el oligosacárido 2-O-(ácido- α -D-galactopiranosilurónico)-L-ramnosa(46). El proceso para la obtención del polisacárido degradado y la hidrólisis practicada a éste se describe en forma general en la figura 8.

Por los resultados mencionados y por el hecho de que el polisacárido degradado está constituido principalmente del ácido D-galacturónico y la L-ramnosa, se puede concluir que el mucílago de la *O. ficus-indica* está compuesto por un núcleo formado por estos residuos.

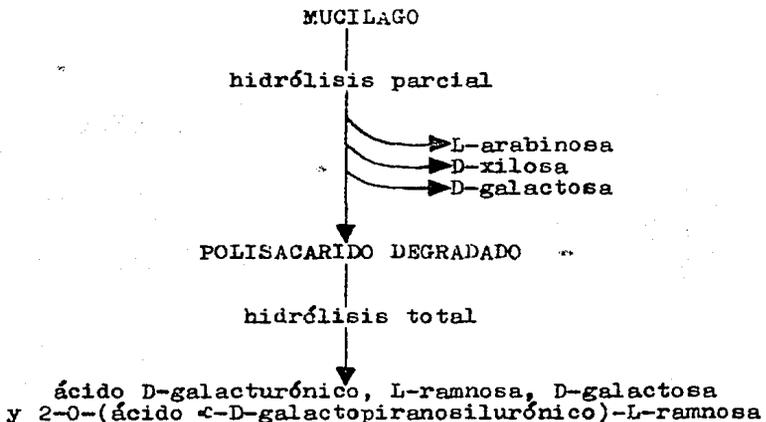


Figura 8. Diagrama de la obtención del polisacárido degradado a partir del mucílago de la *O. ficus-indica*.

iv) Constituyentes de las ramificaciones del mucílago.

El material que se desprende del mucílago durante la hidrólisis parcial es de bajo peso molecular(49), este material se separó del polisacárido degradado por diálisis(46), posteriormente se somete a cromatografía en una columna de carbón activado-celita (1:1) utilizando un gradiente de elución (0 → 40 % agua-etanol) y cada fracción obtenida se examinó por cromatografía en papel(49). Así, se aislaron dieciséis oligosacáridos y con la ayuda de la hidrólisis total y parcial, metilación, cromatografía de capa fina, papel, gas y medidas de la rotación óptica específica, se caracterizaron completamente once oligosacáridos(46), los cuales son mostrados en la tabla VI.

| OLIGOSACARIDOS | OLIGOSACARIDOS |
|----------------------------|---|
| I) L-Arap(1→3)-L-Ara | VII) D-D-Xilp-(1→5)-L-Araf |
| II) D-D-Galp-(1→6)-D-Gal | VIII) D-D-Galp-(1→6)-D-D-Galp-(1→6)-D-Gal |
| III) D-D-Galp-(1→3)-L-Araf | IX) D-D-Xilp-(1→3)-L-L-Araf-(1→3)-L-Ara |
| IV) D-D-Xilp-(1→3)-L-Ara | X) D-D-Xilp-(1→5)-L-L-Araf-(1→3)-L-Ara |
| V) L-L-Araf-(1→5)-L-Araf | XI) D-D-Xilp-(1→5)-L-L-Araf-(1→5)-L-Araf |
| VI) L-L-Araf-(1→3)-L-Ara | XII) D-D-Xilp-(1→5)-L-L-Araf-(1→5)-L-L-Araf-(1→3)-L-Ara |

Tabla VI. Oligosacáridos caracterizados por McGarvie(46) del hidrolizado parcial del mucílago de la O. ficus-indica.

Es necesario señalar que la configuración del enlace en el disacárido presentado como I en la tabla VI es incierta,-

su rotación óptica positiva (+76°) sugiere la presencia de un enlace del tipo α ; sin embargo, su movilidad cromatográfica en disolventes ácidos y básicos es similar a aquellos azúcares con enlaces del tipo β (49).

v) Oxidación del mucílago con trióxido de cromo.

Aquellos piranósidos totalmente acetilados que presentan la configuración anomérica β son oxidados por el trióxido de cromo en presencia de ácido acético, la oxidación de los furanósidos acetilados procede independientemente de su configuración anomérica. La oxidación del mucílago de la *O. ficus-indica* acetilado mostró que después de cuatro horas de reacción una gran parte de la D-galactosa, D-xilosa, L-ramnosa y L-arabinosa habían sido degradadas(46), por lo tanto, se sabe que la L-ramnosa, D-galactosa y D-xilosa presentan la configuración anomérica β , los oligosacáridos producidos durante la hidrólisis parcial del mucílago (tabla VI) muestran que los residuos de la L-arabinosa son anómeros α , y el aumento de la rotación óptica del mucílago al polisacárido degradado probablemente indique que también el ácido D-galacturónico es un anómero α .

vi) Oxidación con ion peryodato.

En los polisacáridos, aquellos residuos que presenten dos o más grupos hidroxilos vecinales son oxidados por el ion peryodato. Desde el punto de vista analítico se pueden conocer el número de moles consumidos del ion peryodato durante la reacción, siendo este dato de gran ayuda cuando se propone una estructura. Por otro lado, los residuos que, al

estar substituidos, no presentan hidroxilos vecinales y por lo tanto no son degradados durante la reacción pueden ser detectados, aislados y cuantificados; pudiéndose saber que residuos presentan algunos tipos de ramificaciones en el polisacárido. El mucílago durante la reacción consume 0.86 moles de peryodato por unidad de azúcar anhidro promedio(48), - en tanto, el polisacárido degradado consume 1.21 moles(47), - estos resultados muestran que lógicamente el polisacárido degradado tiene una estructura menos ramificada que el mucílago. Todos los residuos de D-xilosa y del ácido D-galacturónico son destruidos cuando al mucílago se le somete a la oxidación, mientras que, el 68 % de D-galactosa, 20 % de L-arabinosa y el 100 % de la L-ramnosa sobreviven a ésta(47, 48).

vii) Metilación exhaustiva.

Las posiciones que no están substituidas (en los residuos de un polisacárido) pueden ser metiladas, así, cuando un polisacárido metilado es hidrolizado, los grupos hidroxilos presentes en los derivados metilados mostrarán aquellas posiciones por donde los residuos se encuentran enlazados en la macromolécula. El mucílago, mucílago reducido, polisacárido degradado y el polisacárido degradado y reducido de la *O. ficus-indica* fueron metilados e hidrolizados por McGarvie (47, 48) y Amin(1), siendo los derivados metilados identificados y cuantificados por cromatografía de gases y espectroscopía de masas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VII.

Es importante mencionar que McGarvie(48) no cuantificó con exactitud a los derivados metilados en los hidrolizados del mucílago y polisacárido degradado metilados, ya que es -

| DERIVADO | MUCILAGO METILADO | MUCILAGO REDUCIDO Y METILADO (% mol) | POLISACARIDO DEGRADADO Y-METILADO | POLISACARIDO DEGRADADO, - REDUCIDO Y - METILADO (% mol) |
|---------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---|
| 1) 2,3,5-Me ₃ -Ara | +++ | 12.8 | + | + |
| 2) 2,3-Me ₂ -Ara | +++ | 26.1 | | |
| 3) 2,5-Me ₂ -Ara | ++ | 2.8 | | |
| 4) 3-Me ₁ -Ara | ++ | 3.8 | | |
| 5) L-arabinosa | ++ | 3.1 | | |
| 6) 2,3,4-Me ₃ -Xil | +++ | 21.6 | + | + |
| 7) 2,3-Me ₂ -Xil | ++ | 1.2 | | |
| 8) 2,3,4,6-Me ₄ -Gal | ++ | 3.6 | +++ | |
| 9) 2,3,4-Me ₃ -Gal | | | +++ | 23.1 |
| 10) 2,3,6-Me ₃ -Gal | + | 6.0 | + | 17.8 |
| 11) 2,4-Me ₂ -Gal | ++ | 2.4 | | 27.9 |
| 12) 2,6-Me ₂ -Gal | ++ | 3.7 | | |
| 13) 2-Me ₁ -Gal | ++ | 7.9 | | |
| 14) 3,4-Me ₂ -Gal | | | ++ | 7.9 |
| 15) 3-Me ₁ -Ram | ++ | 5.1 | +++ | 23.2 |

+ trazas, ++ poco, +++ mucho.

Tabla VII. Derivados metilados producidos durante la hidrólisis del mucílago, mucílago reducido, polisacárido degradado y polisacárido degradado y reducido, todos ellos metilados(47, 48).

muy difícil lograr la hidrólisis total de todos los enlaces-glicosídicos del ácido D-galacturónico, por lo cual, existe una buena porción de azúcares neutros unidos al derivado metilado de este ácido urónico, así, sólo menciona si la cantidad de un derivado metilado en el hidrolizado es mucha - (+++), poca (++) o muy poca (+). Para evitar este problema-antes de metilar a los polisacáridos se les puede reducir - con algún agente reductor como el hidruro de litio y alumi- nio.

También es necesario señalar que la presencia de cantidades pequeñas del derivado metilado 10 (2,3,6-tri-O-metil - galactosa) en el hidrolizado del polisacárido degradado meti lado y su considerable aumento en el hidrolizado del polisa- cárido degradado, reducido y metilado muestra que éste es un derivado del ácido D-galacturónico.

viii) Estructura química del mucílago.

La tabla VIII muestra el análisis de los resultados ob- tenidos en la oxidación con el ion peryodato y la metilación del mucílago, así como del polisacárido degradado. En la - primera columna se proponen los distintos tipos de enlaces - que puede presentar un residuo para que éste sea degradado o no durante la oxidación con el ion peryodato, en la segunda- y tercera columnas se muestran los enlaces que presentan los residuos de acuerdo a los resultados obtenidos de la metila- ción (tabla VII). A partir de las cantidades proporcionadas por McGarvie(48) de los derivados metilados y los porcenta - jes de residuos degradados durante la oxidación con peryoda- to se puede conocer la proporción de los distintos tipos de-

| RESIDUOS NO DEGRADADOS EN LA OXIDACION CON PERIODATO | TIPOS DE ENLACES SUCEPTIBLES DE SER OXIDADOS | ENLACES PRESENTES EN LOS RESIDUOS DE PARTIDA A LOS QUE SE LES SUCEPTIBLES EN LA METILACION DEL POLISACARIDO | | | ENLACES PRESENTES EN LOS RESIDUOS DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA METILACION DEL POLISACARIDO DEGRADADO | | |
|--|---|---|-------------------------------------|----------------------|---|----------------|---------------------|
| | | derivados metilados | enlaces | cantidad aproximada | derivados metilados | enlaces | cantidad aproximada |
| L-ranosa | 1→2, 4 1→3, 4 1→6 | 15 | 1→, 2, 4 | 100 % | 15 | 1→, 2, 4 | 75 % |
| D-galactosa | 1→3, 6 1→2, 4 1→2, 4, 6 1→2, 3, 4, 6 1→3, 4, 6 1→3, 4, 6 | 11 12 13 | 1→, 3, 5 1→, 3, 4 1→, 3, 4, 6 | 12 % 18 % 38 % | - | - | - |
| L-rabinosa | 1→2, 5 1→3, 5 1→2, 3, 5 | 4 3 5 | 1→, 2, 5 1→, 3 1→, 2, 3, 5 | 8 % 6 % 6 % | - | - | - |
| RESIDUOS DEGRADADOS EN LA OXIDACION CON PERIODATO | TIPOS DE ENLACES SUCEPTIBLES DE SER OXIDADOS | derivados metilados | enlaces | cantidad aproximada | derivados metilados | enlaces | cantidad aproximada |
| L-ranosa | 1→, 2 1→, 4 final | - | - | 0 % | 14 | 1→, 2 | 25 % |
| D-xitosa | 1→, 2 1→, 4 final | 7 6 | 1→, 4 final | 5 % 95 % | 6 | final | trazas |
| D-galactosa | 1→, 3, 6 1→, 2, 4, 6 1→, 3, 6 final | 10 8 | 1→, 4 final | 15 % 17 % | 9 8 | 1→, 6 final | 42 % 57 % |
| L-rabinosa | 1→, 5 final | 2 1 | 1→, 5 final | 5 % 26 % | 1 | final | trazas |
| Ac. D-galacturónico | 1→, 2 1→, 4 | 10 | 1→, 4 | 100 % | 10 | 1→, 4 | 100 % |

Tabla VIII. Posiciones de enlace de los residuos constituyentes del mucilago y polisacárido degradado de la *O. ficus-indica*.

enlaces presentes en los residuos del mucílago y del polisacárido degradado.

El núcleo del mucílago de la *O. ficus-indica* es una estructura compuesta por los residuos del ácido D-galacturónico y la L-ramnosa unidos entre sí de manera alternada, ya que la presencia del oligosacárido 2-O-(ácido L-D-galactopiranosilurónico)-L-ramnosa en el hidrolizado del polisacárido degradado y la relación molar muy parecida de ambos residuos en el mucílago y el polisacárido degradado, así lo dan a entender. La presencia del 100 % de residuos de L-ramnosa en lasada de la forma 1- \rightarrow ,2,4 en el mucílago y aproximadamente el 25 % con 1- \rightarrow ,2 en el polisacárido degradado muestra que la L-ramnosa se une al ácido D-galacturónico por los átomos de carbono 1 y 2 y se ramifica por el 4. Por otro lado, el ácido D-galacturónico se une a la L-ramnosa por los carbonos 1 y 4.

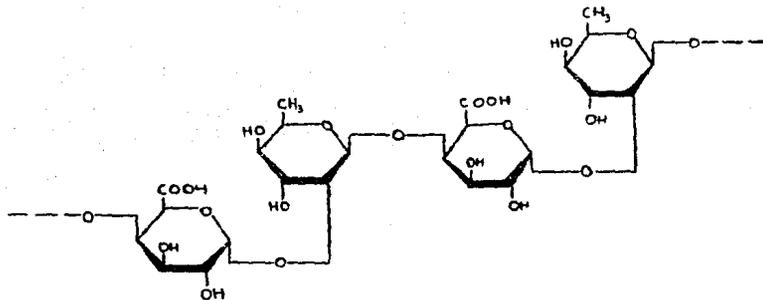


Figura 9. Estructura del núcleo del mucílago de la *O. ficus indica*.

Al núcleo del mucílago están unidas moléculas de D-galactosa, por esta razón, en el polisacárido degradado se encuentra una buena cantidad de estos residuos (tabla V). Por otro lado, la producción del trisacárido VIII y del disacárido II durante la hidrólisis parcial del mucílago (tabla VI) y la gran cantidad de los residuos de la D-galactosa enlazados de la manera $1 \rightarrow 3, 4$, $1 \rightarrow 3, 4, 6$ y $1 \rightarrow 3, 6$ muestran que las ramificaciones del núcleo están formadas por una estructura central, la cual está constituida por tres moléculas de D-galactosa unidas entre sí por enlaces del tipo $1 \rightarrow 6$, a la estructura central de las ramificaciones van unidos grupos R por las posiciones 3 y/o 4 de los residuos de D-galactosa. Con esta información McGarvie(48) propone una estructura básica para el mucílago de la *O. ficus-indica* (figura 10).

De la estructura aún se ignora si todas las ramificaciones del núcleo son idénticas entre sí o no, al igual que se desconoce cual es la colocación correcta (en la cadena central de las ramificaciones) de los residuos de D-galactosa con bifurcaciones en las posiciones 3 y 3,4.

La secuencia exacta de los grupos R es desconocida pero se sabe que están formados principalmente por la L-arabino-sa, D-xilosa y una pequeña cantidad de la D-galactosa. Con los resultados obtenidos por McGarvie(46, 47, 48, 49) pueden ser propuestas varias estructuras para los grupos R:

a) Quizás algunas moléculas de L-arabino-sa sean grupos R, ya que existe una buena cantidad de estos residuos en el mucílago como grupos finales (17 %).

b) En la tabla VIII se sugiere que la mayor parte de - la D-xilosa está presente en el mucílago como grupo final - (95 %) y también que existe una pequeña cantidad (5 %) de - D-xilosa enlazada por las posiciones 1 y 4, sin embargo, en el material de bajo peso molecular producido durante la hi - drólisis parcial del mucílago no fue identificado ningún re - siduo de D-xilosa que no estuviese como grupo final (tabla - VI), por lo que es posible que el derivado metilado 7 (2,3 - di-O-metil-xilosa) presente en el hidrolizado del mucílago - metilado sea un subproducto de la metilación y por lo tanto - todos los residuos de la D-xilosa sean grupos finales en el - mucílago de la O. ficus-indica. En el material de bajo peso molecular no se identificó ningún oligosacárido en el cual - la D-xilosa estuviese unido a algún residuo de la D-galacto - sa, por lo tanto, la D-xilosa no puede ser en si un grupo R.

Posiblemente sean grupos R (o parte de algunos de - ellos) los oligosacáridos VII y XI (tabla VI), ya que éstos - son, respectivamente, el disacárido y trisacárido producidos en mayor cantidad durante la hidrólisis parcial del mucíla - go. Por otro lado, si estos oligosacáridos fueran grupos R, se podría explicar el porque la L-arabinosa se encuentra enlazada principalmente por las posiciones 1 y 5 (tabla VIII).

c) No obstante su menor cantidad, también se deben de - proponer los oligosacáridos X y XII como posibles estructu - ras R para explicar su presencia en el material de bajo peso molecular producido durante la hidrólisis parcial del mucíla - go (tabla VI) y posiblemente algunos de estos oligosacáridos podrían estar ramificados por las posiciones 2, 3 y 5 de los

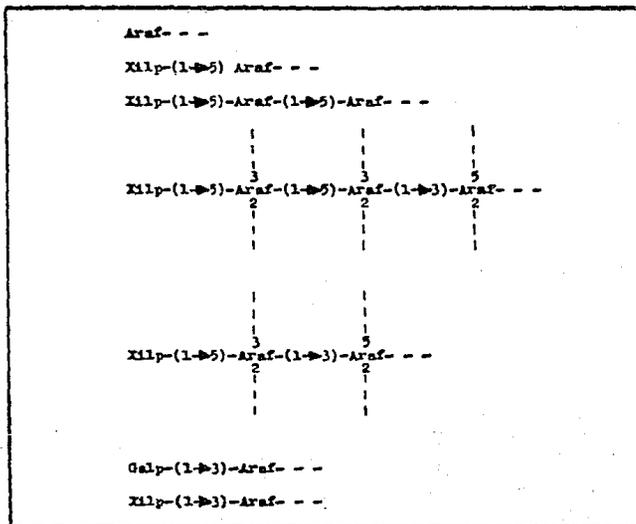


Tabla IX. Posibles estructuras para los grupos R de el mu - cflago de la O. ficus-indica.

residuos de L-arabinosa y así se explicaría el que haya en el mucílago de la *O. ficus-indica* residuos de L-arabinosa enlazados de la manera 1-►,2,5 y 1-►,2,3,5 (tabla VIII), estas ramificaciones podrían estar formadas por residuos de D-galactosa, D-xilosa y L-arabinosa.

d) Los disacáridos III y IV podrían ser grupos R, pero cabe la posibilidad de que estos sean parte de grupos como los mencionados en el inciso c.

Por lo anterior, se puede afirmar que hasta el momento todavía es difícil saber cual es la estructura correcta de los grupos R y por lo mismo falte aún información para llegar a conocer completamente la estructura del mucílago de la *O. ficus-indica*.

2. Goma de la *O. fúlgida*.

Al exudado producido por la *O. fúlgida* se le conoce con el nombre de goma de cholla (cholla gum)(16), este fue uno de los primeros polisacáridos de *Opuntias* estudiadas, los reportes de la literatura datan prácticamente desde el siglo pasado(70). La goma, tal como es excretada por el vegetal no es un compuesto simple(61); se sabe que en su mayor parte está formada por carbohidratos pero aún no es bien conocida la naturaleza de sus otros componentes, sin embargo, cuando la goma es disuelta en disoluciones de hidróxido de sodio desprende amoniaco(17, 55), lo que indica que se encuentran en el exudado algunos compuestos de nitrógeno, por otro lado, se han encontrado en la goma algunas fracciones que son-

solubles en éter etílico(61).

a) Propiedades fisicoquímicas.

La goma de cholla(16) presenta una coloración que va del amarillo claro hasta el café oscuro, tiene sabor y olor característicos(6, 17, 55, 61), es relativamente poco soluble en agua, lo es ligeramente más en las disoluciones concentradas de NaOH y amoníaco, aunque prácticamente no se disuelve en los disolventes orgánicos(6).

En general, no se han realizado estudios extensos sobre las características fisicoquímicas de esta goma como en el caso de la *O. ficus-indica*. Se le ha determinado el contenido de nitrógeno, cenizas y de grupos metoxilos(17, 6, 50), - resultados que se muestran en la tabla X. Es conveniente recordar que la cantidad de nitrógeno presente en un polisacárido da información de la forma en que ha sido extraído y frecuentemente se toma como una medida de la pureza de estas sustancias(18).

| Referencia | Anderson (6) | Brown (17) | Parikh (54) |
|------------|-----------------|----------------|----------------|
| nitrógeno | 0.4 % | menos de 0.2 % | |
| cenizas | 5.0 % | 2.5 % | 0.7 % |
| metoxilos | | menos de 1.0 % | |

Tabla X. Contenido de N, cenizas y metoxilos en la goma de cholla.

La rotación óptica de la goma de cholla fue medida por Brown(17) y Parikh(54) obteniendo los valores de -83 y -86.2 grados respectivamente; el peso equivalente calculado por es tos mismos autores fue de 1690 y 1734.

b) Análisis estructural de la goma.

Al igual que en el caso del mucílago de la *O. ficus-indica*, para la elucidación de la estructura química de la goma de cholla han sido utilizadas un buen número de técnicas analíticas (tanto químicas como físicas), por añadidura, la secuencia analítica empleada en uno y otro casos es básicamente la misma. No obstante, el análisis estructural de cada polisacárido presenta sus particularidades, debidas en gran medida a su propia naturaleza.

i) Composición química.

Como ya se mencionó, la goma de cholla está constituida principalmente por carbohidratos, éstos tienen estructura química similar(17, 55) y son heteropolisacáridos de naturaleza ácida que posiblemente en su estado natural están formando sales de calcio y magnesio, ya que en la goma se ha detectado la presencia de cantidades significativas de estos metales(6), por otra parte, estos polisacáridos están constituidos por la D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y el ácido D-galacturónico(17, 54, 61), en la tabla XI se muestran las proporciones de estos residuos reportadas en los distintos trabajos efectuados sobre la goma de cholla.

| Referencia | Sands (61) | Brown (17)* | Parikh (54, 55, 56) |
|---------------------|---------------|----------------|------------------------|
| | % | % | % |
| D-galactosa | 8.4 | 52 | 31.7 |
| L-arabinosa | 53.2 | 32 | 51.5 |
| D-xilosa | | 15 | 15 |
| L-ramnosa | 5.5 | trazas | 2.3 |
| Ac. D-galacturónico | 11.5 | 11.45 | 9.2 |

* Datos calculados por Parikh(54, 55, 56) a partir de los resultados reportados por Brown(17).

Tabla XI. Proporción de monosacáridos en la goma de cholla.

Como puede observarse en la tabla XI, los resultados obtenidos por Brown(17) y Parikh(54, 55, 56) para la composición del polisacárido son muy similares, no así los de Sands (61), ésto posiblemente se deba a las diferentes técnicas analíticas utilizadas, ya que en 1925 (año en el que Sands realizó el trabajo) no habían aparecido en el campo de los carbohidratos algunas técnicas muy importantes, como por ejemplo la cromatografía, la cual les permitió tanto a Brown como a Parikh identificar, separar y cuantificar más fácilmente los residuos de la goma.

ii) Hidrólisis parcial de la goma.

Por los resultados obtenidos durante la serie de hidrólisis parciales que le efectuó a la goma, Sands(61) consideró que este polisacárido tenía un núcleo ácido constituido -

por los residuos de la L-ramnosa y el ácido D-galacturónico, más tarde, Brown(17), también con la ayuda de la hidrólisis, estableció que el núcleo lo formaban la D-galactosa y el ácido D-galacturónico, años después, Perikh(54, 55) sometió a la goma a una hidrólisis parcial en condiciones de reacción muy suaves (H_2SO_4 al 3 % a $90^\circ C$ por 10 horas) y encontró - que se produce el oligosacárido 3-O-(ácido β -D-galactopirano silurónico)-D-galactosa, un ácido aldotriurónico (que desgraciadamente no pudo conocer su estructura) y algunas trazas - de L-ramnosa, por lo cual el núcleo del polisacárido no puede estar formado por el ácido D-galacturónico ni la L-ramnosa.

La hidrólisis parcial de la goma en condiciones de reacción aún más fuertes (H_2SO_4 6N a temperatura ambiente por 21 días) produce varios compuestos, así, de la disolución obtenida puede ser precipitada una goma degradada como sales de bario, por otra parte, el examen cromatográfico de los compuestos que permanecen en disolución reveló que estos son - los monosacáridos: L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa y una serie de oligosacáridos mostrados en la tabla XII(54, 56).

| OLIGOSACARIDOS | OLIGOSACARIDOS |
|---|---|
| I) β -D-Galp-(1 \rightarrow 6)-D-Gal | IV) β -D-Xilp-(1 \rightarrow 5)-L-Ara |
| II) β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-D-Gal | V) β -D-Galp-(1 \rightarrow 3)-L-Ara |
| III) α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)-L-Ara | VI) β -D-Xilp-(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)-L-Ara |

Tabla XII. Oligosacáridos producidos durante la hidrólisis parcial de la goma de cholla.

iii) Estructura de la goma degradada.

Debido a que el peso equivalente de la goma degradada, -determinado experimentalmente, es de 920 y su hidrólisis total produce principalmente los residuos D-galactosa y ácido-D-galacturónico en una relación aproximada de 9 a 2 respectivamente, Parikh(54, 55) llegó a la conclusión de que la goma degradada está constituida en promedio por once residuos de hexopiranosas. Con la base anterior y por los resultados obtenidos durante la metilación, oxidación con peryodato y una pseudo degradación de Smith (ver capítulo V en la parte de la degradación de Smith), Parikh propuso una estructura para la goma degradada (figura 11), en ella se puede observar que el núcleo del polisacárido de la goma de cholla está constituido por galactopiranosas, mientras que el ácido D-galacturónico y la L-ramnosa se encuentran localizados en cadenas laterales, así, se podrá notar que la estructura de la goma de cholla es muy diferente a la del mucílago de la *O. ficus-indica*.

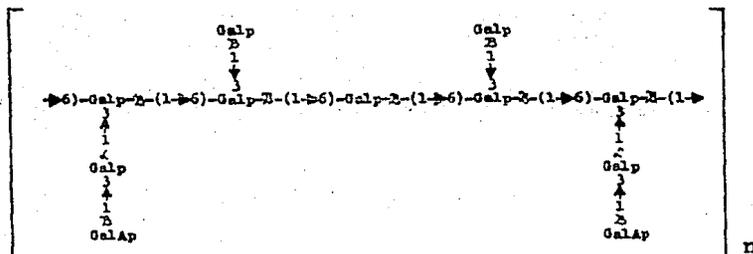


Figura 11. Estructura propuesta por Parikh para la goma degradada.

En la tabla XIII se comparan los resultados que Parikh obtuvo experimentalmente de la goma degradada(54), con aquellos que calculó teóricamente a partir de la estructura por él propuesta, de esta manera, se puede notar que los resultados teóricos y experimentales son muy parecidos, lo cual confirma la estructura de la goma.

| | RESULTADOS EXPERIMENTALES | RESULTADOS TEORICOS |
|---|--|---|
| Peso equivalente | 920 | 905 |
| Acidos urónicos | 19.1 % | 19.5 % |
| Consumo de Ac. - periyódico | 0.93 moles/ $C_6H_{10}O_5$ | 0.9 moles/ $C_6H_{10}O_5$ |
| Ac. fórmico libe- rado | 0.47 moles/ $C_6H_{10}O_5$ | 0.44 moles/ $C_6H_{10}O_5$ |
| Productos de una seudo degrada - ción de Smith | 6 m de galactosa 5 m de glicol-aldehido 2.5 m de Ac. glicérico 2.5 m de glicerol | 6 m de galactosa 5 m de glicol-aldehido 2 m de Ac. glicérico 3 m de glicerol |
| Derivados en el- hidrolizado de - la goma degrada- da metilada | 2 m de 2,3,4,6-Me ₄ -Gal 1 m de 2,3,4-Me ₃ -Gal 2 m de 2,4,6-Me ₃ -Gal 4 m de 2,4-Me ₂ -Gal 2 m de 2,3,4-Me ₃ -Gala | los mismos |

Tabla XIII. Resultados teóricos y experimentales obtenidos por Parikh(54) para la goma degradada.

| | RESULTADOS EXPERIMENTALES | RESULTADOS TEORICOS |
|---|--|--|
| Feso equivalente | 1690(17) - 1734(54) | 1728 |
| Acidos urónicos | 10.15(54) - 10.4(17) | 11.22 % |
| Consumo de Ac. - periyódico | 0.73 moles/C ₆ H ₁₀ O ₅ | 0.72 moles/C ₆ H ₁₀ O ₅ |
| Ac. fórmico libe rado | 0.14 moles/C ₆ H ₁₀ O ₅ | 0.138 moles/C ₆ H ₁₀ O ₅ |
| Productos de una pseudo degrada - ción de Smith | 30 ± 2 % de D-Gal 25 ± 2 % de glicerol 20 ± 2 % de glicol al - dehido 10 ± 2 % de D-Gala 5-6 % de L-Ara 5-6 % de etilen glicol 2-3 % de L-Ram | 28.4 % de D-Gal 25.8 % de glicerol 22.1 % de glicol aldeh ido 10.2 % de D-Gala 5.3 % de L-Ara 5.3 % de etilen glicol 2.9 % de L-Ram |
| Derivados en el - hidrolizado de - la goma de cho - lla metilada | 9 m de 2,4-Me ₂ -Gal 6 m de 2,3,4-Me ₃ -Xil 3 m de 2-Me ₁ -Gala 12 m de 2,3,5-Me ₃ -Ara 3 m de 2,3-Me ₂ -Ara 3 m de L-Ara - m de 2,4-Me ₂ -Ram | 9 m de 2,4-Me ₂ -Gal 5 m de 2,3,4-Me ₃ -Xil 3 m de 2-Me ₁ -Gala 11 m de 2,3,5-Me ₃ -Ara 5 m de 2,3-Me ₂ -Ara 3 m de L-Ara 1 m de 2,4-Me ₂ -Ram |

Tabla XIV. Resultados teóricos y experimentales obtenidos -
por Parikh y Brown para la goma de cholla.

Al igual que en el caso de la goma degradada, se pueden comparar algunos resultados experimentales obtenidos por Farikh(54, 56) y Brown(17) a partir de la goma de cholla (tabla XIV), con los resultados teóricos provenientes de la estructura propuesta por Farikh, de esta forma, ya que los resultados son muy similares, es grande la posibilidad de que la estructura propuesta por Farikh sea correcta.

3. Gomas y mucílagos de otras especies de Opuntias.

Como ya se ha mencionada, los trabajos publicados sobre gomas y mucílagos de otras Opuntias, diferentes de *O. ficus-indica* y *O. fúlgida*, son escasos, por tal razón en este trabajo se ha optado por tratar los polisacáridos de *O. aurantiaca*, *O. brasilliensis*, *O. megacantha*, *O. dillenii*, *O. monogantha* y *O. nopalea-coccinillifera* de manera conjunta.

a) Composición y estructura química.

En primer lugar, se presenta en la tabla número XV la composición en por ciento reportada para estas Opuntias por diferentes autores(50, 51, 56, 68). Cabe hacer mención, que no se han llevado a cabo estudios precisos sobre los heteropolisacáridos formadores de estas gomas y mucílagos, por lo que no ha sido posible proponer una estructura definida de los mismos; lo que a continuación se presentará, son los avances realizados y logros obtenidos hasta el momento.

Para el caso de la *O. aurantiaca*, McGarvie(50) encontró que el mucílago tiene una estructura más compleja que el correspondiente de la *O. ficus-indica* y que básicamente difie-

re de este último, entre otras cosas, en que presenta residuos de ácido D-galacturónico situados en cadenas laterales del polisacárido y que tiene un núcleo formado por residuos de L-ramnosa y ácido D-galacturónico, predominando el primero en una proporción aproximada de 2 a 1. Por otro lado, Moyna(51) en los mucílagos de las Opuntias monocantha y nepalea-coccinillifera y Lothar(38) en las de aurantiaca y brasiliensis, han llegado a sospechar que estos polisacáridos pueden tener, igual que en el caso de los mucílagos anteriores, un núcleo formado por residuos de L-ramnosa y ácido D-galacturónico, pero aún faltan más trabajos para estar completamente seguros de la composición de los núcleos de los polisacáridos de estas especies de Opuntias.

| Opuntia | aurantiaca' | | brasil- liensis' | megacantha' | dillenii'' |
|--------------------|------------------|---------------|---------------------|-----------------|--------------------|
| | McGarvie (50) | Moyna (51) | Moyna (51) | Stephen (68) | Srivastava (66) |
| Referencia | % mol | % mol | % mol | % mol | % mol |
| -galactosa | 35 | 38.3 | 49.8 | 46 | 75 |
| -arabinosa | 32 | 30.8 | 26.2 | 30 | 25 |
| -xilosa | 20 | 14.0 | 8.6 | trazas | |
| -ramnosa | 6 | 10.3 | 9.4 | 11 | |
| c. D-galacturónico | 7 | 6.6 | 6.1 | | |

' mucílago, '' goma.

Tabla XV. Composición de gomas y mucílagos de algunas Opuntias.

Para el mucílago de la *O. dillenii*, Srivastava(66) estableció que este es un arabinogalactano, el cual consiste de una cadena principal formada por residuos de D-galactopiranosas unidas entre sí por enlaces del tipo 1→4 con una configuración anomérica beta (β), mientras que las unidades de L-arabinosa, que son residuos finales no reductores están unidos al galactano por la posición 3 de los galactopiranosidos, siendo este polisacárido muy diferente a los mucílagos de las 2 especies de *Opuntias* mencionadas. Por su parte, también Stephen(68) reporta algunas diferencias de la goma de *O. megacantha* con los polisacáridos anteriores, mencionando que ésta contiene algunos residuos de L-ramnosa situados como grupos finales.

En la tabla XVI se presentan los distintos derivados metilados que se han encontrado en el hidrolizado de los mucílagos y las gomas metiladas de algunas *Opuntias*, no pudiendo hacerse comparaciones de tipo cuantitativo entre ellos, ya que están reportados en diferentes formas y en algunos casos sólo se indica su presencia o ausencia.

Srivastava(66) efectuó una oxidación con peryodato al arabinogalactano de la *Opuntia dillenii*, encontrando que éste consume 0.661 moles de peryodato y libera 0.029 moles de ácido fórmico por unidad de azúcar anhidro promedio de hexopiranosas. Ya que no se han realizado otro tipo de oxidaciones o hidrólisis controladas en estos mucílagos; sería muy conveniente efectuar análisis más completos de estas gomas y mucílagos que permitan llegar a conocer su posible estructura.

encia

VADO
LADO

| | McGarvie (50) | Moyna (51) | Moyna (51) | Srivastava (66) | Lothar (38) | Lothar (38) |
|--------------------------|------------------|---------------|-----------------|--------------------|----------------|-----------------------------|
| | aurantiaca | | brasilien- s | dillenii | monocantha | nopalea-co- ccinillifera |
| 2-Me ₁ -Gal | X | | | | | |
| 2,4-Me ₂ -Gal | X | | | | | |
| 2,3-Me ₂ -Gal | X | | | | | |
| 2,6-Me ₂ -Gal | X | | | X | | |
| 3,6-Me ₂ -Gal | X | | | | | |
| 3,4-Me ₃ -Gal | X | | | | | |
| 3,6-Me ₃ -Gal | X | X | X | X | | |
| 4,6-Me ₃ -Gal | X | trazas | X | | | |
| 4,6-Me ₄ -Gal | X | X | X | X | X | X |
| L-arabinosa | X | | | | | |
| 3-Me ₁ -Ara | X | | | | | |
| 2,5-Me ₂ -Ara | X | | | | | |
| 2,3-Me ₂ -Ara | X | X | X | X | X | X |
| 3,5-Me ₃ -Ara | X | X | X | X | trazas | trazas |
| 3,4-Me ₃ -Xil | X | X | X | X | X | X |
| 3-Me ₁ -Ram | X | trazas | X | | | |

Tabla XVI. Derivados metilados en los hidrolizados de gomas y mucílagos metilados de varias especies de Opuntias.

b) Propiedades fisicoquímicas.

La cantidad de cenizas, nitrógeno, ángulo de rotación óptica y el peso equivalente que se han reportado para algu-

nos de estos compuestos se muestran en la tabla XVII, nótese, que respecto al valor de la rotación óptica, como el arabinogalactano de la *O. dillenii* y la goma de la *O. megacantha* - son valores positivos, muy diferentes a los que se habían reportado para el resto de mucílagos y gomas de las *Opuntias*, - esto concuerda con lo mencionado anteriormente en relación - de que estos polisacáridos tienen diferente estructura al de mucílagos y gomas del resto de las *Opuntias* estudiadas.

| Referencia | McGarvie (50) | Srivastava (66) | Stephen (68) |
|-----------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| <i>Opuntia</i> | aurantiaca | dillenii | megacantha |
| nitrógeno | 0.5 % | | |
| cenizas | | 0.8 % | |
| $[\alpha]_D$ (grados) | + 35.4 | + 267 | + 28 |
| peso equivalente | | | 1250 |

Tabla XVII. Algunos componentes inorgánicos y características fisicoquímicas de varios heteropolisacáridos.

4. Substancias pécticas en *Opuntias*.

A pesar que se ha reportado que algunas especies de *Opuntias* son productoras en cantidades apreciables de substancias pécticas (22, 59, 62, 81, 82), los trabajos referentes a la determinación de las características estructurales, funcionales y biológicas de estos polisacáridos han escaseado.

Se ha mencionado que las sustancias pécticas de las -
Opuntias no poseen las cualidades apropiadas para su uso a -
nivel industrial(24), también se ha investigado su composi -
ción química en el caso particular de la O. ficus-indica -
(56), y se ha dicho que estos polisacáridos toman parte activa
en el proceso de maduración de sus frutos(53, 79). Pero -
en vista del potencial económico que podría significar su -
utilización, sería apropiado investigar a fondo las substan -
cias pécticas de las diferentes variedades de Opuntias.

IV. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE LAS GOMAS Y MUCILAGOS DE LAS OPUNTIAS.

En el aspecto biológico, al igual que en otros campos de estudio, los trabajos publicados sobre las gomas y mucilagos de las Opuntias son relativamente pocos, siendo el mucilago de la *O. ficus-indica*, a quien se le ha efectuado el mayor número de investigaciones. En este capítulo se revisarán en forma general las características biológicas de estos compuestos.

1. Localización biológica.

a) De las gomas de Opuntias.

Hasta el momento se tiene poca información de los tejidos y células que intervienen en la producción de las gomas vegetales, no obstante, en algunas plantas se ha encontrado que las gomas son producidas en células que se desarrollan en el parénquima del floem, estas células tienden a formar conductos por donde la goma es transferida(18). En relación a las gomas excretadas por las Opuntias, hasta el momento, todavía no se han efectuado trabajos a este respecto, por lo que se desconoce a ciencia cierta el sitio y mecanismo por medio del cual estas plantas excretan las gomas vegetales.

b) De los mucilagos de Opuntias.

Los estudios realizados en la *O. ficus-indica* muestran que el mucilago de esta Opuntia es producido en células especiales del vegetal denominadas "idioblastos", las cuales se-

diferencia muy cerca del meristema apical del vegetal(69).

Las células del mucílago en la *O. ficus-indica* son de tres a seis veces más grandes que las células que las rodean (células del parenquima), por lo cual son fácilmente identificadas a través del microscopio(71). Trachtenberg(71) realizó observaciones con los microscopios óptico y electrónico de las células del mucílago e identificó seis estados de desarrollo en la vida de estas células (tabla XVIII), durante la cual el mucílago va ocupando el espacio entre la pared celular y el plasmalema hasta que llega a ocupar a la célula entera y ésta muere(75). También, durante su desarrollo, la distancia entre las células del mucílago se incrementa debido a que las células del parenquima que las rodean crecen en tamaño y número(71).

Como se muestra en la tabla XVIII, existe una gran actividad del aparato de Golgi durante el desarrollo de las células de mucílago, esto es debido a que el aparato de Golgi es el organelo que lleva a cabo la producción del mucílago (43, 73, 74, 75), por esta misma razón no es raro observar que mientras la mayoría de los organelos presentan una gran actividad lítica en el aparato de Golgi ésta es mínima(77). El mucílago es excretado del aparato de Golgi por pinocitosis inversa ocupando el espacio entre el plasmalema y la pared celular hasta que llega a ocupar la célula entera(71).

Aún no se conoce la vía metabólica mediante la cual la célula sintetiza al mucílago, pero por los estudios realizados(75), cuando a la célula se le suministran algunos precursores marcados con isótopos radiactivos (D-xilosa, mio-inosi

| ESTADO | OBSERVACIONES | CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LA CÉLULA. |
|--------|--|--|
| 1 | Los componentes celulares sufren cambios, tal como si la célula estuviese ordenando su estructura interna para iniciar la producción del mucílago. | Numerosas mitocondrias y ribosomas están presentes, los plástidos tienen poca grana y un pequeño número de tilacóides, los aparatos de Golgi tienen un promedio de seis cisternas y también se observan pequeñas vacuolas de forma variable. |
| 2 | | Se observa principalmente la tendencia a desaparecer de los plástidos, el aumento en cantidad de los retículos endoplásmico liso y rugoso y el alargamiento del aparato de Golgi. |
| 3 | La célula inicia la producción de mucílago. | La mayor parte del volumen citoplasmático está cubierto por mitocondrias y aparatos de Golgi, en estos últimos el número de cisternas ha aumentado un promedio de entre 13 y 16. |
| 4 | Secreción intensiva del mucílago. | La célula aumenta su descomposición y el número de cisternas del aparato de Golgi decrece a seis pero ahora se ven más dilatadas al igual que se observan un gran número de vesículos alargados. |
| 5 | Este es el último estado de actividad citoplasmático. | El citoplasma está lleno de cisternas dilatadas del aparato de Golgi, el protoplasma consiste casi completamente de vesículos secretorios. |
| 6 | La célula está llena de mucílago. | El protoplasma está totalmente degenerado. |

Tabla XVIII. Diferentes estados en el desarrollo de las células de mucílago.

tol, D-galactosa y L-arabinosa), se sabe que la D-xilosa marcada aparece en gran cantidad en el mucílago, al igual que el ácido D-galacturónico radiactivo, el cual es un derivado del mio-inositol, y por lo tanto la D-xilosa y el mio-inositol pueden ser dos importantes precursores del polisacárido. Sin embargo, no sucede lo mismo con la D-galactosa y la L-arabinosa ya que la cantidad presente en el mucílago de estos monosacáridos radiactivos es baja en comparación con la cantidad originalmente suministrada a la célula.

2. Función biológica.

a) De los mucílagos de Opuntias.

A pesar que desde hace ya bastante tiempo se ha investigado en los mucílagos de algunas Opuntias(65), la función biológica de estos compuestos es aún desconocida, pero existen varias hipótesis del porqué las Opuntias producen este polisacárido; como estos vegetales soportan prolongadas épocas de sequía, se piensa que el mucílago podría ayudar al vegetal a conservar humedad, sin embargo, análisis realizados al mucílago de la *O. ficus-indica* han mostrado que la cantidad de agua que puede retener es relativamente baja como para que cumpla eficientemente esta función(70), esto va de acuerdo con los estudios realizados por Sutton(59) en la *O. bigelovii* donde descarta esta posibilidad, pero le atribuye al mucílago un probable rol como carbohidrato de reserva. También se cree que el mucílago ayuda al vegetal a soportar las fuertes heladas, no obstante, para las Opuntias aún no se ha estudiado detenidamente esta posibilidad(70), sin embargo, puede ser significativo que algunas Opuntias aumenten

la cantidad de mucílago en sus tejidos durante el invierno - (28).

Existen otras hipótesis relacionadas con la economía - del calcio por el vegetal. Como ya se mencionó, las cactá - ceas presentan células especializadas (idioblastos) que con - tienen mucílago, también en estos vegetales se han encontra - do células que almacenan oxalato de calcio (Ca^{2+} insoluble), y ya que posiblemente ésta es la principal forma que tiene - el vegetal para almacenar el ion metálico(72) y debido a que en los tejidos de la *O. ficus-indica* aproximadamente un sexto del ion Ca^{2+} insoluble puede ser enlazado por las moléculas del mucílago(72), posiblemente este vegetal utilice al - polisacárido para mantener una reserva secundaria del ca - tión. Por otro lado, ya que el mucílago puede amortiguar - las disoluciones del ion Ca^{2+} (72), también se ha pensado que las Opuntias utilizan a las células del mucílago para mante - ner constante el nivel de Ca^{2+} en sus tejidos(78). Excluyen - do a los idioblastos del mucílago y oxalato de calcio, en ge - neral las células presentan bajos niveles de este ion (apro - ximadamente 10^{-6} M en el citoplasma) pero cuando este ion no está complejado puede ser transportado de célula en célula - por difusión en los tejidos de las Opuntias(78) por lo que - también se ha sugerido que el mucílago toma parte en la regu - lación de este proceso.

b) De las gomas de Opuntias.

Por lo que respecta a las gomas, específicamente en la - goma de cholla, se sabe que su producción es favorecida en - épocas de sequía y calor intenso(17), por lo que podría ser-

utilizada por el vegetal para contrarrestar su excesiva desecación. Sin embargo, la goma, como arabinogalactano que es, podría cumplir algunos de los roles biológicos asignados por Clarke(18) a este tipo de sustancias.

V. TECNICAS ANALITICAS EN POLISACARIDOS (GOMAS Y MUCILAGOS).

En este capítulo se expondrá la metodología de las técnicas de análisis estructural de polisacáridos, utilizadas en el estudio de gomas y mucílagos de Opuntias pero que en general son aplicables a cualquier tipo de polisacáridos.

1. Proceso de aislamiento.

El proceso que se debe utilizar para aislar a una sustancia de origen natural es uno de los problemas más importantes que se presentan cuando se desea estudiar un compuesto de este tipo, debido a que en su medio original se encontrará formando parte de mezclas muy complejas, en donde están presentes sustancias con propiedades químicas y físicas muy parecidas, además, la mayoría de estas sustancias comúnmente son muy sensibles por lo que fácilmente pueden sufrir cambios químicos importantes si las condiciones del medio en el que se hallan no son las apropiadas. En el campo de las gomas y los mucílagos no existe un método generalizado para el aislamiento de estos polisacáridos, sin embargo, normalmente se usa la combinación de varias técnicas para obtener los mejores resultados posibles.

Banks(8) ha planteado las diferentes dificultades que comúnmente se presentan cuando se desea aislar a un polisacárido homogéneo, así, menciona que el problema de la separación puede consistir de: 1) la separación de polímeros que están formados por diferentes azúcares o los mismos pero enlazados de modo diferente, 2) la separación de polímeros que

contienen los mismos azúcares pero en diferente proporción y 3) la separación de polímeros con la misma estructura pero de diferente tamaño molecular; cita también, que el procedimiento utilizado podría modificar la estructura original de la molécula o la distribución en el peso molecular de la misma. En el caso de las Opuntias el proceso de aislamiento de los mucílagos, gomas y pectinas normalmente se ha realizado en cuatro etapas que son: 1) pretratamiento, 2) extracción, 3) purificación y 4) estudio de la homogeneidad, y aunque no todos los investigadores han aplicado las cuatro etapas, se considera que la correcta aplicación de todas ellas es muy importante para obtener los mejores resultados posibles.

a) Pretratamiento del vegetal.

El pretratamiento se le practica al vegetal o la parte del vegetal de donde se aislará el polisacárido y tiene la finalidad de eliminar algunas sustancias que pueden en un momento dado alterar la estructura química del polisacárido o dificultar su extracción. Para efectuar el pretratamiento, normalmente se sumerge, hierve o refluja la muestra en disolventes orgánicos como: acetona, etanol, metanol, cloroformo, etc., debido a que en éstos, los polisacáridos son comúnmente insolubles, mientras que pueden desnaturalizar y eliminar por lo tanto todo rastro de actividad enzimática de la muestra, además de que se pueden eliminar pigmentos, lípidos y algunas otras moléculas biológicas, en la literatura pueden encontrarse numerosos ejemplos de estos pretratamientos.

En el caso de los mucílagos de las Opuntias, de los pretratamientos dados al vegetal, se puede mencionar el efectuado por Smeestad(64) a la O. ficus-indica, quien hirvió los -cladiodos de la planta en etanol, también es importante mencionar el realizado por Srivastava(66), el cual trató prime-ro con acetona y después con tetracloruro de carbono lós cládidos frescos de la O. dillenii.

b) Extracción.

El proceso de extracción de un polisacárido normalmente se realiza utilizando un líquido en el que el polisacárido -es soluble, estos comúnmente son disoluciones acuosas ya sea de ácidos, álcalis, agentes enmascarantes u otros compuestos químicos, sin embargo, el procedimiento no siempre se reali-za con un solo disolvente, en algunos casos se llega a efec-tuar una extracción sucesiva con diferentes disolventes, por ejemplo es muy utilizada la secuencia: agua fría, agua ca-liente, álcali diluido y frío y álcali diluido y caliente, -en donde se obtendrán fracciones de diferente composición y propiedades(8). Una vez realizada la extracción del polisa-cárido de nuestro interés, éste se encontrará en disolución -acompañado por una serie de compuestos de la misma o muy di-ferente naturaleza, por lo que se le precipitará agregando -la suficiente cantidad de un disolvente orgánico (por ejem-plo, etanol, metanol o acetona), aumentando la concentración de iones como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} los cuales forman sales insolubles con aquellos polisacáridos que contienen ácidos urónicos, o agregando agentes complejantes específicos como lo -son las sales cuaternarias de amonio; bromuro de acetiltrim-etilamonio y bromuro de acetilpiridinio. En esta parte del -

proceso de aislamiento es en donde el polisacárido puede llegar a sufrir más fácilmente una transformación en su estructura química, ya que las condiciones utilizadas para efectuar la extracción pueden llegar a ser muy drásticas, por ejemplo, si se utilizan disoluciones muy ácidas puede ocurrir la hidrólisis de los grupos que esterifican los residuos ácidos de la molécula o pueden causar hasta la hidrólisis de algunos residuos del polisacárido, por su parte, los álcalis en las sustancias pécticas cuyos grupos carboxilos están esterificados pueden catalizar una reacción de β -eliminación en donde el enlace glicosídico es roto y produce una estructura insaturada(45).

Los mucílagos, gomas y sustancias pécticas de las Opuntias son extraídos de una forma similar, diferenciándose básicamente en las condiciones del medio utilizadas durante el proceso, así, en tanto que para extraer los mucílagos se pueden utilizar condiciones suaves, para extraer las sustancias pécticas las condiciones utilizadas son relativamente fuertes(31). Por esta razón se ha considerado prudente el describir de manera separada la forma de extracción de cada uno de estos polisacáridos en las Opuntias.

a) El mucílagos de las Opuntias es generalmente extraído homogenizando los tejidos del vegetal en un poco de agua y a temperatura ambiente, siendo obtenida la parte acuosa de la mezcla utilizando ya sea la filtración, la centrifugación o ambas técnicas, posteriormente el mucílagos se precipita agregando la suficiente cantidad (de 3 a 5 volúmenes) de etanol o acetona(38, 46, 50, 51, 70).

Sin embargo, también se ha efectuado la extracción del mucílago de diferente manera y utilizando diferentes condiciones físicas y químicas en el medio, así, Amin(1) realizó la extracción agitando las pencas machacadas de la Opuntia durante 24 horas en HCl 0.1 M a temperatura ambiente, Srivastava(66) por su parte utilizó ácido acético al 3 %, mientras que Smestad(64) realizó el mismo procedimiento pero en agua y a una temperatura entre 60 y 65 °C. Por otro lado, Kara-wya(31) realizó una extracción fraccionada agitando primero los tejidos pulverizados de la Opuntia en una disolución de HCl a un pH de 3.5 durante 12 horas (extracción en frío) y después, a la materia sólida que resistió la extracción anterior le agregó agua hirviendo (extracción en caliente), obteniendo de esta manera dos distintas fracciones. Srivastava y Amin(66, 1) precipitaron al mucílago con disolventes orgánicos, mientras que Smestad(64) liofilizó la disolución, no sin antes filtrarla y dializarla, para obtener el mucílago.

b) Debido a que las gomas de las Opuntias son exudadas, no hay la necesidad de destruir al vegetal, por otra parte, ~~al exudado normalmente se le disuelve en NaOH diluido y ti-~~
~~bio, siendo filtrada la disolución resultante y el polisacá-~~
rido se precipita ya sea, primero acidificando la disolución con HCl diluido y agregando después la suficiente cantidad de alcohol etílico o metílico o agregándole directamente a la disolución el alcohol acidificado con HCl(17, 55). Sin embargo, Sarda(61) realizó la extracción agitando el exudado en 140 veces su peso en agua durante 48 horas, produciendo en la extracción dos fracciones distintas, en donde una era soluble en agua y contenía dos veces más ácidos urónicos que aquella otra fracción que no lo era.

c) Comúnmente cuando se desea analizar el contenido de sustancias pécticas totales en un vegetal, al tejido se le practica una extracción fraccionada, la cual consiste en extraer sucesivamente con agua caliente, ácido mineral diluido (pH 2), álcali u oxalato de amonio frío, de esta manera se obtienen tres o cuatro fracciones distintas(44), precisamente esto es lo que realizó Karawya(31) en la *O. ficus-indica* después de extraer los mucílagos del vegetal. Diacono(22) realizó la extracción agitando los cladidos de la *O. vulgaris* en agua a 90° C durante tres horas. Villareal(81, 82) sin embargo utilizó la clásica extracción utilizada por McCready y McComb(44) para la determinación de sustancias pécticas totales, en la cual se usa un agente secuestrante como el EDTA y la enzima Pectinol 100 D. Las pectinas de las *Opuntias* se han precipitado al igual que los mucílagos y las gomas con disolventes orgánicos(31), o formando las sales in-solubles de calcio y magnesio(22) de estos polisacáridos.

o) Purificación.

Como es sabido, la purificación es un proceso mediante el cual se pretende eliminar de una muestra todas aquellas sustancias que son consideradas como "contaminantes". La purificación de los mucílagos, gomas y sustancias pécticas en el caso de las *Opuntias* se ha realizado de varias maneras, sin embargo, en todos los casos el primer paso consiste en disolver al polisacárido ya sea en agua(17, 31, 38, 46, 50, 51, 55), álcalis o ácidos(66), el siguiente paso es variado, algunos investigadores precipitan de nuevo al polisacárido y repiten varias veces este procedimiento(17, 55), otros dializan la disolución durante varios días(31, 38, 46,

50, 51, 64, 70), le agregan bajas cantidades de algún disolvente como el cloroformo o el ácido tricloro acético(31, 70) para precipitar las proteínas que pudiesen estar presentes - en disolución, la filtran por Millipore(38, 46, 51, 64) o aplican varias de estas técnicas a la disolución, el tercerpaso consiste en obtener de nuevo en forma sólida al polisacárido, ya sea precipitándolo con algunos disolventes orgánicos(1, 17, 31, 50, 55, 66, 70) o liofilizando la disolución(38, 46, 51, 64, 70).

d) Homogeneidad del polisacárido.

El obtener la suficiente evidencia de la homogeneidad química de un polisacárido es un requisito importante para iniciar el estudio estructural de una molécula. Aspinall(7) en la revisión que realizó sobre las gomas y los mucílagos - discutió el termino "homogeneidad de un polisacárido" el cual, como el mismo menciona, es difícil de definir cuando se aplica a macromoléculas tan complejas. En un momento de la investigación de la homogeneidad de un polisacárido ~~podría confundirse con la purificación de la misma molécula~~ pero en realidad esto no es así, la investigación básicamente consiste en averiguar si el polisacárido está constituido por uno o más tipos de macromoléculas, las cuales tendrían semejantes propiedades químicas y físicas.

Las técnicas utilizadas son variadas y pueden ser químicas o físicas, quizás una de las más utilizadas en los mucílagos y las gomas de las Opuntias sea la electroforesis, - así, Brown(17) y Parikh(55) analizaron la homogeneidad de la goma de cholla por medio de la electroforesis de frontera li

bre, mientras que Srivastava(66) en la *O. dilleni* la efectuó por medio de la electroforesis en papel; sobre el uso de esta técnica en la separación de macromoléculas se han publicado artículos(29) y varias revisiones(25, 83) sobre el tema. También ha sido usada la precipitación selectiva de la molécula, ya sea por medio de la formación de sales insolubles, como en el caso del mucílago de la *O. ficus-indica* en el cual McGarvie(46) utilizó el bromuro de cetiltrimetilammonio y Amin(1) quien usó cloruro cúprico, o la precipitación-fraccionada con etanol como la usó Srivastava(66) en la *O. dilleni*, en donde a la disolución del mucílago le agregó etanol precipitando parte de éste, después filtró la disolución y al filtrado le agregó más etanol, precipitando otra parte del mucílago, esta operación se repitió varias veces, estas técnicas han sido revisadas por Banks(8) quien proporciona valiosa información al respecto.

La cromatografía es otra de las técnicas que han sido usadas para investigar la ~~biología de las plantas~~ algunas *Opuntias*, así, McGarvie(46) utilizó una columna de DEAE-celulosa en su forma acetato, empleando como eluyentes disoluciones de ácido acético al 5 % y ácido fórmico también al 5 % por otro lado, Lothar(38) usó una columna de DEAE-Sephadex (A-25) saturada con iones formiatos, usando como eluyente agua, también Smeestad(64) utilizó una columna de DEAE-Sephadex pero en su forma de cloruro, eluyendo sucesivamente con disoluciones de NaCl 0.25 M y 0.5 M a un pH de 7.3 fijado este último con una disolución buffer de Tris-HCl (2-amino-2-hidroxi-metil-1,3-propanodiol) 0.05 M.

2. Degradación específica.

La investigación de la estructura química de un polisacárido involucra la aplicación de varios tipos de análisis, los cuales son: 1) composición, 2) secuencia, 3) tipo de enlaces y 4) configuración anomérica; siendo frecuente el que se use la combinación de múltiples técnicas químicas o físicas en cada uno de estos. Varias de las técnicas de análisis estructural están basadas en un principio común, la degradación específica del polisacárido, es decir, pueden efectuarse transformaciones químicas en ciertas partes de la molécula, con el fin de obtener alguna información sobre su estructura. Como es lógico suponer, en los mucílagos y gomas de algunas Opuntias se han practicado este tipo de técnicas, por lo que a continuación se les exponen.

a) Hidrólisis.

~~La degradación de los polisacáridos por la acción de~~
ácidos es uno de los métodos más usados en la investigación de la estructura química de estos polímeros, la hidrólisis básicamente se ha usado de dos maneras en los carbohidratos, una de ellas consiste en efectuar lo que algunos investigadores han llamado "hidrólisis total", la cual estriba en degradar al polisacárido hasta los monosacáridos que lo forman, siendo éstos posteriormente identificados y cuantificados por algún método fisicoquímico; la otra es realizando una "hidrólisis parcial", es decir, la degradación del polisacárido pero en condiciones de reacción suaves, de tal forma que sólo los enlaces glicosídicos más débiles sean rotos. Con respecto a esto último, la hidrólisis de un carbohidrato es afectada por: 1) el tamaño del anillo, 2) la conformación, 3) la configuración y 4) la posición del enlace(11), -

así, se sabe que los furanósidos y los deoxi azúcares generalmente presentan enlaces glicosídicos lábiles a la hidrólisis, mientras que los residuos de ácidos urónicos y 2-amino-2-dioxihexosas son mucho más resistentes(37), sin embargo, en un polisacárido la hidrólisis también es afectada por algunos otros factores, siendo estos importantes para interpretar los resultados producidos por la hidrólisis parcial, Be-Miller(11) en la revisión que realizó sobre la hidrólisis de los glucósidos resumió estos factores, los cuales son: a) - los enlaces de residuos en posiciones terminales, sean o no grupos reductores, son hidrolizados fácilmente, b) los enlaces de un grupo final reductor es hidrolizado en una relación mayor que otros enlaces, c) existe un decrecimiento progresivo en el grado de hidrólisis de los enlaces terminales hacia el interior y d) todos los enlaces en un oligosacárido son hidrolizados en la misma proporción.

1) Hidrólisis parcial.

La hidrólisis parcial tiene la finalidad de romper los enlaces glicosídicos más débiles de la molécula para obtener una serie de mono y oligosacáridos que al ser fraccionados e identificados proporcionarán información sobre la secuencia y configuración anomérica del polisacárido(37), sin embargo, dependiendo de las condiciones de la reacción y de la naturaleza del polisacárido original, se pueden obtener un polisacárido degradado ya que éste generalmente está formado por una cadena central poco ramificada cuya estructura será más fácilmente determinada, además los mono y oligosacáridos obtenidos junto con el polisacárido degradado son parte normalmente de las ramificaciones del polisacárido padre, así,

cuando se conoce la estructura del polisacárido degradado y de los mono y oligosacáridos, generalmente se puede llegar a establecer en gran medida la estructura del polisacárido padre(7, 46, 47, 48, 49, 54, 55, 66).

La hidrólisis debe de realizarse bajo condiciones lo más suaves posibles, debido a que ésta siempre va acompañada por algo de degradación en los azúcares. Tampoco se debe olvidar que la hidrólisis ácida es una reacción reversible y, si se usan disoluciones concentradas ~~del polisacárido~~, pueden formarse oligosacáridos que no son característicos del polisacárido original, no obstante, en disoluciones diluidas (menores al 1 %) la reacción reversible no es tan importante y sólo se forman cantidades insignificantes de oligosacáridos(15).

En las gomas y mucílagos de las Opuntias la hidrólisis parcial generalmente se ha realizado en concentraciones diluidas del polisacárido, estas van de 2×10^{-3} a 8.33×10^{-2} g/ml, por otra parte, en la mayoría de los casos las concentraciones de ácido sulfúrico y las temperaturas utilizadas en la reacción son semejantes, 0.01 - 0.05 N y 80 - 100° C respectivamente(17, 46, 50, 66), sin embargo, Parikh(54, 55), para obtener el polisacárido degradado de la goma de cholla, utilizó una concentración de ácido sulfúrico 6 N, pero la reacción la llevó a cabo a temperatura ambiente durante 21 días. El tiempo de reacción de la hidrólisis parcial depende de las condiciones en las que ésta se lleve a cabo, en el caso de las gomas y mucílagos de las Opuntias se puede generalizar diciendo que cuando se usaron temperaturas de reacción cercanas al punto de ebullición del agua, el tiempo

comúnmente utilizado fue de 10 horas(17, 46, 50, 54, 55). - A este respecto, suele suceder que en un medio de reacción - determinado, después de un cierto tiempo el polisacárido ya - no continúe degradándose (esto puede observarse por ejemplo, si la reacción es seguida polarométricamente(17) o tomando - pequeñas alícuotas de la disolución para examinarlas por cro - matografía en papel(46)), de esta forma se puede optar por - suspender la reacción y analizar los productos obtenidos o, - si se cree conveniente, se pueden variar las condiciones del medio para continuar degradando al polisacárido(46).

Frecuentemente, una molécula presenta enlaces glicosídicos que no difieren considerablemente en su fuerza, entonces durante la hidrólisis parcial se obtendrán mezclas muy complejas de oligosacáridos(37), difíciles de analizar y que podrían llevar a conclusiones erróneas, esto puede evitarse - llevando a cabo la hidrólisis parcial en etapas y después de cada etapa, analizando los oligosacáridos producidos(15), - tal como fue realizado por McGarvie(46). Alternativamente, - en algunos casos es posible variar la fuerza de estos enlaces por la modificación química de los residuos del polisacárido(37).

b) Degradación por oxidación con peryodato.

a) Definición de la reacción.

El ion peryodato es un agente oxidante, puede degradar, entre otros, los siguientes tipos de sustancias orgánicas: - 1,2-glicoles, 2-amino alcoholes, α -hidroxicetonas y aldehidos, 1,2-dicetonas y grupos metilenos, sin embargo, en condi

ciones apropiadas de reacción puede oxidar selectivamente - aquellos compuestos que presenten grupos hidroxilos vecina - les, como por ejemplo los carbohidratos que tienen una natu - raleza polihidroxílica(12).

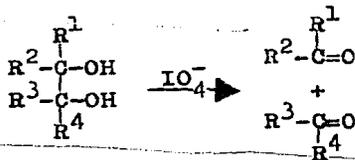


Figura 13. Oxidación con peryodato del 1,2-glicol.

En el análisis estructural de los carbohidratos la reac - ción ha sido ampliamente usada, debido a que normalmente en - un polisacárido parte de los azúcares que lo componen no se - rán oxidados por el ión peryodato(37), por esta razón, el - análisis del peryodato consumido y los productos formados - proporcionarán valiosa información sobre el grado de ramifi - cación, secuencia, tipo de enlaces y en algunos casos el gra - do de polimerización de la molécula. Con respecto a ésto, - existen tres reglas generales para la oxidación con peryoda - to de un azúcar cíclico(12), las cuales nos pueden ayudar a - entender los resultados producidos por la reacción, así: 1) si dos de tres grupos hidroxilos vecinales consecutivos son - cis, la estructura será oxidada más rápidamente que si todos los grupos hidroxilos fuesen trans, 2) un α -hidroxialdehido - es atacado por el ion peryodato pero la velocidad de la hi - drólisis es a menudo baja y 3) un α -hidroxialdehido será oxi - dado relativamente rápido si otro grupo hidroxi se encuentra en una posición γ o δ para permitir al carbonilo la forma -

ción de una estructura pseudo glicol por hemiacetilación cíclica. Por otro lado, para obtener la información más relevante es necesario mantener las condiciones apropiadas de reacción, ya que fácilmente puede ocurrir una sobre oxidación, es decir, que podrían ser oxidados además de los hidroxilos vecinales algunos otros grupos funcionales, lo que nos llevaría a conclusiones erróneas, de esta manera, para saber si la reacción fue selectiva y no ocurrió una sobre oxidación, generalmente son tomadas periódicamente pequeñas alícuotas de la mezcla para analizar el consumo del ion periodato (ya sea por valoración con yoduro o por una medición-espectrofotométrica) o la formación de productos oxidados (el ácido fórmico producido puede valorarse con NaOH), graficando posteriormente los resultados obtenidos en función del tiempo, si la curva obtenida presenta un máximo constante en un lapso razonable (por ejemplo, McGarvie(48) tardó 72 horas en la oxidación del mucílago de la *O. ficus-indica* y en general; ~~se han utilizado tiempos menores a 48 horas en la oxidación de las gomas y mucílagos de otras especies de Opuntias-~~ (1, 47, 54, 55, 66)), ~~la oxidación se ha completado, pero si~~ la curva no muestra un máximo en días o semanas, la reacción deberá ser investigada cuidadosamente variando las condiciones de reacción.

ii) Condiciones de reacción.

pH: En un polisacárido existen enlaces acetales y ésteres que a un cierto valor de pH pueden fácilmente ser hidrolizados, de este modo, la ruptura de cualquiera de estos enlaces durante la oxidación producirá un número mayor de grupos reactivos que el teórico original, así, se ha recomenda-

do que la reacción se lleve a cabo dentro de un intervalo de pH de 3 a 3.5, aunque existen investigadores que han efectuado la reacción fuera de estos límites(12), se sabe además - que las disoluciones de metaperyodato de sodio tienen un pH-alrededor de 4, tal vez, esta sea la razón por la que, en el caso de la oxidación de las gomas y mucílagos de las Opuntias, ninguno de los investigadores verificó el pH de la mezcla de reacción(1, 47, 51, 55, 56, 66).

Temperatura: La reacción de oxidación con peryodato de las gomas y mucílagos de las Opuntias y en general de la mayoría de los carbohidratos se ha efectuado a temperatura ambiente(1, 47, 51, 55, 56, 66), no obstante, disminuyendo la temperatura de la reacción puede bajarse la velocidad de hidrólisis de los acetales, eliminando por lo tanto, una de las causas de la sobre oxidación(12).

Luz: La oxidación con ion peryodato siempre se efectúa en la obscuridad ya que este se descompone espontanea y lentamente en la presencia de luz, se ha encontrado también que el peryodato puede oxidar al ácido fórmico, formaldehído, alcohol metílico, ácido glicólico, ácido oxálico y al glicoxal en un lapso de 10 a 20 días en presencia de luz, sin embargo, en la obscuridad no son afectadas estas sustancias(12).

iii) Aplicación.

Como ya se mencionó, la oxidación con ion peryodato de un polisacárido puede efectuarse de dos formas; analítica y preparativamente. La fase analítica comúnmente incluye el uso de pequeñas cantidades de polisacárido y bajas concentra

ciones del oxidante (0.01 a 0.001 M), la preparativa se realiza con la finalidad de aislar los productos de la reacción, por lo cual se utilizan normalmente cantidades mayores de polisacárido y se investigan los compuestos obtenidos por cromatografía de papel y gases(12). A este respecto, Guthrie(27) ha realizado una revisión de los dialdehidos obtenidos de la oxidación con peryodato de los carbohidratos. En relación a las gomas y mucílagos de las Opuntias, para efectuar la oxidación con ion peryodato las cantidades de polisacárido que han sido utilizadas varían de 48.3 a 250 mg, mientras que las concentraciones de peryodato utilizadas van de 5.11×10^{-3} a 6.5×10^{-2} M, cabe mencionar que varios de los investigadores(47, 48, 66) en la misma reacción han realizado la fase analítica y preparativa de la oxidación con peryodato.

c) Degradación de Smith.

La degradación de Smith es la reducción con borohidruro de sodio del polisacárido que ha sido oxidado con peryodato, seguida de una hidrólisis ácida parcial, así, la reducción producirá azúcares modificados que contendrán grupos acetales no cíclicos, los cuales son hidrolizados mucho más rápido que los enlaces glicosídicos, los productos de la hidrólisis, por lo tanto, serán pequeños fragmentos tales como polioles de 3 o 4 átomos de carbono, glicolaldehido, gliceraldehido, etc. Por otra parte, se ha recomendado que la reducción del polisacárido se debe efectuar en disoluciones concentradas de borohidruro de sodio con el fin de disminuir la competencia de las reacciones de β -eliminación, con respecto a la hidrólisis, se han usado diferentes condiciones de reac

ción, pero preferentemente se ha realizado con ácidos fuertes a bajas temperaturas, ya que en estas condiciones la velocidad de hidrólisis entre los enlaces acetales y glicosídicos es más pronunciada, de este modo, los glicosidos de bajo peso molecular producidos en la degradación de Smith son aislados por cromatografía e identificados por métodos convencionales, proporcionando suficiente información sobre el residuo del que provienen.

La degradación de Smith es una degradación selectiva del polisacárido, en donde se han efectuado las apropiadas modificaciones químicas de algunos residuos para hacer que varios enlaces glicosídicos sean menos resistentes a la hidrólisis ácida, de esta forma, después de una degradación de Smith siempre se obtendrán pequeñas moléculas y un polisacárido degradado.

Sin embargo, muchas veces después de la reducción de los grupos carbonilos producidos en la oxidación del polisacárido con ion peryodato, al polialcohol se le practica una hidrólisis ácida total, así, la caracterización de los productos obtenidos proporcionará valiosa información para la elucidación de la estructura del carbohidrato, por ejemplo, en las gomas y mucílagos de algunas Opuntias se efectuó la hidrólisis total del polialcohol con H_2SO_4 en ebullición, siendo identificados posteriormente algunos monosacáridos que habían resistido la oxidación(47, 55, 56, 61), sin embargo, este procedimiento no es la degradación de Smith, esto debe de recalcarse porque suele haber confusión entre esta degradación no específica y la degradación de Smith(37).

d) Degradación por oxidación con trióxido de cromo.

La oxidación con trióxido de cromo de un carbohidrato - es usada para investigar la configuración anomérica de los - residuos azúcares que lo componen, de este modo, se sabe que un piranósido que está totalmente acetilado será oxidado con trióxido de cromo en la presencia de ácido acético si es un-anómero β , mientras que los α sólo serán oxidados muy lentamente, por otro lado, la oxidación de furanósidos acetilados ocurre independientemente de su configuración anomérica(37).

Existe poca información sobre la oxidación con trióxido de cromo de polisacáridos en comparación a otro tipo de oxidaciones; para el caso del mucílago de la *Opuntia ficus-indica* el proceso se ha llevado a cabo básicamente en dos etapas, la primera consiste en acetilar al mucílago y en la segunda se lleva a efecto la oxidación; la cual se efectúa en un medio ácido, durante la reacción se van tomando de la mezcla pequeñas muestras para ser examinadas cada determinado periodo por cromatografía de gases, de esta manera, McGarvie (46) observó después de un tiempo cuales y cuanto de algunos residuos que constituyen al polisacárido han sido destruidos.

3. Metilación exhaustiva.

a) Metilación.

La metilación de los hidroxilos de un azúcar es una etapa rificación, y como tal, los diferentes métodos utilizados para este fin son muy parecidos a varios de los utilizados en-

química orgánica, por ejemplo, el clásico método de Haworth - en el que se utilizan como agentes metilantes al sulfato de dimetilo e hidróxido de sodio y el método de Hakomori en donde se emplea el yoduro de metilo y el hidruro de sodio son idénticos a la síntesis de Williamson, por otro lado, la metilación con yoduro de metilo y óxido de plata (método de Purdie) también es de uso común en la química orgánica, aunque, en los carbohidratos algunos investigadores han empleado, en lugar de óxido de plata, tanto al etóxido de talio como al anión sulfinilo. Por otra parte, como todas las reacciones de sustitución nucleofílicas, la metilación está influenciada por el disolvente en el que se lleva a cabo la reacción, de este modo, el método de Haworth generalmente se realiza en medio acuoso, mientras que los de Hakomori y Purdie se efectúan en disolventes orgánicos polares, tales como el sulfoxido de dimetilo y la N,N-dimetilformamida.

Respecto a esto, para lograr la total alquilación de los grupos hidroxilos de un carbohidrato, la metilación normalmente se realiza en dos partes, así, para las gomas y mucílagos de las Opuntias, la primera parte regularmente se ha hecho por el método de Haworth(1, 17, 48, 54, 55, 66), aunque también se han aplicado otros procedimientos(47, 48, 50, 55). En la segunda etapa generalmente se aplica el método de Purdie(1, 17, 31, 47, 48, 50, 54) ya que se ha demostrado que el óxido de plata puede degradar aquellos carbohidratos que no están parcialmente metilados(14). Sin embargo, algunos investigadores(38, 51, 64) han efectuado la metilación en una sola etapa, en las gomas y mucílagos coincidentemente todos ellos han utilizado el método de Hakomori.

Una dificultad adicional para aquellos polisacáridos - que contienen ácidos urónicos, como los son las gomas, mucílagos y sustancias pécticas de las Opuntias, es lo difícil que resulta metilar todos los grupos hidroxilos de estos residuos, para superar tal problema, lo común es reducir con hidruro de litio aluminio los grupos carboxilos de los residuos ácidos, metilando posteriormente el polisacárido reducido con las técnicas ya mencionadas(17, 48, 50).

Otro punto importante es saber si durante la metilación exhaustiva todos los hidroxilos de un carbohidrato fueron alquilados, para determinar tan importante cuestión se han utilizado varias características fisicoquímicas de los carbohidratos, sin embargo, la más usada ha sido la absorción de la radiación electromagnética por parte de los grupos hidroxilos en la zona infrarroja ($3400 - 3600 \text{ cm}^{-1}$), de este modo, la ausencia de los picos característicos de los grupos hidroxilos en el espectro infrarrojo de un polisacárido es suficiente evidencia de que este ha sido totalmente metilado(38, 47, 55).

b) Hidrólisis del polisacárido metilado.

Varios son los métodos que se han utilizado para efectuar la hidrólisis total del polisacárido metilado, por un lado, se han empleado ácidos minerales como el ácido sulfúrico y el clorhídrico en medios acuosos(47, 48, 50, 56), pero, debido a que los polisacáridos metilados son poco solubles en agua, generalmente se efectúa la hidrólisis en presencia de disolventes orgánicos, como es el tratamiento del polisacárido con HCl/metanol(1, 17, 38, 55) o con ácido fórmico -

(38), por otra parte, algunos investigadores, después de realizar la hidrólisis del polisacárido en disolventes orgánicos, acostumbran efectuar una segunda hidrólisis con ácidos-minerales, pero esta vez en medio acuoso con la finalidad de romper todos los enlaces glicosídicos del carbohidrato(1, - 38, 55).

c) Identificación y cuantificación de los residuos metilados.

Los residuos metilados, como todos los monosacáridos, - pueden ser separados, identificados y cuantificados por varias técnicas, sin embargo, la más usada es la cromatografía en todas sus modalidades, así, la cromatografía en papel, - placa fina y columna es usada para separar e identificar los derivados metilados(1, 17, 38, 48, 55, 56, 66), no obstante, hace algunos años se utilizaba la extracción y la destilación fraccionada para separar los residuos metilados(17), pero, en comparación con la cromatografía, estas técnicas son muy laboriosas y generalmente ofrecen resultados pobres. - Siempre es recomendable aislar al residuo metilado y preparar derivados, ya que frecuentemente suelen cometerse errores si sólo se usa la cromatografía para identificar al residuo, de este modo, existen tablas en donde se presentan las principales características fisicoquímicas tanto de los residuos metilados como la de sus derivados químicos(39, 40). - La cuantificación de los residuos metilados se realiza en la mayoría de los casos por cromatografía de gases y por cromatografía de gases-espectroscopía de masas.

VI. CONCLUSIONES.

Las estructuras químicas de la mayoría de las gomas y mucílagos de las Opuntias aún no han sido determinadas, por lo que no se pueden realizar comparaciones estructurales entre éstas, sino más bien generalizaciones de las mismas.

De los estudios realizados hasta la fecha, se ha determinado que las gomas y mucílagos de las Opuntias son polisacáridos compuestos por los siguientes residuos azúcares cuya proporción varía dependiendo de la especie de Opuntia que se trate:

| | | |
|---|---|---------------------|
| goma de <i>O. fúlgida</i> | } | D-galactosa |
| mucílago de <i>O. ficus-indica</i> | | L-arabinosa |
| mucílago de <i>O. aurantiaca</i> | | D-xilosa |
| | | L-ramnosa |
| | | Ac. D-galacturónico |
| goma de <i>O. megacantha</i> | } | D-galactosa |
| mucílago de <i>O. monocantha</i> | | L-arabinosa |
| mucílago de <i>O. nopalea-co</i> <i>ccinillifera</i> | } | D-xilosa |
| mucílago de <i>O. brasiliensis</i> | | L-ramnosa |
| mucílago de <i>O. dillenii</i> | } | D-galactosa |
| | | L-arabinosa |

Siendo comunes a todos la D-galactosa y L-arabinosa.

Estos polisacáridos presentan una estructura compleja, formada por una cadena central o núcleo del polisacárido la-

cual se ramifica en mayor o menor grado. Los núcleos, en los casos ya determinados son:

| | | |
|---------------------|---|------------------------------------|
| L-ramnosa | — | mucílago de <i>O. ficus-indica</i> |
| Ac. D-galacturónico | — | mucílago de <i>O. aurantiaca</i> |
| | | |
| D-galactosa | — | mucílago de <i>O. dillenii</i> |
| | — | goma de <i>O. fúlgida</i> |

Por lo que respecta a su función biológica, todavía no se conoce con precisión que papel desempeñan estos polisacáridos en el vegetal. Sin embargo, les han atribuido las más variadas funciones; en especial a los mucílagos de las Opuntias se les ha relacionado principalmente con la economía de agua del vegetal, pero los resultados de los estudios realizados indican que la capacidad de retención de agua de un mucílago, in vitro, no justifica tal función, por lo que sería necesario llevar a cabo nuevos estudios al respecto.

Las gomas y mucílagos de las Opuntias presentan propiedades químicas y físicas similares con polisacáridos de otros géneros vegetales, por lo que se recomienda, como continuación de este trabajo, el estudio de sus propiedades funcionales (poder de gelación, cualidades de las dispersiones que forma, viscosidad de las mismas, etc.) a fin de determinar concretamente su utilidad a nivel industrial, que permita el aprovechamiento de este importante recurso natural que crece en las vastas zonas áridas y semiáridas del país.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1) Amin, El S. y colaboradores. Carbohydr. Res., 1970, -
15, pp. 159-161.
- 2) Anderson, D. M. W. and P. C. Bell. Carbohydr. Res., -
1976, 49, pp. 341-349.
- 3) Anderson, D. M. W. and P. C. Bell. Carbohydr. Res., -
1977, 57, pp. 215-221.
- 4) Anderson, D. M. W. Process Biochem., 1977, 12(10), pp.
24-29.
- 5) Anderson, D. M. W. Process Biochem., 1977, 13(7), pp.-
4-18.
- 6) Anderson, E. Am. J. Pharm., 1925, 97, pp. 589-592. -
Chem. Abstr., 20:300, 1925.
- 7) Aspinall, G. O. Advan. Carbohydr. Chem. Biochem., 1969,
24, pp. 333-379.
- 8) Bands, W. and G. T. Greenwood. Advan. Carbohydr. Chem.,
1963, 18, pp. 357-398.
- 9) Barrientos, P. F. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., 1965, -
XXVI, pp. 87-94.
- 10) Barrientos, P. El nopal; su mejoramiento y utilización
en México. México, Gob. Edo. de Mex., 1981.

- 11) BeMiller, J. N. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 1967, 22, pp. 25-108.
- 12) Bobbit, J. M. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 1956, 11, pp. 1-41.
- 13) Bohiski, R. C. Bioquímica. USA, Fondo educativo interamericano 2a. edición, 1978.
- 14) Bourne, E. J. and S. Peat. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 1950, 5, pp. 145-190.
- 15) Bouveng, H. O. and L. Lindberg. *Advan. Carbohydr. Chem.* 1960, 15, pp. 53-89.
- 16) Bravo, Helia H. Las cactaceas de México. México, UNAM, 1978.
- 17) Brown, F. y colaboradores. *J. Chem. Soc.*, 1949, pp. 1761-1766.
- 18) Clarke, A. E. and R. L. Anderson. *Phytochemistry*, 1979, pp. 521-540.
- 19) Comisión nacional de las zonas áridas. El nopal. México, Inst. Nat. Inv. forestales, 1981.
- 20) Conn, E. E. y P. K. Stumpf. Bioquímica fundamental. México, Limusa 3a. edición, 1976.

- 21) Deuel, H. and E. Stutz. *Advan. Enzymol.*, 1958, 20, pp. 341-382.
- 22) Diacono, H. and V. Massa. *Ann. Pharm. Franc.*, 1948, 6, pp. 457-461. *Chem. Abstr.*, 43:6368c, 1949.
- 23) Díaz, J. L. Usos de las plantas medicinales de México-
(monografías científicas II). México, Instituto-
mexicano para el estudio de las plantas medicina-
les, 1976.
- 24) Escamilla, M. L. A. H. Proyecto para la industrializa-
ción de la tuna. México, tesis de la Facultad de
Química, UNAM, 1977.
- 25) Foster, A. B. *Advan. Carbohyd. Chem.*, 1957, 12, pp. -
81-115.
- 26) Glisksman, M. Gum technology in the food industry -
(Food science and technology, 8). USA, Academic-
Press, 1969.
- 27) Guthrie, R. D. *Advan. Carbohyd. Chem.*, 1961, 16, pp. -
105-158.
- 28) Holthe, P. A. and S. R. Szarek. *Plant Physiol.*, 1985,-
79(1), pp. 219-224.
- 29) Jarvis, M. C. y colaboradores. *Phytochemistry*, 1977, -
16, pp. 849-852.

- 30) Jones, J. K. N. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 1949, 4, pp. - 243-283.
- 31) Karawya, M. S. y colaboradores. *Planta medica, supplement*, 1980, pp. 68-75.
- 32) Kennedy, J. F., A. J. Griffiths and D. P. Atkins. *Gums and stabilisers for the food industry 2 (Applications of hydrocolloids)*, 1984, pp. 417-455.
- 33) Kertesz, Z. I. *Methods in Enzymol.*, 1955, 1, pp. 158 - 163.
- 34) Kintner, P. K. III and J. P. Van Buren. *J. Fd. Sci.*, - 1982, 47, pp. 756-759, 764.
- 35) Latorre, A. Ch. Estudio fisicoquímico de dos polisacáridos (muclago de *O. ficus-indica* Mill y Klebsiella-B K-8) por dispersión de luz, cromatografía en gel y viscosidad. México, tesis de la Facultad de Química, UNAM, 1980.
- 36) Lehninger, A. L. Bioquímica (las bases moleculares de la estructura y función celular). España, Omega-2a. edición, 1979.
- 37) Lindberg, B., J. Lönngren and S. Svensson. *Advan. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1975, 31, pp. 185-240.
- 38) Lothar, M. K. S. y colaboradores. *J. Sci. Fd. Agric.*, - 1975, 26, pp. 993-1000.

- 39) Maher, G. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 1955, 10, pp. 257- -
272.
- 40) Maher, G. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 1955, 10, pp. 273- -
282.
- 41) Martin, D. W., P. A. Mayes y V. W. Rodwll. Bioquímica-
de Harper. México, 8a. edición, 1982.
- 42) Martínez, J. L. Nopal y diabetes. México, tesis de la
Facultad de Medicina, UAM-Iztapalapa, 1987. (en -
prensa).
- 43) Mauseth, J. D. *Bot. Gaz.*, 1980, 141(4), pp. 374-378.
- 44) McCready, R. M. and E. A. McComb. *Anal. Chem.*, 1952, -
24(12), pp. 1986-1988.
- 45) McCready, R. M. Pectin (In methods in food analysis).-
USA, Academic Press, 1970, pp. 565-599.
- 46) McGarvie, D. and H. Parolis. *Carbohydr. Res.*, 1979, -
69(1), pp. 171-178.
- 47) McGarvie, D. and H. Parolis. *J. C. S. Perkin I*, 1979,-
pp. 1464-1466.
- 48) McGarvie, D. and H. Parolis. *Carbohydr. Res.*, 1981, -
88, pp. 305-314.
- 49) McGarvie, D. and H. Parolis. *Carbohydr. Res.*, 1981, -
94, pp. 57-65.

- 50) McGarvie, D. and H. Parolis. Carbohydr. Res., 1981, -
94, pp. 67-71.
- 51) Moyna, P. and J. L. Difabio. Planta medica, 1978, 34,-
pp. 207-210.
- 52) Nelson, D. B., C. J. B. Smith and R. R. Wiles. Food Co
lloids, 1977, pp. 418-437.
- 53) Neubeck, C. E. Fruits, fruit products, and wines (Enzy
mes in food processing). USA, Academic Press, -
1975, pp. 397-442.
- 54) Parikh, V. M. and J. K. N. Jones. J. Polymer Sci: part
C, 1965, (11), pp. 39-48.
- 55) Parikh, V. M. and J. K. N. Jones. Can. J. Chem., 1966,
44, pp. 327-333.
- 56) Parikh, V. M. and J. K. N. Jones. Can. J. Chem., 1966,
44, pp. 1531-1539.
- 57) Pilnik, W. and A. G. J. Voragen. Pectic substances and
other uronides (In the biochemistry of fruits and
their products). USA, Academic Press, 1970, pp.-
53-87.
- 58) Prakash, M. D. and K. Bronson. Advan. Carbohydr. Chem.
Biochem., 1984, 42, 277-

- 59) Ramírez, G. M. Perspectivas de la utilización del nopal y la tuna. México, tesis de la Facultad de Química, UNAM, 1977.
- 60) Salgado, C. M. y A. M. Salgado. El cultivo del nopal; una alternativa económica en suelos áridos y semiáridos. México, Dirección general de distritos y unidades de temporal, 1984.
- 61) Sands, L. and R. Klads. J. Amer. Chem. Soc., 1929, 51, pp. 3441-3446.
- 62) Sawaya, W. N. J. Fd. Technol., 1983, 18, pp. 183-193.
- 63) Serratos, P. M. Evaluación preliminar del contenido energético (azúcares) presentes en algunas variedades de tuna. México, tesis de la Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlan", UNAM, 1987. (en prensa).
- 64) Smestad, P. B. and P. S. Lund. Phytochemistry, 1979, 18, pp. 569-571.
- 65) Spoehr, H. A. The carbohydrate economy of cacti. USA, Carnegie Institution of Washinton, 1919.
- 66) Srivastava, B. K. and C. S. Pande. Planta medica, 1974, 25, pp. 92-97.
- 67) Stanley, H. P. Química orgánica. España, McGraw-Hill-4a. edición, 1982.

- 68) Stephen, A. M. J. S. Afr. Chem. Inst., 1973, 26(2), pp. 45-52. Chem. Abstr., 79:53695t, 1973.
- 69) Sutton, B. G. y colaboradores. Plant Physiol., 1981, - 68, pp. 784-787.
- 70) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. Phytochemistry, 1981, 20(12), pp. 2665-2668.
- 71) Trachtenberg, S. and A. Fahn. Plant Physiol., 1981, - 68, pp. 784-787.
- 72) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. Protoplasma, 1981, - 109, pp. 271-283.
- 73) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. J. Exp. Bot., 1981, - 32(130), pp. 1091-1104.
- 74) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. J. Exp. Bot., 1981, - 32(130), pp. 1105-1113.
- 75) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. Biol. Cell., 1982, - 44, pp. 69-79.
- 76) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. Phytochemistry, 1982, 21(12), pp. 2835-2843.
- 77) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. Biol. Cell., 1982, - 43, pp. 129-134.

- 78) Trachtenberg, S. and A. M. Mayer. *Ann. Bot.*, 1982, 50, pp. 549-557.
- 79) Urquiza, D. O. B. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo*, 1982, 18(1), pp. 68-74.
- 80) Velazquez, G. H. A. Obtención de jarabes de tuna blanca y su uso como potencial energético. México, - tesis de la Facultad de Estudios Superiores "Cuauhtitlan", UNAM, 1985.
- 81) Villarreal, F. y colaboradores. *Ciencia*, 1963, 22(3), - 59-65.
- 82) Villarreal, F. y colaboradores. *Ciencia*, 1964, 23(2), - pp. 75-82.
- 83) Weigel, H. *Advan. Carbohydr. Chem.*, 1963, 18, pp. 61 - 97.
- 84) White, A. y colaboradores. Principios de bioquímica. - España, McGraw-Hill 6a. edición, 1983.