



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DEL MUCÍLAGO DE NOPAL (*Opuntia sp*) COMO
AGENTE AGLUTINANTE DE SÓLIDOS DE YEMA DE HUEVO
DE GALLINA PARA LA OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE
INMUNOGLUBULINA Y (IgY).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

VERA MEDINA MARIANA.

Asesores

MVZ Socorro Magdalena Escorcía Martínez.

IA María Soledad Córdova Aguilar.



1853

Ciudad Universitaria, CDMX.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA.

A mis padres por los valores que me heredaron los cuales dirigen cada una de mis acciones.

A mis compañeros de generación por brindarme enseñanzas tanto académicas como de vida.

A mis compañeros de laboratorio que con su trabajo me enseñaron el significado del compañerismo y amistad.

A mi tía Edith, Roberta y mi prima Tania por brindarme cobijo en su hogar y así poder estudiar más cerca de mi universidad.

A mi tutora Magdalena Escorcía que con su pasión y dedicación me mostró las bondades de la zootecnia avícola la cual se ha convertido en una de mis más grandes pasiones y que a pesar de los obstáculos que se presentaron siempre tuvo esperanza en mí y en mi trabajo.

“La vida es como una caja de bombones, nunca sabes lo que te va a tocar”.

AGRADECIMIENTOS.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia Avícola por permitirme realizar mi fase experimental en sus instalaciones.

Al Instituto Nacional de Pediatría que me apoyó con el material y uso de instalaciones.

A la Dra. María Soledad Córdova por su apoyo en el asesoramiento académico y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A mi tutora Magdalena Escorcía por su acompañamiento.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	7
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	12
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

Se evaluaron tres diferentes biopolímeros de grado alimenticio: mucílago de nopal, goma xantana y carragenina a cinco diferentes concentraciones: 6 mg, 30mg, 60mg, 90 mg, 600 mg, diluidos en 40 mL de agua destilada estéril, para determinar el reactivo más exitoso capaz de separar la fracción sólida de la yema de huevo y de esta manera obtener la concentración más alta de inmunoglobulina Y (IgY).

Se obtuvo líquido vitelino de 120 piezas de huevo comercial que fue diluído en agua destilada estéril vol:vol el cual se distribuyó en diferentes matraces Erlenmeyer junto con cada uno de los biopolímeros en las diferentes concentraciones designadas. A partir de esta dilución se purificó y se obtuvo las IgY las cuales fueron cuantificadas mediante la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación y Nanodrop.

Se compararon las diferentes concentraciones mediante Análisis de Varianza para un diseño factorial 3*5, donde el primer factor fue cada uno de los biopolímeros, mientras que el segundo factor fueron las concentraciones de cada biopolímero. Los supuestos de Normalidad y Homogenidad de varianzas se comprobaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente.

Para las diferencias estadísticas significativas encontradas se utilizó la prueba de Tukey. Se fijó un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ en todas las pruebas estadísticas utilizadas. El procesamiento y análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico R (R Core Team [2017]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) ®.

Cada uno de los biopolímeros se comportó de manera diferente al interactuar con la solución estéril. Esto se debe a que cada polímero tiene una capacidad higroscópica distinta dada su composición química, la cual le confiere a cada polímero una afinidad con el agua diferente. Es así como el mucílago a una concentración de 600mg (13.84mg/ml con una $P < 0.05$), obtuvo los mejores resultados en cuanto a concentración de proteínas en comparación con carragenina y goma xantana (2.46; 0.75mg/ml), en la separación de las fases sólida de la líquida.

En relación con el título de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), no existió diferencia estadística a una concentración de 6 mg con carragenina y goma xantana (9 y 8.83 log₂ respectivamente) y 600 mg de mucílago (9.75 log 2).

INTRODUCCIÓN

Existen más de 1,400 especies de cactáceas en el mundo, de las cuales, 669 viven en México, convirtiéndolo en el país con mayor diversidad (SEMARNAT 2020).

El género *Opuntia-ficus-indica*) mejor conocido como nopal proveniente del náhuatl (*nohpalli*), tiene aproximadamente 220 especies, de las cuales de 60 a 90 radican en el país (Foto 1) (Calva V y Larson J, 2009).



Foto 1: *Opuntia-ficus-indica*, nopal más común en México (Tomada por Bheatcoker)

Antecedentes históricos.

Desde la llegada de grupos indígenas al Valle de México se comenzó a cultivar y recolectar diversas plantas nativas de la región como el maíz, el frijol, el chile y el nopal. El nopal no sólo funcionó como una fuente de alimento, sino que también sirvió como precursor de diversas bebidas o como una especie de apósito para el tratamiento y alivio de quemaduras y heridas en piel; por ello los indígenas lo denominaban como “árbol sagrado” (Calva V y Larson J, 2009).

Durante la época de la conquista española, los marinos transportaban en sus navíos, grandes cantidades de nopal para su consumo ya que les aportaba una fuente importante de vitaminas, convirtiéndolo en una excelente herramienta para la prevención del escorbuto. Así mismo, gracias a su buen desarrollo en climas áridos y semiáridos, se establecieron sus propios cultivos los cuales aprovechaban

durante las épocas de sequía como forraje para el ganado (Imagen 1 y 2) (Calva V y Larson J, 2009).

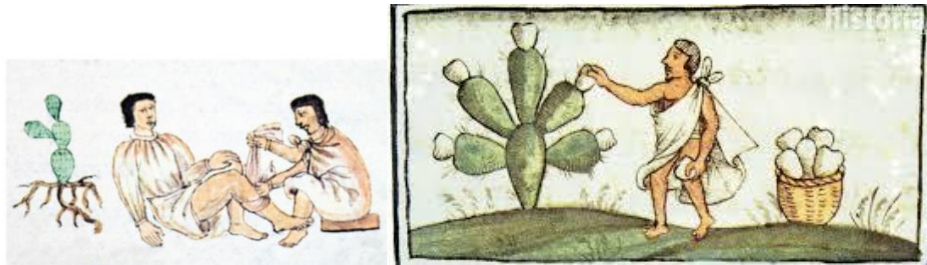


Imagen 1. Bernardino de Sahagún, *historia general de las de cosas de la nueva España (Códice Florentino. XVI)*. **Imagen 2:** Hombre recolectando tunas de un nopal / De las tunas, *Códice Florentino, Libro XI, f. 125v* (Tomado de Calva V y Larson J 2009).

En la actualidad el género *Opuntia* se encuentra distribuido a lo largo de todo el continente americano, desarrollándose en altitudes que comprenden desde el nivel del mar hasta 4,700 m de altitud en zonas montañosas, soportando climas que van de los 5°C hasta los -40°C en países como Canadá y Argentina (Calva V y Larson J 2009; Silva CDS 2015).

Características del nopal.

A comparación de otras cactáceas, el nopal posee diversas adaptaciones en su morfología, facilitándole su desarrollo en diversos ambientes. Como, por ejemplo, los cladodios mejor conocidos como pencas, las cuales son tallos modificados responsables de la fotosíntesis, absorben el dióxido de carbono durante la noche y mejoran su tasa fotosintética. Además, tienen una cutícula y capa serosa engrosada la cual disminuye la tasa de transpiración del agua y a su vez, se almacena en forma de mucílago distribuido entre los espacios intracelulares del cloquerima y el parénquima (Inglese P *et al* 2018).

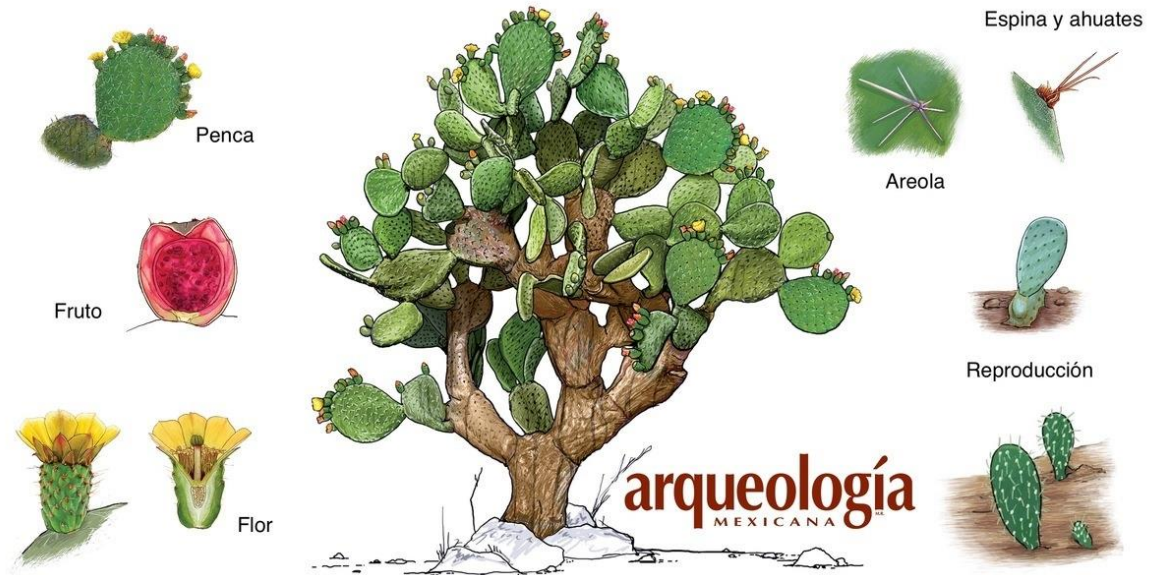


Imagen 3. Estructuras morfológicas del género *Opuntia*. (Tomado de Rafael Ríos/ CONABIO 2021).

Mucílago de nopal.

El mucílago de nopal también es conocido como “*baba de nopal*”, tiene la capacidad de retener hasta un 30% del total del agua contenida en toda la estructura del nopal además de contener una alta diversidad de azúcares, aumentando así su eficiencia y aprovechamiento de los nutrientes, lo que resulta en una disminución de requerimientos energéticos a comparación de otras plantas (Ramírez PPS 2018).

La especie *Opuntia-ficus-indica* es una de las cactáceas con más alto contenido de sustancias mucilaginosas, las cuales pueden obtenerse por diferentes métodos de purificación y de aislamiento que utilizan desde solventes, medios acuosos, ultrafiltraciones o por medio de altas temperaturas, pero cada método de extracción depende de los requerimientos del mucílago a ocupar (Allegra A *et al*/2017: Ramírez PPS 2018).

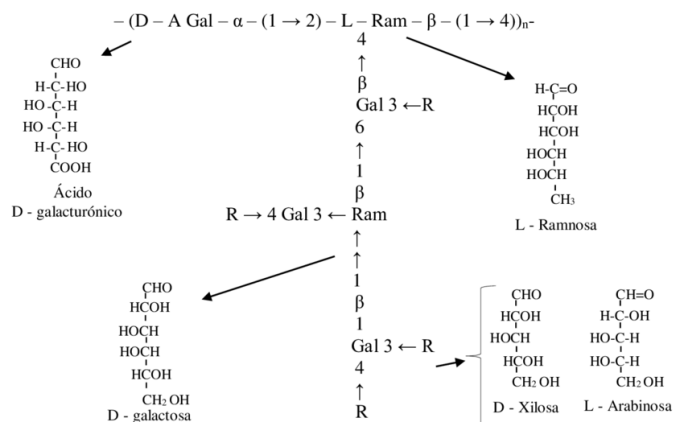


Imagen 4. Cactácea del género *Opuntia-ficus-indica* (tomado de CONABIO 2021).

Estructura fisicoquímica del mucílago.

El mucílago está constituido por heteropolisacáridos de disposición ramificada cuyo peso molecular oscila alrededor de 13×10^6 g/mol y contiene aproximadamente de 35 a 40 % de arabinosa, 20 a 25% de galactosa y xilosa, 7 a 8% de ramnosa y ácido galacturónico (Esquema 1) (Gibson CA y Nobel SP 2014; Du Toit L *et al* 2016).

Particularmente el ácido D-galacturónico se caracteriza por su buena sinergia con el agua ya que, al estar en contacto, le facilita la capacidad de precipitar partículas como grasas y azúcares, de forma similar como lo hacen los hidrocoloides (Duran AJC *et al* 2020; Nereida VUD *et al* 2020).



Esquema 1: Estructura del mucílago por Nidia García Nauto. (Tomado de García NN 2017).

Esta separación se realiza por medio de la formación de redes moleculares que capturan partículas suspendidas en líquidos. La formación de esta red se debe a que el ácido D-galacturónico posee una carga aniónica que atrae las partículas suspendidas, las cuales en su mayoría son catiónicas, dando lugar a la formación de aglomerados, mejor conocidos como coágulos, que a su vez se van uniendo entre sí, formando flóculos, que por su gran tamaño y peso favorece su sedimentación. A esta reacción se le denomina coagulación-floculación (Imagen 5) (Acosta LY 2006).

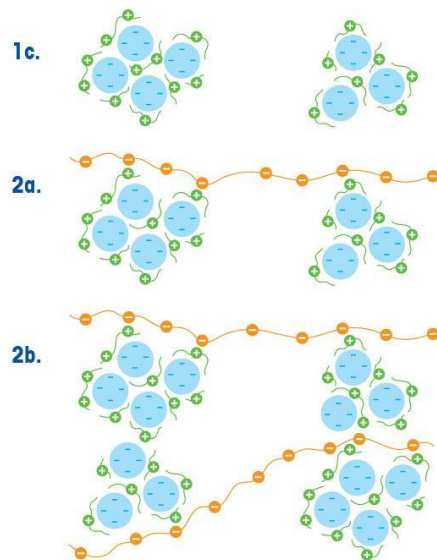


Imagen 5: Reacción floculación-coagulación. (Tomado de © Mettler Toledo 2020)

En la imagen 5 el inciso (1c) se ilustra la unión de un polímero de carga negativa el cual se une covalentemente con partículas positivas dando paso a coágulos. La imagen (2a) muestra la unión de dos coágulos que dan paso a un flóculo y en (2b), se observa la unión de dos flóculos para dar origen a uno de gran peso y tamaño (Bhosale RR *et al* 2014).

Aplicaciones del mucílago de nopal

La actividad de sedimentación del mucílago le confiere la capacidad idónea para la elaboración de geles y suspensiones coloidales, como lo hacen los biopolímeros compuestos por polisacáridos implementados en la industria para el tratamiento de

aguas residuales; como texturizante en cosméticos y mayormente en la industria alimentaria en forma de aditivo, teniendo una gran aceptación debido a su baja toxicidad. El mucílago del nopal es un polisacárido fibroso, altamente ramificado, importante por la capacidad de retener fuertemente grandes cantidades de agua además de que es un buen gelificante, espesante, y emulsificante (Ruiz HF 2009; Boutay F y Mhenni F 2011; Rodríguez HYC 2017).

Se ha encontrado que el ácido galacturónico es posiblemente el principio activo del mucílago de nopal que le proporciona la capacidad de coagulación. La estructura del ácido galacturónico indica que es aniónico, y la existencia de grupos carboxílicos a lo largo de la cadena ramificada implica que puede darse la absorción química entre las partículas cargadas suspendidas en el líquido y estos grupos funcionales (Manunza B *et al* 1997; Miller SM *et al* 2008).

No obstante, en la actualidad el mucílago de nopal es utilizado en menor cantidad a comparación de otros biopolímeros de actividad floculante, como la goma xantana y la carragenina. Estos biopolímeros han jugado un papel importante en la medicina debido a su participación como biopolímeros aniónicos ácidos para la recuperación de Inmunoglobulina Y (IgY) (Hatta H *et al* 1990).

Este compuesto es de gran interés en el ámbito científico, debido a su potencial para la inmunoterapia y la profilaxis en área clínica ya que al ingerirse en la dieta provee al organismo protección ante agentes patógenos.

Goma xantana

Es un heteropolisacárido recuperado de la fermentación bacteriana realizada por *Xanthomonas campestris b-1459* (Foto 2) (FAO and WHO 2021).

Tiene una cadena lineal en β -D-glucosa unida por enlaces 1-4 con una cadena lateral de trisacárido el cual contiene dos D-manosas y un ácido galacturónico, los cuales se encuentran distribuidos de forma ramificada, además de ser altamente soluble en agua fría o caliente el cual le otorga una alta viscosidad, incluso a bajas

concentraciones, dándole una buena estabilidad a las suspensiones y emulsiones. (Esquema 2) (Pereira JF *et al* 2019).

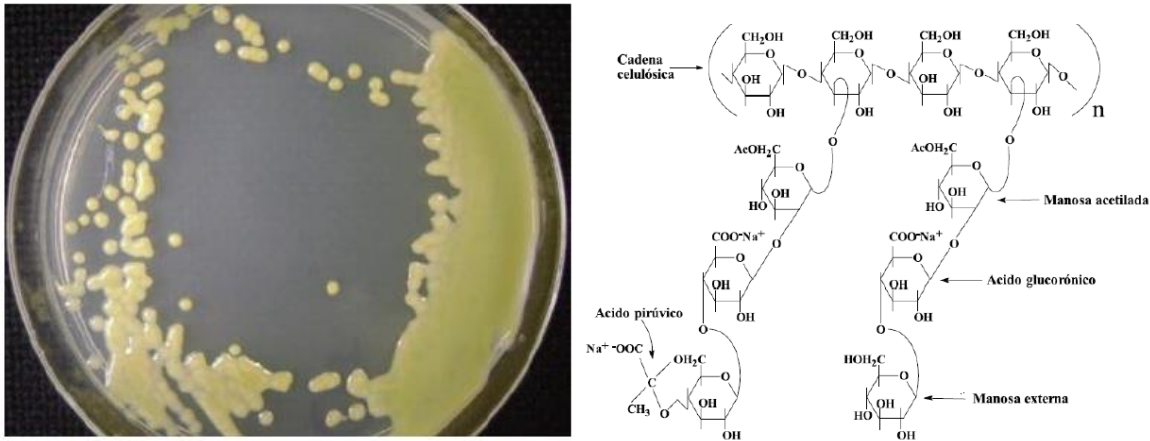


Foto 2: *Xanthomas Campestris* aisladas de lesiones necróticas de filodendro en un cultivo de CPG (Ácido casamino, peptona y glucosa). (Tomada de Moya HSL *et al* 2018) **Esquema 2:** Estructura química de goma xantana. (Tomada de Sánchez ME y Bartolomé MB 1999).

En la actualidad México no alcanza a cubrir la demanda de goma xantana utilizada en la industria, haciendo necesaria su importación, ya que su producción tiene varios puntos críticos como la variabilidad del pH, la transición de temperaturas, preservar una concentración adecuada de oxígeno para tener la mayor liberación de xantana sin lisis celular, además de que la recuperación de la goma xantana generalmente es complicada y costosa (Criollo AA 2019).

Carragenina.

Es un polisacárido extraído de las algas rojas, de la familia *Rhodophyceae*. Posee una estructura lineal compuesta por monómeros sulfatados alternados de D-galactopiranosilo y α -D-glucósido. La localización del grupo sulfatado puede variar, y esto le confiere un comportamiento distinto a cada tipo de carragenina por lo cual se clasifican en diferentes grupos, los cuales van desde el κ -carrageno, hasta ν -carragenanos, siendo κ -, λ -, ι -carragenanos los más utilizados, debido a sus grupos

sulfato e hidroxilo que actúan como agentes gelificantes y aglutinantes (Liu Z *et al* 2019).

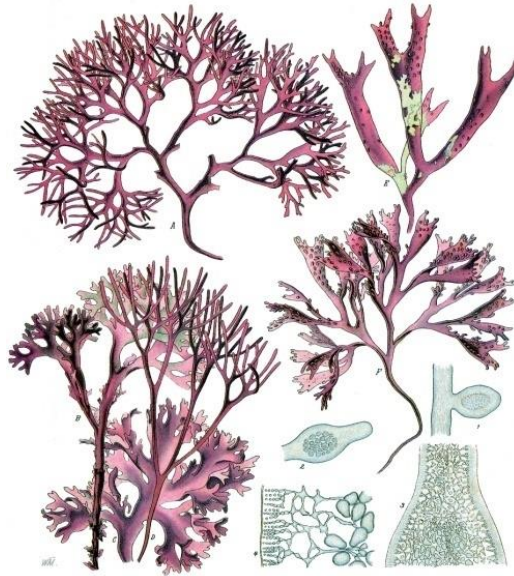


Imagen 6: Algas rojas (Tomada de Wilhem B *et al* 1914).

La carragenina es la goma más utilizada a nivel mundial por diversas industrias, pero conforme aumenta su aplicación, se vuelve más complicado cubrir la demanda debido a que las algas rojas se desarrollan naturalmente en aguas frías las cuales han aumentado su temperatura debido al calentamiento global, disminuyendo áreas para su desarrollo y acrecentándose el riesgo de una sobre explotación en las áreas donde naturalmente se reproducen. En la actualidad se han logrado reproducir algunas algas rojas en aguas más cálidas, pero se ha aumentado el costo de producción y se ha vuelto un proceso poco rentable (Imagen 6) (FAO and WHO 2021).

La goma xantana y la carragenina son hidrocoloides, capaces de modificar la estructura gelificante de diversos compuestos, pero al ser tan demandados por la industria, estos van disminuyendo su disponibilidad obligando a buscar otras alternativas de hidrocoloides naturales. En este sentido, el mucílago de nopal se convierte en un biopolímero aniónico altamente viable para la recuperación de Inmunoglobulina Y (IgY).

México posee aproximadamente 60 000 hectáreas de nopaleras con un rendimiento promedio de 71 toneladas por hectárea y cerca de 1 millón y medio de nopaleras de manera silvestre distribuidas a lo largo del país. El consumo *per cápita* de nopal es de 6.4 kg siendo el 78% de la producción de nopal y el 3% para la obtención del xoconostle. Cerca del 1.96% del nopal se desperdicia por medio de la práctica de poda, traduciéndolo en 83,784.56 toneladas de desperdicio anual (SEMARNAT 2020).

En diversos países se han abierto líneas de investigación en busca de hidrocoloides con actividad coagulante provenientes de cactáceas. Un ejemplo, es la *cochiflor*, polímero obtenido de las pencas de *Opuntia-Cochinellifera*, nativa de Nicaragua. En el caso de México, se han realizado varias investigaciones con la extracción y aplicaciones sobre el mucílago de *Opuntia-ficus-indica*. La extracción del mucílago es uno de los puntos más importantes y críticos para su estudio, ya que de esta dependerá el rendimiento final y la pureza de este. Diversos estudios sobre la extracción de mucílago de nopal resaltan los tiempos largos de extracción, uso de calor y de disolventes orgánicos (Bonilla RB 2011).

En la actualidad, el grupo de Ingeniería de Proceso, en el Departamento de Instrumentación Científica e Industrial del Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), desarrolló un proceso de extracción mecánica de mucílago a partir de nopal de desecho agroindustrial y sin uso de solventes.

En cuanto a las aplicaciones, destacan los trabajos donde evalúan la efectividad de mucílago como coagulante en el tratamiento de aguas residuales, para la clarificación de agua, para remover turbiedad y color o para la elaboración de subproductos que interactúen en suspensiones coloidales como agente dispersante, además de analizar el contenido de los azúcares que componen a este heteropolisacárido (Quezada NA 2004; Vaca MM *et al* 2014).

Inmunoglobulina Y (IgY) y sus aplicaciones.

La inmunoglobulina Y (IgY) es el principal anticuerpo del suero sanguíneo de las aves, formada por la respuesta inmune como respuesta adaptativa a la invasión de bacterias, hongos y virus, la cual se transfiere de la madre al embrión por medio de la circulación materna (Murcia GHW 2009; Taylor AI 2014).

Este anticuerpo es capaz de atravesar el epitelio folicular, depositándose en el saco vitelino o mejor conocido como yema, gracias a que en su membrana se encuentra un receptor específico para la IgY (Mohammed SM *et al* 1998; Morrison SL *et al* 2002).

La IgY se encuentra en mayor cantidad en el suero, como en el caso de la inmunoglobulina G (IgG) de los mamíferos, sin embargo, tiene estructuralmente mayor parentesco con la inmunoglobulina E (IgE) debido a que existe una distancia filogenética de más de 166 millones de años entre ellas (Imagen 7) (Taylor AI 2008).

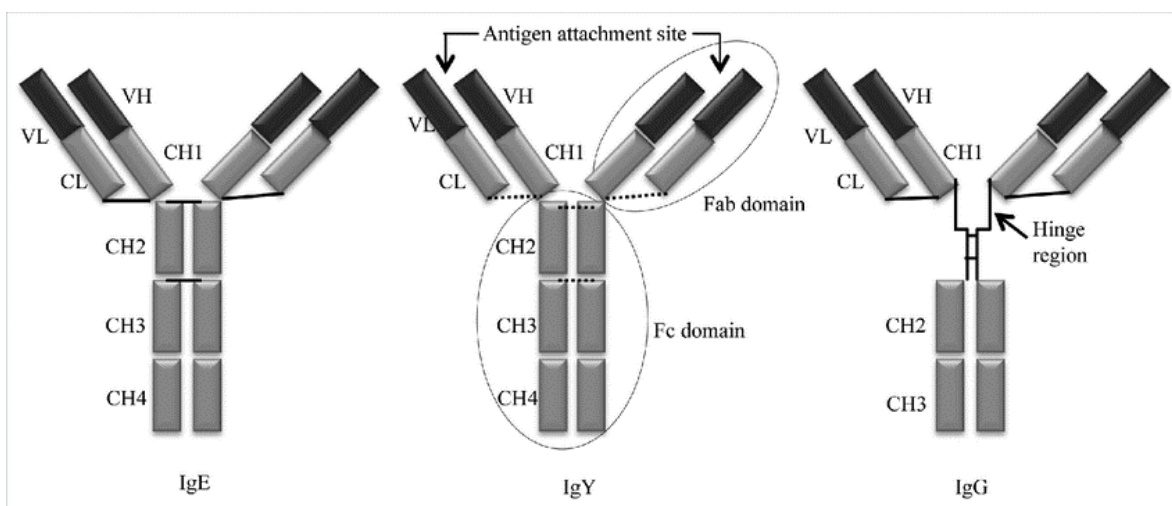


Imagen 7: Estructura molecular de las inmunoglobulinas: se observa que las Inmunoglobulinas E (IgE), Y (IgY) y G (IgG) están compuestas de dos cadenas pesadas y dos ligeras; la cadena ligera tiene un dominio variable (VL) y solo un dominio constante (CL) a diferencia de la cadena pesada que tiene un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2, CH3) para el caso de la IgG, mientras que la IgE y la IgY poseen 4 dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y

CH4) confiriéndoles un mayor peso molecular, 65 kDa y 67kDa respectivamente a comparación de la cadena pesada de la inmunoglobulina G (IgG) que es de 70kDa con sus respectivos polisacáridos. (Tomada de Rahman S et al 2013).

La fracción cristalizable (Fc) en la IgY tiene dos cadenas laterales de carbohidratos compuesta de sacarosa, maltosa y glicina a diferencia de IgG que sólo posee una cadena, protegiéndolo de la desnaturalización por calor además de aumentar la afinidad de unión a antígenos, mejorando la interacción con receptores de superficie celular específicos de los antígenos y con las proteínas del sistema de complemento, haciendo la regulación de la respuesta inmune, la ingesta de complejos inmunes y modulación del transporte de IgY de manera más eficiente aunado a la presencia de residuos de prolina y glicina específicamente que mejoran la resistencia a la degradación por enzimas proteolíticas como la tripsina y quimio tripsina (Long S et al 2017; Xin Z. et al 2020).

Las dos regiones globulares Fab en la IgY forman una depresión la cual esta revestida por péptidos de las CDR los cuales son iguales en ambas regiones permitiendo la formación de enlaces cruzados con dos antígenos simultáneamente lo que aumenta la superficie de contacto con los antígenos (Hernández CLM et al 2015). Bioquímicamente, la IgY es una lipoproteína distribuida junto con otras lipoproteínas en la fase sólida de la yema, denominadas livetinas (Murcia GHW 2009).

Las livetinas son una de las fracciones proteicas contenidas en la yema del huevo, las cuales se clasifican en: alfa-livetina beta-livetina y gamma-livetina, siendo estas últimas, las más abundantes. Dentro de las gama-livetinas se encuentran las IgY. (Stadeklman WJ et al 1977; Polson A et al 1980).

Gracias a la distancia filogenética de la IgY aviar con respecto a las IgG e IgE de mamíferos, no se desencadena la activación del complemento unión a la proteína G y al factor reumatoide al momento de administrar este tipo de anticuerpos a un paciente para conferirle inmunidad pasiva. Además, se tienen ventajas éticas y económicas, ya que, al extraer anticuerpos por medio del huevo de gallina, se

elimina la necesidad de sangrar a las aves y se reducen los costos del manejo y se beneficia en el bienestar animal. (Thomsen K *et al* 2016).

En la actualidad se ha utilizado la IgY para el tratamiento de periodontitis, gingivitis y caries dental, aplicándolas en forma de gel dental, obteniendo una reducción de la placa dental, cálculos y halitosis; para el tratamiento de úlceras gástricas por *Helicobacter pylori* aplicándolas en forma de polvos orales contra cepas virulentas y antibiótico, mejorando en un 90% los síntomas gástricos; para el tratamiento en infecciones entéricas virales como *Norovirus* y *Rotavirus* en recién nacidos administrando IgY en calostro bovino reduciendo los episodios diarreicos; para tratar intoxicaciones provenientes de la ingesta de toxinas bacterianas de *E.coli*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* la cuales hasta la actualidad continúan en estudio (Hernández CLM *et al* 2015; Thomsen K *et al* 2016).

JUSTIFICACIÓN

Se han desarrollado diferentes metodologías para separar la fracción sólida de la yema de huevo y obtener el mejor título de IgY. En el presente trabajo se busca evaluar la eficiencia aglutinante del mucílago de nopal, obtenido de la extracción mecánica, libre de solventes, por el Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) - UNAM, en comparación con la goma xantana y carragenina, biopolímeros ampliamente utilizados en la separación de la IgY.

HIPÓTESIS

Con el mucílago de nopal se obtienen mayores concentraciones de inmunoglobulina Y (IgY) de huevo de gallina en comparación con las gomas xantana y carragenina.

OBJETIVOS

General

Evaluar la eficiencia del mucílago de nopal para separar la inmunoglobulina Y (IgY) de huevo de gallina en función de su recuperación, concentración y título.

Particulares

- Determinar el uso del mucílago de nopal para la separación de la fracción sólida de la yema de huevo de gallina.
- Comparar la eficiencia de separación de la fracción sólida de la yema de huevo de gallina utilizando mucílago de nopal, goma xantana y carragenina.
- Establecer la concentración de mucílago de nopal más adecuada para separar mejor la fracción sólida de la yema de huevo de gallina.
- Determinar el título de IgY recuperada con mucilago de nopal, goma xantana y carragenina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Huevo: Se utilizaron 120 piezas de huevo fresco de gallina de una marca comercial, con clave 180 C4, con este dato y utilizando una aplicación desarrollada por la marca comercial, se pudo determinar que provenían de la misma parvada de gallinas con la misma edad, mismo calendario de vacunación y con ovoposición del mismo día. Dicha parvada, por protocolos de bioseguridad, recibió rutinariamente vacuna contra la Enfermedad de Newcastle.

Biopolímeros: Se utilizaron 3 tipos diferentes de biopolímeros grado alimenticio: carragenina, goma xantana y mucílago de nopal a 5 diferentes concentraciones: 6mg, 30mg, 60mg, 90mg y 600mg por cada 40 mL de agua destilada, la cual se utilizó para disolver cada biopolímero, de acuerdo con la metodología propuesta por Hatta *et al* (1990).

Preparación de muestras

En el Diagrama 1 se presenta la estrategia experimental en dos fases que se propuso para la obtención de inmunoglobulina Y (IgY).

Fase 1. Al separar en su totalidad la albúmina de la yema, se hizo uso de unas tijeras para retirar con extremo cuidado, las chalazas que se encuentran unidas a las yemas. Con una navaja de bisturí (# 23) estéril, se realizó un pequeño corte sobre la membrana vitelina de cada una de las yemas, con el objetivo de permitir la salida del líquido vitelino, el cual se traspasó a una gasa, permitiendo la adherencia de las membranas vitelinas y depositando el líquido vitelino en un matraz Erlenmeyer que contenía agua destilada estéril vol:vol. Las mezclas se agitaron durante 1 minuto a temperatura ambiente en una agitadora (G24 *Environmetal-Incubator-Shakerm*).

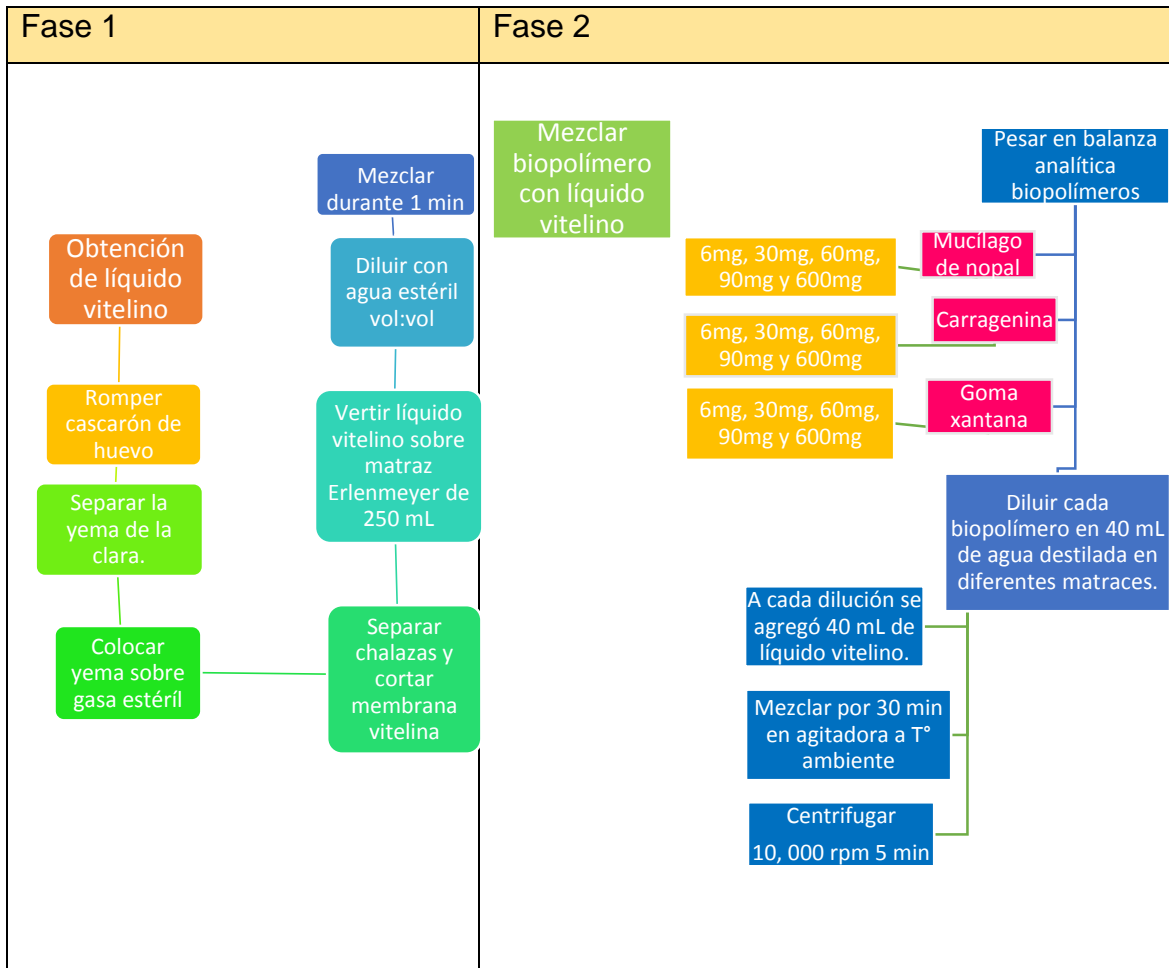


Diagrama 1. Estrategia experimental para la obtención de IgY, la cual se dividió en dos fases. Fase 1.(Esquema 1) Obtención de líquido vitelino. Fase 2 (Esquema 2) Mezcla de biopolímeros con líquido vitelino.

La fase 2 consiste en dividir la mezcla de yema-agua destilada estéril en quince matraces Erlenmeyer (correspondiente a igual número de muestras experimentales de biopolímero/concentración [3*5]). Se diluyeron vol:vol por separado, se agitaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10,000 gravedades (g) durante 5 minutos. Finalmente, se recuperó el sobrenadante de cada mezcla de yema-agua destilada-biopolímero. Por cada una de las diluciones biopolímero/concentración [3*5] se obtuvieron 4 muestras las cuales se clasificaron en los grupos (A, B, C y D).

La IgY se obtuvo en el sobrenadante de cada muestra, y en el pellet, el complejo biopolímero-grasa-sólidos el cual se desechó. Posteriormente se procedió a la purificación de la IgY.

Purificación de IgY.

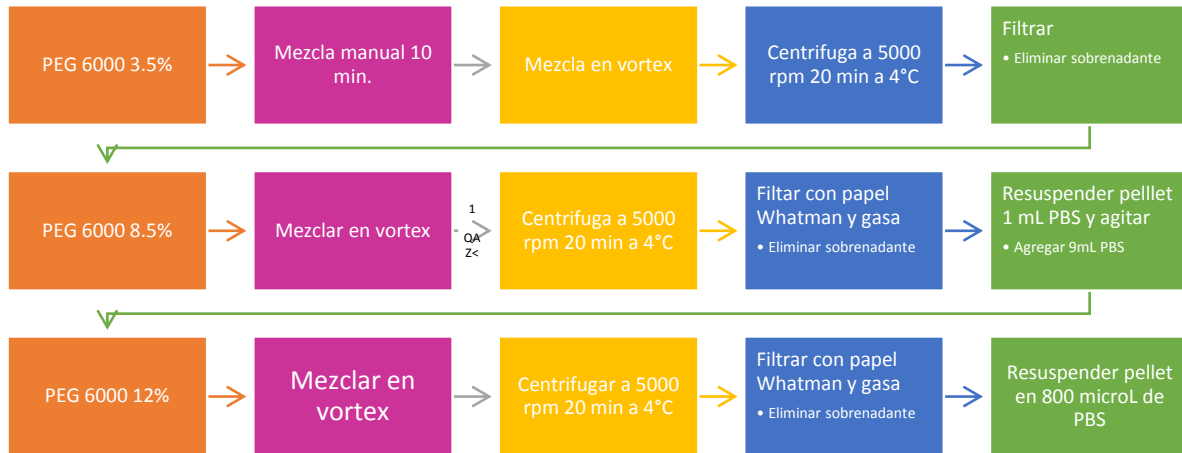


Diagrama 2. Metodología para la purificación de IgY.

De acuerdo con el diagrama 2, donde se plantea la metodología de purificación de la IgY, se partió del volumen total del sobrenadante de cada biopolímero y cada concentración. Se agregó Polietilenglicol (PEG) 6000, grado molecular, en tres diferentes concentraciones (3.5, 8.5 y 12%), de acuerdo con la metodología propuesta por el INER.

Medición proteica de A₂₈₀ por medio de Espectrofotometría micro-UV/VIS NanoDrop

Para realizar esta medición, se utilizó un Thermo NanoDrop modelo 1000. Antes de tomar la medición, se mezcló con vortex, cada una de las muestras y se realizó la limpieza de los pedestales para evitar la presencia de sólidos extraños a las muestras.

La limpieza de los pedestales, superior e inferior, se realizó con un papel filtro y agua destilada. Por medio de la aplicación ND-1000 V3.5.2, se seleccionó la opción de medición de proteínas de A_{280} con índice de absorción (A_{260}/A_{280}).

Se tomaron 1-2 μL de solución con una micropipeta y se colocó sobre el pedestal inferior; se bajó el brazo y se registró cada muestra con su respectiva clave. Posteriormente se da paso a la lectura de la muestra. Por cada una de las muestras se realizaron tres lecturas, las cuales se registraron en formato Excel®.

Titulación indirecta de IgY por el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación (método beta) contra la enfermedad de Newcastle

Con la técnica de inhibición de la Hemoaglutinación (IH) contra la enfermedad de Newcastle, se determina de forma indirecta, el título de IgY recuperado con los tres biopolímeros en prueba. En una microplaca de 96 pocillos con fondo en "V" se colocaron 50 μl de PBS en cada pocillo. Posteriormente se agregaron 50 μl en el primer pocillo de cada fila cada una de las diferentes muestras. Entendiéndose que el término "muestra" se refiere a IgY obtenida con diferentes biopolímeros a diferentes concentraciones. Se prosiguió con las diluciones dobles seriadas que fueron desde 1:2 hasta 1:2048 de izquierda a derecha a lo largo de la placa. En cada pocillo se agregaron 8 unidades Hemoaglutinantes (UHA) de virus/antígeno de Newcastle, contenidos en 50 μl . Se cubrió la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, a cada pocillo se le añadieron 50 μl de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) y se mezclaron suavemente. La placa se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se hizo la valoración de los pocillos inclinando la placa.

El título de inhibición de la hemoaglutinación (IH) corresponde a la mayor dilución con una inhibición completa. Una muestra que presenta inhibición es aquella que al inclinarse forma una estría o corriente que va a la misma velocidad que los pocillos control (controles de suero positivo, virus/antígeno y PBS).

Los títulos de IH se consideraron positivos, si existía una inhibición a una dilución 1:8 (2^3 o $\log_2 3$ cuando se expresaba como el recíproco) o superior. (Srinivas CA 2019)

Análisis estadístico.

Los biopolímeros se compararon a diferentes concentraciones mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) para un diseño factorial 3×5 , donde el primer factor fue cada uno de los biopolímeros a utilizar: Carragenina (carragenina), Goma Xantana (goma_x) y Mucílago de nopal (mucílago); mientras que el segundo factor fueron las concentraciones de cada biopolímero (6, 30, 60, 90, 600 mg). Se contó con 4 réplicas por concentración.

Los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de varianzas fueron comprobados mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Se ocupó la prueba de Tukey para realizar la comparación múltiple de las medias. Se fijó un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ en todas las pruebas estadísticas utilizadas.

El procesamiento y análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico R® (R Core Team [2017]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

El análisis de varianza es un método paramétrico de estimación, basado en la distribución de la probabilidad de las variables aleatorias. Esta metodología supone que los datos se distribuyen de forma Normal (con media μ y varianza σ^2), donde los grupos que poseen varianzas semejantes (homocedasticidad) y las observaciones son independientes entre sí (independencia).

El ANOVA (por sus siglas en inglés, analysis of variance) permite comparar muestras aleatorias provenientes de diferentes poblaciones, así como cuantificar el nivel de incertidumbre (la varianza) y asignarle un valor numérico; con ello podemos hacer estimaciones precisas de los parámetros poblacionales Media (μ) y Varianza (σ^2) en cada grupo, esto facilita la interpretación de los resultados y su replicabilidad.

El diseño factorial es un arreglo de datos mediante el cual se busca conocer el efecto de dos o más variables explicativas o factores (numéricas o categóricas) sobre una variable respuesta (numérica). Cada variable explicativa o factor puede contar con diferentes niveles o categorías internas por lo que el objetivo de este diseño es determinar cuál o cuáles combinaciones de niveles es la mejor. Una consecuencia de estudiar el efecto de dos o más variables explicativas al mismo tiempo es el efecto que estas tengan en conjunto sobre una variable respuesta, a esto se le denomina interacción.

La base de datos tiene una disposición para el análisis estadístico como diseño completamente al azar y como un diseño factorial (Tabla 1).

Tabla 1. Variables de estudio

Variable	Abreviación	Unidad de medición	Límites aceptables
Lote o corrida	Lote	Factor	1,2,3,4
Tratamiento	Tx	Factor	Combinación de biopolímero.
Biopolímero	Biop	Factor	Carragenina, Goma X, Mucílago de nopal
Concentración	Conc.	Factor	6,30,60,90,600
Logaritmo de la inhibición de la hemoaglutinación.	Log_IH	Númerica	>0
Concentración de Nanodrop	Conc_Nano	Númerica	<0

RESULTADOS

Preparación de los biopolímeros

Al preparar los biopolímeros con el agua destilada estéril, se observó que el mucílago se disolvió adecuadamente a las diferentes concentraciones utilizadas, (Fotos 3-6) debido a su alta capacidad higroscópica.

Por su parte, la carragenina a una concentración de 600 mg (Fotos 7 y 8), formó una solución gelatinosa mientras que la goma xantana desde 30 mg de biopolímero comenzó a gelificarse, y a medida que aumentó su concentración presentó mayor dificultad para disolverse (Foto 9).



Foto 3-6. Disoluciones de mucílago de nopal con agua destilada estéril a las concentraciones 30 mg, 60 mg, 90mg y 600mg (Tomada por Mariana VM)

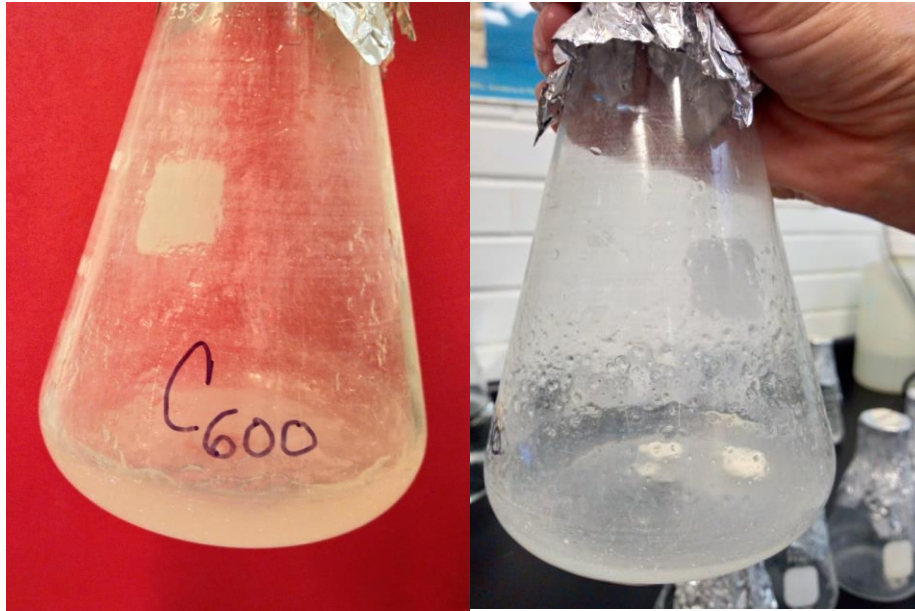


Foto 7 y 8. Comportamiento de la carragenina disuelta en agua destilada estéril a una concentración 600mg (Tomada por Mariana VM)

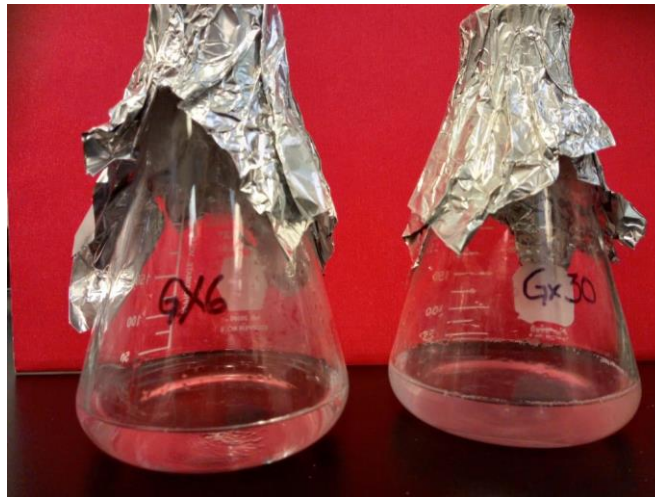


Foto 9. Comportamiento gelificante de goma xantana a una concentración 30mg a comparación de una concentración de 6mg (Tomada por Mariana VM)

La goma xantana a los 600 mg de polímero formó una solución completamente grumosa y no pudo disolverse (Fotos 10).

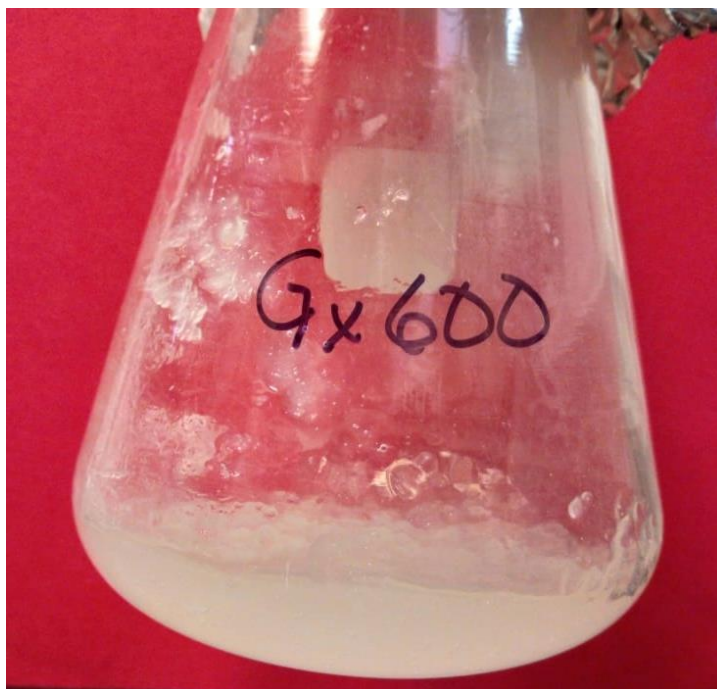


Foto 10. Comportamiento de la goma xantana con agua destilada estéril a una concentración 600mg (Tomada por Mariana VM)

La dilución de los polímeros en relación con el aumento en su concentración se vio más afectada en carragenina y goma xantana ya que a medida que aumentaba la concentración, aumentaba la gelificación de la dilución al compararlas con mucílago de nopal.

Inhibición de la hemoaglutinación

La tabla 2 muestra la estadística descriptiva de los resultados para el logaritmo base 2 del título de IgY obtenido de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación.

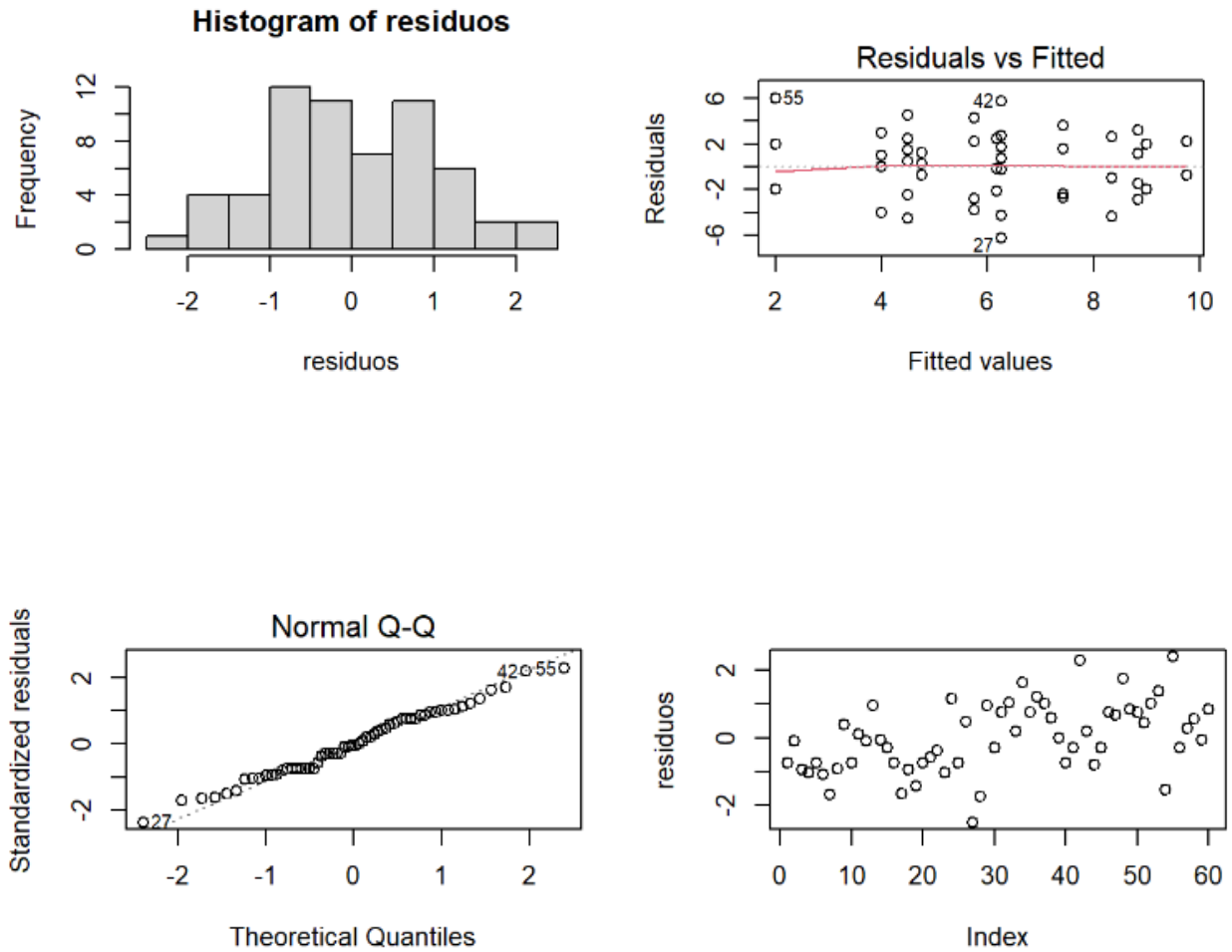
Gráficos de residuos de la comprobación de supuestos

Los gráficos 1- 4 muestran que los residuos obtenidos indican buenas distribuciones de los datos experimentales de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Tabla 2. Logaritmo base 2 del título de IgY obtenidos de la Prueba de IH

Biopolímero	Concentración mg	Unidad de muestra	Media	D.E.	Mínimo	Mediana	Máximo
Carragenina	6	4	9.00	2.31	7.00	9.00	11.00
Goma_x	6	4	8.83	2.69	6.00	8.66	12.00
Mucílago	6	4	4.75	0.96	4.00	4.50	6.00
Carragenina	30	4	6.25	3.10	2.00	7.00	9.00
Goma_x	30	4	8.33	3.37	4.00	9.16	11.00
Mucílago	30	4	6.25	4.92	0.00	6.50	12.00
Carragenina	60	4	4.50	3.32	2.00	3.50	9.00
Goma_x	60	4	7.42	3.09	4.67	7.00	11.00
Mucílago	60	4	4.50	3.11	0.00	5.50	7.00
Carragenina	90	4	5.75	3.86	2.00	5.50	10.00
Goma_x	90	4	4.00	2.94	0.00	4.50	7.00
Mucílago	90	4	6.17	1.92	4.00	6.00	8.67
Carragenina	600	4	2.00	2.31	0.00	2.00	4.00

Goma_x	600	4	2.00	4.00	0.00	0.00	8.00
Mucílago	600	4	9.75	1.50	9.00	9.00	12.00



Gráficos 1-4: Gráficas que muestran los datos experimentales que cumplen con los supuestos de: distribución normal de los residuos ($P = 0.785$) y el de uniformidad de varianzas ($P = 0.739$).

Por lo tanto, se asume que por la forma en que se realizaron las mediciones existe independencia de las observaciones.

Análisis de Varianza.

Los resultados de la tabla 3 nos indican una interacción entre los biopolímeros y las concentraciones ($P=0.005$, $CME= 9.315$). Dado que existe interacción, los efectos principales para el biopolímero y la concentración se encuentran confundidos y no son interpretables por separado, por lo tanto, el análisis se enfocará a la interacción (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de análisis de varianza, logaritmo base 2 del título de IgY obtenidos de la Prueba de IH.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P-value
Biop	2	6.81	3.41	0.37	0.6958
Conc	4	71.83	17.96	1.93	0.12222
Biop:conc	8	244.54	30.57	3.28	0.0049
Residuals	45	419.18	9.32	NA	NA

Las medias de mínimos cuadrados, el error estándar de la media (EEM), así como los límites inferior y superior de los intervalos de confianza al 95% para las medias de los grupos estimados por la teoría asintótica (IC_Inf e IC_Sup) y por remuestreo - Bootstrap (IC_Inf_Boot e IC_Sup_Boot) se muestran en las tablas 4 y 5 (Datos informativos).

Tabla 4. Datos informativos del análisis de varianza por biopolímero, logaritmo base 2 del título de IgY obtenidos en la prueba de IH*.

Biopolímero	Media	EEM	IC_In f	IC_Sup	IC_Inf Boot	IC_Inf_ Boot	Grupos
Carragenina	5.50	0.682	3.81	7.19	3.95	7.05	A
Goma_x	6.12	0.682	4.42	7.81	4.33	7.78	A
Mucílago	6.28	0.682	4.59	7.98	4.93	7.62	A

Tabla 5. Datos informativos del análisis de varianza por concentración, logaritmo base 2 del título de IgY obtenidos con la Prueba de IH*.

Concentración	Media	EEM	IC_Inf	IC_Sup	IC_Inf Boot	IC_Inf_Boot	Diferencia estadística
6	7.53	0.881	5.16	9.89	6.03	9.11	A
30	6.94	6.94	4.58	9.31	4.86	8.83	A
60	5.47	5.47	3.11	7.84	3.69	7.25	A
90	5.31	5.31	2.94	7.67	3.72	6.81	A
600	4.58	4.58	2.22	6.95	2.17	7.17	A

Interacción biopolímero vs concentración

Al existir interacción, nuestro interés se centra en determinar su forma.

En la tabla 6 se observa que en las concentraciones 6, 30, 60 y 90, los biopolímeros tienen un comportamiento semejante al no existir diferencias entre sus medias. Sin

embargo, se puede observar que el logaritmo base 2 del título de IgY para el mucílago a una concentración de 600 fue superior (9.75) al de la carragenina y goma xantana a la misma concentración (2.0 y 2.0 respectivamente).

Tabla 6. Interacción biopolímero vs concentración

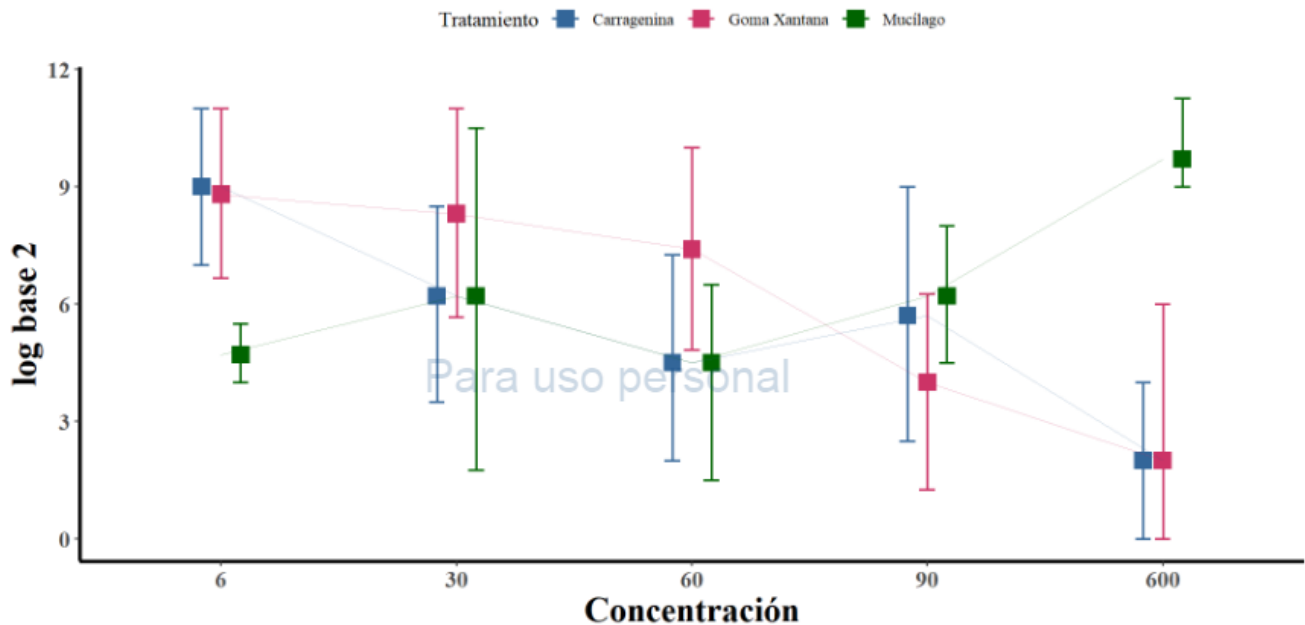
Biopolímero	Conc.	Media	EEM	IC_Inf	IC_Sup	IC_Inf_Boot	IC_Sup_Boot	Dif Est
carragenina	6	9.00	1.526	4.28	13.72	7.00	11.00	Ab
goma_x	6	8.83	1.526	4.11	13.55	6.66	11.00	Ab
mucílago	6	4.75	1.526	0.03	9.47	4.00	5.50	Ab
carragenina	30	6.25	1.526	1.53	10.97	3.50	8.50	Ab
goma_x	30	8.33	1.526	3.61	13.05	5.66	11.00	Ab
mucílago	30	6.25	1.526	1.53	10.97	1.75	10.50	Ab
carragenina	60	4.50	1.526	-0.22	9.22	2.00	7.25	Ab
goma_x	60	7.42	1.526	2.70	12.14	4.84	10.00	Ab
mucílago	60	4.50	1.526	-0.22	9.22	1.50	6.50	Ab
carragenina	90	5.75	1.526	1.03	10.47	2.50	9.00	Ab
goma_x	90	4.00	1.526	-0.72	8.72	1.25	6.35	Ab
mucílago	90	6.17	1.526	1.45	10.89	4.50	8.00	Ab
carragenina	600	2.00	1.526	-2.72	6.72	0.00	4.00	A
goma_x	600	2.00	1.526	-2.72	6.72	0.00	6.00	A

mucílago	600	9.75	1.526	5.03	14.47	9.00	11.25	B
----------	-----	------	-------	------	-------	------	-------	---

*Literales diferentes indican diferencia estadística significativa.

Los bootstrap (Gráfica 5) nos muestran que para la concentración 6, el mucílago fue inferior en cuanto al logaritmo base 2 del título de IgY con respecto a la carragenina y la goma xantana. Las cajas indican las medias de mínimos cuadrados, mientras que las barras de error indican los intervalos de 95% de confianza para las medias de los bootstrap.

Prueba de inhibición de la Hemoaglutinación



Gráfica 5. Prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Las cajas indican las medias de mínimos cuadrados. Las barras de error indican los intervalos de 95% de confianza bootstrap para las medias.

Resultados de Nanodrop

Al momento de separar los sólidos de la yema, se observó que el mucílago de nopal tuvo un mejor comportamiento floculante al compararlo con carragenina y goma xantana (Fotos 11, 12 y 12a).

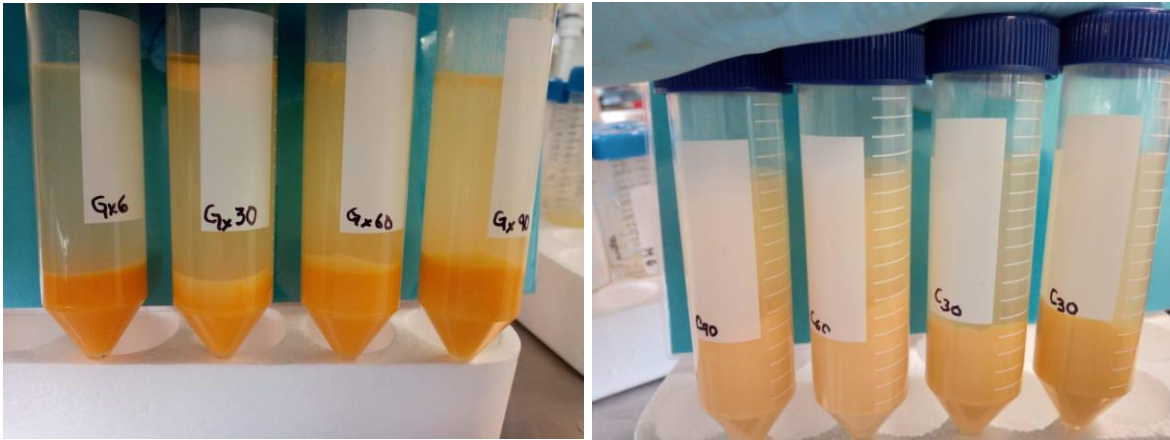


Foto 11 y 12. a) Separación de la fase sólida y de la fase líquida de la yema, utilizando goma xantana a las concentraciones 6 mg, 30 mg, 60 mg y 90mg. b) Separación de fase sólida de la fase líquida de la yema, utilizando carragenina a las concentraciones 6 mg, 30 mg, 60 mg y 90mg (Tomada por Mariana VM).

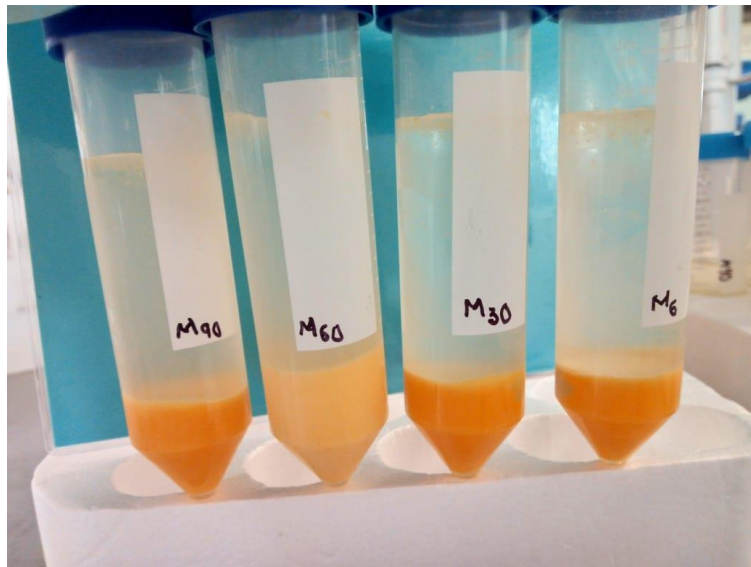


Foto 12a. Separación de la fase sólida de la fase líquida de la yema utilizando Mucílago de nopal a las concentraciones 6 mg, 30 mg, 60 mg y 90mg. (Tomada por Mariana VM).

Al compararse el comportamiento de la separación de la fase sólida de la líquida dependiendo la concentración, se observa una notable diferencia a una concentración de 600mg en los tres polímeros (Fotos 13 y 14).

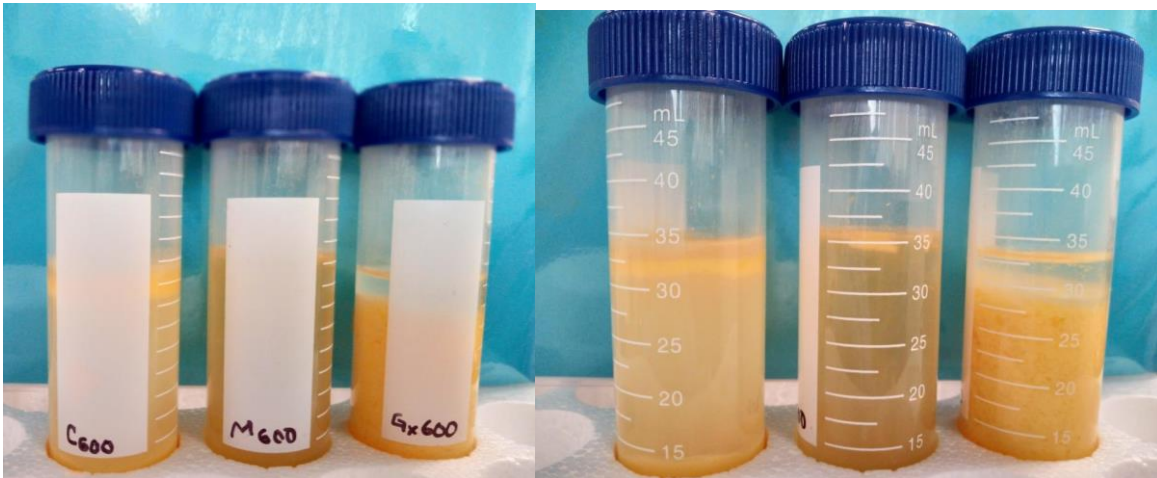


Foto 13 y 14 Separación de la fase sólida de la fase líquida de la yema, utilizando Carragenina, Mucílago de nopal y goma xantana a la concentración de 600 mg. (Tomada por Mariana VM).

La capacidad floculante de los biopolímeros se ve reflejada en los resultados obtenidos por la medición proteica de A_{280} por medio de espectrofotometría micro-UV/VIS NanoDrop, el cual muestra un aumento de proteína obtenida a una concentración de 600 mg de mucílago de nopal en comparación con la goma xantana y carragenina. Estos resultados se ven reforzados con los obtenidos por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, donde se aprecia de igual manera una disminución de la concentración de Inmunoglobulina Y (IgY) a medida que aumentaba la concentración de goma xantana y carragenina. En cambio, al incrementar la concentración del mucílago de nopal, aumentó la cantidad de proteína obtenida.

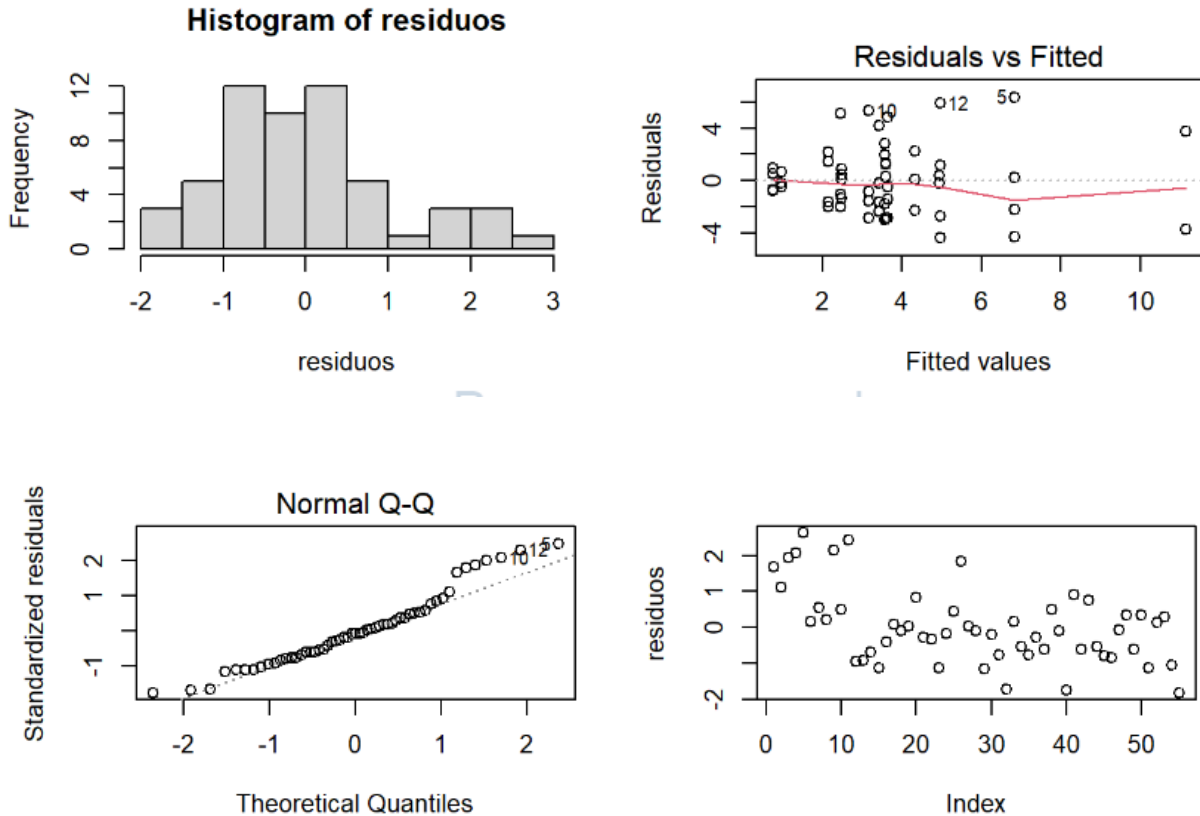
La tabla 7 muestra las estadísticas descriptivas para la concentración de proteína(mg/ml) determinados mediante la técnica de Nanodrop.

Tabla 7. Concentración de proteína (mg/ml) determinados mediante la técnica de Nanodrop.

Biopolímero	Concentración	Tamaño de muestra	Media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Carragenina	6	4	7.28	6.22	2.00	5.47	16.20
goma_x	6	4	6.84	4.62	2.51	5.83	13.19
Mucílago	6	4	3.16	3.65	0.26	1.96	8.48
Carragenina	30	4	3.43	2.95	1.05	2.50	7.65
goma_x	30	3	4.93	0.35	4.70	4.76	5.33
Mucílago	30	4	3.60	1.99	0.70	4.39	4.91
Carragenina	60	4	3.58	2.84	0.58	3.65	6.43
goma_x	60	4	2.49	0.97	1.12	2.72	3.38
Mucílago	60	4	5.97	10.04	0.50	1.19	21.01
Carragenina	90	4	3.65	3.36	0.76	2.68	8.47
goma_x	90	4	2.14	2.10	0.16	2.06	4.29
Mucílago	90	4	4.96	4.58	0.57	4.20	10.87
Carragenina	600	4	2.46	3.46	0.42	0.90	7.61
goma_x	600	4	0.75	0.86	0.00	0.66	1.67
Mucílago	600	4	13.84	13.43	0.98	11.13	32.10

Gráficos de residuos de la comprobación de supuestos

En los gráficos 6-9, se muestran los residuos de la comprobación de supuestos para la concentración de proteína (mg/mL) determinados mediante la técnica de Nanodrop.



Gráficos 6-9. Residuos de la comprobación de supuestos para la concentración de proteína (mg/mL) determinados mediante la técnica de Nanodrop.

Los gráficos de residuos indican buenas distribuciones de los datos, aunque estos no cumplen con el supuesto de distribución normal de los residuos ($P=0.018$) el modelo es robusto para este supuesto y podemos asumir que por ser el tipo de variable de razón cumple con el supuesto, el histograma y el Q-Q plot muestran la tendencia de los datos a la Normal. El supuesto de homogeneidad de varianzas cumple ($P=0.15$). Se asume que por la forma en que se realizaron las mediciones existe independencia de las observaciones.

Análisis de varianza

Los resultados del análisis de varianza se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Análisis de varianza la concentración de IgY(mg/mL)

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P-value
Biop	2	8.42	4.21	0.47	0.6268
Conc	4	29.18	7.29	0.82	0.5211
Biop:conc	8	205.03	25.63	2.88	0.0126
Residuals	40	356.51	8.91	NA	NA

Los resultados nos indican una interacción entre los biopolímeros y las concentraciones ($P=0.13$, $CME=8.913$). Dado que existe interacción, los efectos principales para el biopolímero y concentración se encuentran confundidos y no son interpretables por separado, por lo tanto, el análisis se enfocó a la interacción.

Las medias de mínimos cuadrados, el error estándar de la media (EEM), así como los límites inferior y superior de los intervalos de confianza al 95% para las medias de los grupos estimados por la teoría asintótica (IC_Inf e IC_Sup) y por remuestreo

Tabla 9. Datos informativos por biopolímero por concentración de proteína (mg/ml).

Biopolímero	Media	EEM	IC_Inf	IC_Sup	IC_Inf Boot	IC_Inf_Boot	Diferencia estadística
carragenina	3.48	0.689	1.77	5.20	2.31	4.68	A
goma_x	3.43	0.689	1.71	5.15	2.14	4.82	A
Mucilago	4.76	0.751	2.89	6.64	2.46	6.29	A

Tabla 10. Datos informativos por concentración y cantidad de IgY (mg/ml).

Concentración	Media	EEM	IC_Inf	IC_Sup	IC_Inf Boot	IC_Inf_Boot	Diferencia estadística
6	4.77	0.908	2.32	7.22	2.84	7.17	A
30	3.99	0.908	1.54	6.44	2.75	4.94	A
60	2.34	0.908	-0.11	4.79	1.45	3.65	A
90	3.59	0.862	1.26	5.91	1.89	5.55	A
600	4.78	0.995	2.10	7.46	0.95	6.74	A

Interacción Biopolímero vs concentración

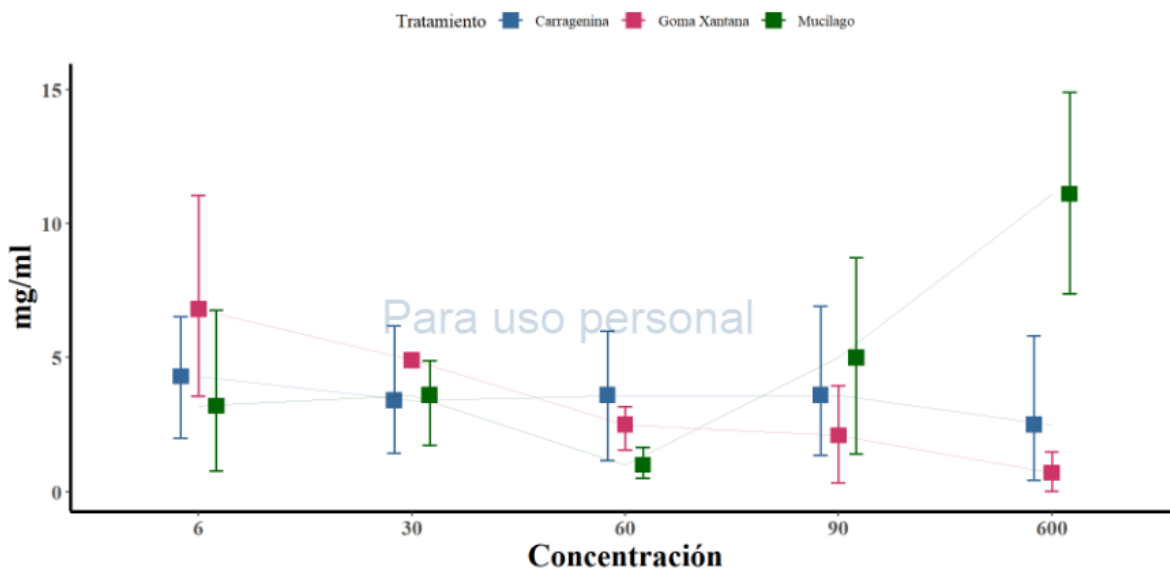
Tabla 11. Interacción biopolímero vs concentración.

Biopolímero	Conc.	Media	EEM	IC_Inf	IC_Sup	IC_Inf_Boot	IC_Sup_Boot	Dif. Est.
Carragenina	6	4.31	1.724	-1.05	9.68	2.00	6.53	Ab
goma_x	6	6.84	1.493	2.19	11.49	3.56	11.05	Ab
mucilago	6	3.17	1.493	-1.48	7.81	0.78	6.76	Ab
Carragenina	30	3.43	1.493	-1.22	8.07	1.43	6.19	Ab
goma_x	30	4.93	1.724	-0.44	10.30	4.72	5.19	Ab
mucilago	30	3.60	1.493	-1.05	8.25	1.74	4.89	Ab
Carragenina	60	3.58	1.493	-1.07	8.22	1.17	5.98	Ab
goma_x	60	2.49	1.493	-2.16	7.13	1.56	3.17	Ab
mucilago	60	0.96	1.724	-0.4.41	6.33	0.50	1.65	Ab
Carragenina	90	3.65	1.493	-1.00	8.29	1.35	6.91	Ab
goma_x	90	2.15	1.493	-2.50	6.79	0.34	3.94	Ab
mucilago	90	4.96	1.493	0.32	9.61	1.42	8.72	Ab
Carragenina	600	2.45	1.493	-2.19	7.10	0.42	5.82	A
goma_x	600	0.75	1.493	-3.90	5.39	0.02	1.48	A
mucilago	600	11.13	2.111	4.56	17.71	7.39	14.88	B

* Literales diferentes indican diferencia estadística significativa.

Al existir interacción, nuestro interés se centra en su forma (Tabla 9 y 10). En la tabla 11 podemos observar que en las concentraciones 6, 30, 60 y 90 los biopolímeros tienen un comportamiento semejante al no existir diferencias entre sus medias. Sin embargo, se puede observar que la cantidad de IgY en la concentración de 600 fue superior en el mucílago (11.3) en comparación con la goma xantana (0.75). La carragenina mostró un comportamiento (2.45) superior a la goma xantana pero menor al mucílago. Los intervalos de confianza al 95% calculado por el Bootstrap nos confirman lo antes mencionado (Gráfica 10).

Concentración de IgY calculada con la técnica de Nanodrop



Gráfica 10. Las cajas indican las medias de mínimos cuadrados. Las barras de error indican los intervalos de 95% de confianza bootstrap para las medias

DISCUSIÓN

La extracción de IgY consiste en la eliminación de lípidos para formar una fracción soluble en agua, seguida de la precipitación de los anticuerpos contenidos en ella. Hay varios procesos de extracción disponibles para obtener altos rendimientos de IgY a partir de la yema de huevo (Nguyen HH *et al* 2010). La selección depende del grado de purificación, así como la escala de extracción, el costo y la tecnología disponible ya que predominan procedimientos de purificación complejos, con costos elevados o que consumen mucho tiempo (De Meulenaer B y Huyghebaert A 2010). Los polisacáridos son hidrocoloides que pueden ser utilizados como agentes quelantes, que forman complejos insolubles en agua, que son fáciles de eliminar. Confiere mayor viscosidad y consistencia gelatinosa, debido a los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que contienen favoreciendo sus propiedades emulsionantes, sin embargo, una limitación de estos polisacáridos aniónicos es la alta pérdida de proteínas en la extracción (Chang HM *et al* 2000).

La presencia de éster sulfato y 3,6 anhidrato de galactosa de la carragenina y la goma xantana, al estar en contacto con el agua, forman redes tridimensionales formando flóculos compuestos únicamente con el polímero o gelificando. Es necesario tener temperaturas mayores a 60 ° C para tener disoluciones uniformes.

La goma xantana al estar en contacto con líquidos aumenta su viscosidad rápidamente. Si no hay una buena dispersión de las partículas de la goma se dificulta la disolución completa de esta goma, requiriendo el utilizar mezcladores para dispersar ágilmente las partículas de la goma y tener una solución homogénea. (Carmona GJA 2015).

En el caso de la carragenina, la formación de redes tridimensionales entre sí desarrolla estructuras helicoidales que impiden una buena disolución, reduciendo su capacidad de unión con otras partículas suspendidas, lo cual reduce su eficiencia como floculante. Cabe señalar que una vez disuelta la carragenina, se tiene el riesgo de disminuir su capacidad floculante en presencia de iones de potasio o calcio

debido a una repulsión electrostática que existe entre los grupos sulfato y los iones potasio y calcio (Flores STA 2006).

Los numerosos grupos hidroxilo, frecuentes en los polisacáridos con alto contenido de ácido galacturónico como el caso del mucílago de nopal, le confieren una gran afinidad y mejor interacción con el agua al compararlo con la carragenina y la goma xantana (Rodríguez HYC 2017). Esta capacidad higroscópica, dada por la formación de numerosos puentes de hidrógeno, lo hace ser más eficiente, al hacer que la IgY pierda la protección de la repulsión de carga y la película de hidratación, polimerizándose en partículas grandes y depositándose. De esta forma, el mucílago de nopal minimiza la pérdida en la extracción y tiene un mayor rendimiento de IgY. Al ser un material seguro y no tóxico, que existe ampliamente en la naturaleza le confiere un importante potencial para la producción de IgY a gran escala. (Saenz C *et al* 2004; Flores AME 2015; Cortina AE 2020),

CONCLUSIONES.

- Se observó que la concentración de 600mg de mucílago de nopal es la mejor concentración para separar la fracción sólida de la yema de huevo de gallina
- El mucílago de nopal funcionó para separar la fracción sólida de la yema de huevo y su eficiencia de separación fue mayor a la obtenida por la goma xantana y la carragenina
- El mucílago de nopal tiene un comportamiento higroscópico superior al de la goma xantana y carragenina, lo que permite que a concentraciones altas sea más fácil de disolver
- Se obtuvo un título de 9.75 Log 2de inmunoglobulina Y (IgY) a una concentración de 600 mg de mucílago de nopal

BIBLIOGRAFÍA

Acosta LY. Estado de tratamiento de aguas por coagulación- floculación. ICIDCA. Derivados de la Caña y azúcar. 2006; 40(2): 10-17. Disponible: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664002>

Allegra A, Sortino G, Inglese P, Settanni L, Todaro A, Gallotta A. The effectiveness of *Opuntia ficus-indica* mucilage edible coating on postharvest maintenance of 'Dottato' fig (*Ficus carica* L.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life*.2017;12:135–141. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.010>.

Bhosale RR, Osmani RAM, Moin A. Natural Gums and Mucilages: A Review on Multifaceted Excipients in Pharmaceutical Science and Research. *IJPPR*. (Internet) 2014- 2015 (citado 22 de noviembre de 2014); 6(4):901-912. Disponible en: <http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/6/IJPPR,Vol6,Issue4,Article39.pdf>.

Bonilla RB. Caracterización fisicoquímica y comportamiento al flujo de nanopartículas constituida por proteína láctea y polisacáridos (xantana y goma arábica) en medio acuoso. Tesis de licenciatura. Facultad de química-UNAM. 2011 Disponible: https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000672676

Boutay F. Mhenni F. Use of the Cactus *Cladodes* Mucilage (*Opuntia Ficus Indica*) As an Eco-Friendly Flocculants: Process Development and Optimization using Stastical Analysis. *Int. J. Environ. Res*. 2014; 8(4). 1295-1308. Disponible: <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edo&AN=99339448&lang=es&site=eds-live>

Calva V. Larson J. Nopales, tunas y xoconostles. Consejo mexicano del nopal y tuna a.c./red nopal/CONABIO.2009; (2). Cartel. Disponible: http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janiumbin/janium_login_opac.pl?find&ficha_no=6579

Carmona GJA. Reología de dispersiones acuosas de goma xantana de presentaciones avanzadas. Tesis doctoral en ingeniería química. Universidad de Sevilla 2015. Disponible: <http://hdl.handle.net/11441/33201>

Chang HM, Lu TC, Chen CC, Tu YY, Hwang JY. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides, J. Agric. Food Chem. 2000; 48(4): 995-999. Disponible: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf990539k>

CONABIO. Nopal-Animales y bebidas. Diversidad natural y cultural. 2021. Blog. Disponible: <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/nopales>.

Cortina AE. Propiedades fisicoquímicas del mucílago de nopal químicamente modificado. Tesis de maestría en ciencias alimentarias. Universidad Veracruzana de ciencias básicas. 2020. Disponible: <http://cdigital.uv.mx/handle/1944/50800>

Criollo AA. Evaluación de la producción de xantano en cultivos de *Xanthomonas campestris* 1459 empleando subproductos agroindustriales como fuente de carbono. Tesis de licenciatura. Méx IPN. 2019. Disponible: <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/26730>

De Meulenaer B, Huyghebaert A. Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. Food Agricult. Immunol. 2010;13(4): 275 – 288. Disponible: <https://doi.org/10.1080/09540100120094537>

Du Toit L, Bothma C. De Wit M, Hugo A. Replacement of gelatin with liquid *Opuntia ficus-indica* mucilage in marshmallows. Part 1: Physical parameters. JPACD. 2016;18:25-39. Disponible: <https://jpacd.org/jpacd/article/view/51/153>

Durán AJC, Rodríguez VM, Verdeja MEJ, Córdova MMS. Determination of the monosaccharide composition in mucilage of *Opuntia ficus indica* by HPLC-ESI-MS - validation of the simple preparation and the analytical method. Journal of food measurement and characterization. 2020;15: 4233-4244. Disponible: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11694-021-00995-7.pdf>

FAO and WHO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 26 ed. It. FAO JECFA Monographs. 2021 Disponible: <https://doi.org/10.4060/cb4737en>

Flores AME. Estudio de proceso de secado por aspersion de mucilago de nopal (*Opuntia ficus indica*) y su efecto en las propiedades reológicas. Tesis de licenciatura. Méx. UNAM-FES ZARAGOZA. 2015. Disponible: https://www.zaragoza.unam.mx/wpcontent/Portal2015/Licenciaturas/iq/tesis/tesis_flores_alcantar.pdf

Flores STA. Propiedades viscoelásticas de geles de kappa-carragenina. Tesis de licenciatura. Méx. Facultad de química-UNAM. 2006 disponible: https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000605051

García NN. Optimización de la extracción acuosa y secado del biopolímero de nopal. Tesis de posgrado. CL. Universidad de Chile 2017. Disponible: <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/151051>

Gibson CA, Nobel, SP. In "The cactus primer. Edición Reprint. Harvard Univ Pr 2014.

Hernández CLM, Duque RAM, Martínez DCM. Tecnología IgY para el control de enfermedades infecciosas como la caries dental. 2015; 10-15 Facultad de odontología Universidad CES. Disponible: https://repository.ces.edu.co/bitstream/10946/390/1/Tecnologia_IGY.pdf.

Hatta H, Kim M. Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". Agric. Biol. Chem. 1990; 54(10):2531-2535. Disponible:<https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870349>

Inglese P, Mondragon CJ, Nefzaoui A, Sáenz C. Ecología y manejos del cultivo, manejo y usos el nopal. FAO. ICARDIA. 2018. Disponible: <https://www.fao.org/3/i7628es/I7628ES.pdf>.

Liu Z, Gao T, Yang Y, Meng F, Zhan F, Jiang Q, Sun X. Actividad anticancerígena de porfirán y carragenina de algas rojas. *Moléculas*. 2019; 24 (23): 4286. Disponible: <https://doi.org/10.3390/molecules24234286>

Long S, Zhenjiao H, Jiahui Ch, Yaofa L, Meihu M, Zhaoxia C. The impact of N-glycosylation on conformation and stability of immunoglobulin Y from egg yolk, *Int Jou of Biol Macromol*. 2017; 96:129-136. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.043>.

Manunza B, Deiana S, Pintore M, Gessa C. Molecular dynamics study of polygalacturonic acid chains in aqueous solution. *Carbohydrate Research*. 1997; 300 (1): 85–88. Disponible: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00027-X)

Mettertoledo. Floculación. Desarrollo de un proceso de floculación con control de la distribución de partículas. 2020. Blog https://www.mt.com/mx/es/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_ParticleProcessing/Formulation_Flocculation.html

Miller SM, Fugate EJ, Craver VO, Smith JA, Zimmerman JB. Toward understanding the efficacy and mechanism of *Opuntia* spp. as a natural coagulant for potential application in water treatment. *Environ Sci Technol*. 2008; 42(12): 4274-4279. Disponible: <https://doi.org/10.1021/es7025054>

Mohammed SM, Morrison S, Wims L, et al. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. *Immunotechnology*. 1998; 4(2):115-125. Disponible: [https://doi.org/10.1016/S1380-2933\(98\)00013-X](https://doi.org/10.1016/S1380-2933(98)00013-X)

Morrison SL, Mohammed MS, Wims LA, Trinh R, Etches R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. *Mol Immunol*. 2002; 38(8):619-625. Disponible: [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00095-5)

Moya HSL, Rodríguez MML, Espinoza MM. Xanthomonas campestris pv. campestris causante de manchas foliares del filodendro (*Philodendron scandens subsp. oxycardium*) en Cuautla, Morelos, México. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas. 2018;6(2):391-97 Disponible: <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i2.725>

Murcia GHW. Importancia de las inmunoglobulinas aviares y sus aplicaciones en inmunoensayos. Teoría y praxis investigativa 2009; 4(2):19-26. Disponible: [file:///C:/Users/Mariana%20Vermen/Downloads/Dialnet-ImportanciaDeLasInmunoglobulinasAviaresYSusAplicac-3726659%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/Mariana%20Vermen/Downloads/Dialnet-ImportanciaDeLasInmunoglobulinasAviaresYSusAplicac-3726659%20(7).pdf)

Nereida VUD. Osorio RMA. Villacis VNY. Producción, propiedades y beneficios de los mucilagos. Dom Cien. 2020; 6 (2): 503-524. Disponible: <http://dx.doi.org/10.23857/dc.v6i2.1181>

Nguyen HH, Tumpey TM, Park H-J, Byun Y-H, Tran LD. Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Avian Antibodies Against Influenza Virus H5N1 and H1N1 in Mice. PloS One. 2010; 5(4): 10152 Disponible: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010152>

Pereira JF, Marjorie Marim B, Mali S. Desenvolvimento De Filmes Orodispersíveis Biopoliméricos À Base De Amido, Goma Xantana E Gelatina. Iniciação Científica Cesumar. 2019; 21(1):61-70. Disponible: <https://doi.org/10.17765/1518-1243.2019v21n1p61-70>

Polson A, Von Wechmar MB, Regenmortel MHVV. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol. Commun. 1980; 9, 475-493. Disponible: <https://doi.org/10.3109/08820138009066010>

Quezada NA. Comprobación de la efectividad del coagulante (cochiflor) en aguas del lago de Managua “piedras azules”. Ibero de polímeros almedárez. 2004;5: 46-54. Disponible: <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/08/2004-almendarez.pdf>

Rahman S, Van Nguyen S, Icatlo FC Jr, Umeda K, Kodama Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(5):1039-1048. Disponible: 10.4161/hv.23383

Ramírez PPS. Mucilago de *Opuntia ficus indica*. Extracción y aplicación como agente dispersante en suspensiones alimenticias. Méx. Tesis de licenciatura. Méx. Facultad de química UNAM 2018. Disponible: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos

Rodríguez HYC. Evaluación del mucílago de nopal (*Opuntia ficus.indica*) como agente estabilizante en néctar de maracuyá (*Passiflora edulis*). Tesis de licenciatura. Btá.. Ingeniería en Alimentos Universidad La Salle 2017. Disponible: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/67

Ruiz HF. Aplicación de las películas comestibles a base de quitosano y mucílago de nopal en fresa (*Fragaria ananasa*) en refrigeración. Tesis de maestría. Méx. Universidad de las Américas Puebla.2009. Disponible: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/ruiz_h_f/

Saenz C, Sepúlveda E, Matsuhira B. Opuntia spp mucilage's a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments.* 2004; 57 (3): 275-290. Disponible: [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(03\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(03)00106-X).

Sánchez ME, Bartolomé MB. Identificación de niños superdotados en la comunidad de Madrid. *Revista complutense de educación.* 1999; 10. Disponible: <https://revistas.ucm.es/index.php/RCED/article/view/RCED9999120367A>

SEMARNAT. El nopal, un alimento muy mexicano. FND. 22 de junio de 2020. Nota info. Disponible: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/cactaceas-riqueza-natural-de-mexico>.

SEMARNAT. Crece en México el consumo y producción de nopal: Agricultura. 2 de diciembre 2020. Comunicado. Disponible: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crece-en-mexico-el-consumo-y-produccion-de-nopal-agricultura>.

Silva CDS. Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e toxicidade aguda da mucilagem de palma forrageira (*Opuntia ficus indica*). Teses e dissertações. Br. Universidade federal do Pamambuco. 2015. Disponible: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/19713>

Srinivas CA. Manual de pruebas diagnóstico y de vacunas para los animales terrestres. OIE :2019;3.3.14:9 Disponible: https://rr-americas.woah.org/wp-content/uploads/2021/04/03-esp_b-freischem-oie-terrestrial-and-aquatic-manuals.pdf

Stadeklman WJ, Cotterill OJ. Egg science and technology. 2d ed. Westport Conn (EU). AVI Pub. Conn. 1977.

Taylor AI, Gould JH, Sutton JB, Calvert AR. Avian IgY Birds to a Monocyte Receptor with IgG-LIKE Kinetics Despite and IgE-like Structure. J Biol Chem. 2008; 203(24): 16384-16390. Disponible: <https://doi.org/10.1074/jbc.M801321200>

Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Moser C, Høiby N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. J Cyst Fibros. 2016; 15(2): 171-178. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.08.002>

Vaca MM, López CR, Flores RJ, Terres PH, Lizardi RA, Rojas VMN. Aplicación del nopal (*Opuntia ficus indica*) como cagulante primario de aguas residuales. AIDIS. 2014;7(3):210-216. Disponible: <http://dx.doi.org/10.22201/iingen.0718378xe.2014.7.3.46815>

Wilhem B, Gürke M, Köhler FE, Pabst G, Schellenberg G, Köh Vogtherr M, Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem 2 ed. Fr. Eugen Köhler.1914 Disponible: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.623>

Xin Z, Yanru W, Dong UA, Zhaoxia C. An easy and simple separation method for Fc and Fab fragments from chicken immunoglobulin Y (IgY). Jou. Of Chromatography.2020.1141;1211-1220. Disponible: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122011>Get rights and content