



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”**

**T E S I S**

**EFFECTO DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDEOS DEL  
NOPAL (*Opuntia ficus-indica* y *O. atropes*) SOBRE LA  
MICROBIOLOGÍA DE LECHE PROVENIENTE DE SISTEMAS  
DE PRODUCCIÓN A ESCALA FAMILIAR**

Que presenta

**MVZ. LAURO ANTONIO DELGADO SÁNCHEZ**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. MARZO DE 2016**





**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”**

**T E S I S**

**EFFECTO DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES DEL  
NOPAL (*Opuntia ficus-indica* y *O. atropes*) SOBRE LA  
MICROBIOLOGÍA DE LECHE PROVENIENTE DE SISTEMAS  
DE PRODUCCIÓN A ESCALA FAMILIAR**

Que presenta

**MVZ. LAURO ANTONIO DELGADO SÁNCHEZ**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS. ROSA ELENA PÉREZ SÁNCHEZ**

Co-asesor: **DR. LIBERATO PORTILLO MARTÍNEZ**

**COMITÉ TUTORIAL**

**DR. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES**

**DR. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN**

**MC. RUY ORTIZ RODRÍGUEZ**

**MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. MARZO DE 2016**



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por brindarme salud para este tiempo lleno de experiencias y aprendizaje.

A mis padres, Rita H. Sánchez Chávez y Lauro Delgado López por el apoyo que siempre me dan.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado, así como el apoyo económico para la fase experimental a través del proyecto Aprobado: “Dinámica de las poblaciones microbianas en rumen y leche en bovinos bajo dietas complementadas con nopal (*Opuntia ficus-indica*)” número de proyecto 182873.

Al MC. Ruy Ortiz Rodríguez por su constante atención, esfuerzo y paciencia en mi orientación.

A mi asesora, la Dra. Rosa Elena Pérez Sánchez por aceptarme como su alumno, por su empeño para mejorar mi preparación y mi trabajo de investigación y por su paciencia y amabilidad.

Al mi Co-asesor el Dr. Liberato Portillo Martínez por tomarse la molestia de estar al pendiente de mis avances así como de las sugerencias y consejos recibidos durante este periodo de formación como maestro en ciencias.

Al Dr. Juan José Valdez Alarcón, Dr. Héctor Martínez Flores y al Dr. Pedro Antonio García Saucedo por sus asesorías, sugerencias y comentarios hechos durante la fase experimental de esta investigación sin los cuales el resultado habría sido otro.

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me brindaron su tiempo y colaboración durante la realización de esta investigación, a cada uno de ellos, Gracias.



## ÍNDICE

	Pág.
Resumen	1
Introducción	5
Literatura citada	14
<b>Artículo I.</b> Caracterización, modelación morfológica y análisis proximales de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>O. atropes</i> durante las épocas de estiaje y lluvias.	18
Resumen	18
Abstract	19
Introducción	20
Materiales y métodos	21
Resultados y discusiones	23
Conclusiones	35
Literatura citada	36
<b>Artículo II.</b> Efecto de la adición de extractos de cladodios y epidermis de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>Opuntia atropes</i> a leche cruda bovina sobre bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales.	40
Resumen	40
Abstract	40
Introducción	41
Materiales y métodos	43
Resultados	47
Discusiones	50
Conclusiones	55
Literatura citada	55

<b>Artículo III.</b> Validación de la metodología de microdilución y expansión en placa como alternativa para el análisis microbiológico de mesófilas aerobias y coliformes totales en leche cruda.	<b>61</b>
Resumen	<b>61</b>
Abstract	<b>62</b>
Introducción	<b>63</b>
Materiales y métodos	<b>64</b>
Resultados y discusiones	<b>67</b>
Conclusiones	<b>71</b>
Literatura citada	<b>72</b>
<b>Artículo IV.</b> Análisis de la actividad antioxidante de extractos metanólicos de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>O. atropes</i> y su efecto sobre bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales al adicionarlos directamente a leche cruda bovina.	<b>75</b>
Resumen	<b>75</b>
Abstract	<b>76</b>
Introducción	<b>76</b>
Materiales y métodos	<b>79</b>
Resultados y discusiones	<b>88</b>
Conclusiones	<b>103</b>
Literatura citada	<b>104</b>
Discusión general	<b>111</b>
Literatura citada	<b>117</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Pág
<b>Artículo I</b>	
<b>Tabla 1.</b> Dimensiones morfológicas de <i>Opuntia ficus-indica</i> de acuerdo a época, tipo de parcela y nivel de cladodio	25
<b>Tabla 2.</b> Dimensiones morfológicas de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>Opuntia atropes</i> de acuerdo a época y nivel de cladodio	27
<b>Tabla 3.</b> Características bromatológicas de <i>Opuntia ficus-indica</i> de acuerdo a tipo de parcela, época y nivel de cladodio	28
<b>Tabla 4.</b> Características bromatológicas de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>Opuntia atropes</i> en parcela sin prácticas culturales	31
<b>Figura 1.</b> Modelo de <i>caja negra</i> para esquematizar las características morfológicas (largo, ancho, grueso y peso) y bromatológicas de los cladodios de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>O. atropes</i> .	24
<b>Figura 2.</b> Reformulación de la <i>caja negra</i> para la modelación esquemática del efecto de época de año y de prácticas culturales sobre las dimensiones morfológicas y bromatológicas del cladodio de <i>O. ficus-indica</i> y <i>O. atropes</i> .	33
<b>Artículo II</b>	
<b>Tabla 1.</b> Características bromatológicas de cladodios de <i>Opuntia ficus-indica</i> y <i>O. atropes</i> en parcela sin prácticas culturales.	48
<b>Tabla 2.</b> Fenoles totales de extractos metanólicos de cladodio y epidermis de nopal de acuerdo a especie y parcela.	49
<b>Tabla 3.</b> Microbiológico de leche cruda adicionada con extractos metanólicos de cladodio y epidermis de nopal de acuerdo a especie y parcela.	50
<b>Artículo III</b>	
<b>Tabla 1.</b> Resultados descriptivos de las UFC mL <sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales obtenidas por metodología convencional (M1) y microdilución y expansión en placa (M2).	68
<b>Figura 1.</b> Regresión lineal para UFC mL <sup>-1</sup> de bacterias Mesófilas aerobias (A) y coliformes totales (B) entre la metodología establecida por la NOM y	70

microdilución y expansión en placa.

- Figura 2.** Grafica de Bland-Altman de UFC mL-1 de bacterias mesófilas aerobias y coroliformes totales entre la metodología establecida por la NOM y microdilución y expansión en placa. **71**

#### Artículo IV

- Tabla 1.** Extractos de metanólicos agrupados por tipo de muestra, especie, método de extracción y parcela de origen. **81**
- Tabla 2.** Fenoles totales de extractos metanólicos de cladodios y epidermis de *O. ficus-indica* y *O. atropes* de acuerdo al grupo. **88**
- Tabla 3.** Inhibición de radical DPPH, ABTS y poder reductor de Hierro de extractos metanólicos purificados de acuerdo a grupo. **94**
- Tabla 4.** Correlaciones de Pearson y omega cuadrado ( $\omega^2$ ) entre tratamiento (Grupo), fenoles totales, flavonoides, inhibición de DPPH, inhibición de ABTS y habilidad reductora de Hierro **98**
- Figura 1.** Fenoles totales (mg EAG mL<sup>-1</sup>) y flavonoides (mg EQ mL<sup>-1</sup>) obtenidos en extractos metanólicos de acuerdo al grupo. **92**
- Figura 2.** Inhibición (%) del radical DPPH por concentración EAG (mg mL<sup>-1</sup>) obtenidos en extractos metanólicos de acuerdo al grupo. **95**
- Figura 3.** Inhibición (%) del radical ABTS por concentración ET (mg mL<sup>-1</sup>) de extractos metanólicos de acuerdo al grupo. **96**
- Figura 4.** Poder reductor de hierro de extractos metanólicos de acuerdo al grupo. **97**
- Figura 5.** Medias de mínimos cuadrados para mesófilas aerobias (UFC mL<sup>-1</sup>) en leche cruda post-adición de los extractos metanólicos. **99**
- Figura 6.** Medias de mínimos cuadrados para coliformes Totales (UFC mL<sup>-1</sup>) en leche cruda post-adición de los extractos metanólicos. **102**

## RESUMEN

El objetivo general fue evaluar el efecto de extractos metanólicos de cladodio y epidermis de cladodio de *Opuntia ficus-indica* (OFI) y *O. atropes* (OA) sobre la microbiología de leche cruda (LC) bovina. Mientras que, los objetivos particulares fueron los siguientes: 1) Caracterizar y modelar morfológica y bromatológicamente a OFI y OA durante las épocas de estiaje y lluvias, 2) validar la metodología de microdilución y extensión en placa (M2) como alternativa para el análisis de mesófilas aerobias (MA) y coliformes totales (CT) en leche cruda de bovinos, en sustitución de la metodología establecida por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM): NOM-092-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994 (M1) y, 3) evaluar la actividad antioxidante de extractos metanólicos de OFI y OA y determinar su efecto sobre BMA y CT al adicionarse directamente a LC bovina. Para el primer objetivo particular se obtuvieron cladodios de ambas especies y épocas del año, se seleccionaron al azar 30 plantas/especie/parcela (15/época) y se muestrearon 60 cladodios: 50% por nivel (3er y 4to nivel) se obtuvieron los indicadores morfológicos y bromatológicos/especie, nivel y época. Para el segundo objetivo particular se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mL<sup>-1</sup> de MA y CT por M2 y como referencia de acuerdo a las NOM (M1).El análisis estadístico para determinar la concordancia entre métodos (M1 vs M2) consistió principalmente en: comprobar normalidad de los parámetros estudiados por la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov; determinar valores extremos (outliers) y, 3) establecer el coeficiente de correlación de concordancia (CC) de Lin. Para el tercer objetivo particular se extrajeron los extractos metanólicos de cladodios y epidermis de cladodio de OFI y OA mediante extracción en equipo Soxhlet y por maceración. En los extractos obtenidos se determinó la concentración de fenoles totales (FT), flavonoides (FL) y la capacidad para inhibir radicales DPPH, ABTS y reducir Hierro. Los extractos se adicionaron a la LC y 2 h post adición se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) mL<sup>-1</sup> de

BMA y CT por M2. El análisis estadístico fue a través de la metodología de los Modelos lineales generalizados y las diferencias estadísticas entre grupos se obtuvieron a través del método de medias de mínimos cuadrados. Se encontró que los cladodios de *O. atropes* presentaron indicadores morfológicos de menor magnitud ( $P < 0.05$ ) que *O. ficus-indica*. Las características nutricionales de *O. atropes* fueron similares a *O. ficus-indica* en el estiaje: proteína cruda, 4.70 y 5.64%; extracto etéreo, 0.53 y 0.57%; extracto libre de nitrógeno, 42.18 y 40.82% para *O. atropes* y *O. ficus-indica*, respectivamente. El peso fresco y la fibra cruda de *O. ficus-indica* disminuye en época de lluvias, mientras que el contenido de grasa y carbohidratos se incrementa en dicha época. No se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los promedios de UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT obtenidos por la metodología establecida (M1) y la M2. Los promedios de M1 y M2 fueron:  $2.4 \times 10^5$  y  $2.3 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> de BMA, respectivamente. Para CT fueron:  $4.6 \times 10^4$  y  $4.8 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. La concentración de FT y FL fue mayor ( $P < 0.05$ ) en los extractos obtenidos por maceración que por Soxhlet, pero se encontró mayor ( $P < 0.05$ ): concentración, actividad antioxidante y bacteriostática (disminución de UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT) de dichos compuestos en extractos de epidermis. OA presentó menor concentración ( $P < 0.05$ ) de FT y FL que OFI, pero su efecto bacteriostático fue igual ( $P > 0.05$ ). La adición de extractos metanólicos a LC permite alcanzar el estándar de calidad para BMA; más no, para CT. Los extractos de epidermis de *O. ficus-indica* poseen mayor capacidad antioxidante, sin embargo, independientemente de la especie, los extractos metanólicos de epidermis de cladodio muestran mayor eficacia para disminuir BMA y CT en leche cruda.

**Palabras Clave:** *Opuntia* spp, bromatología, microbiología, validación, fenoles.

## ABSTRACT

The general objective was to evaluate the effect of methanol extracts of cladode and epidermis of cladode of *Opuntia ficus-indica* (OFI) and *O. atropes* (OA) on the microbiology of bovine raw milk (RM). Whereas the particular objectives were the following: 1) characterize and to model morphological and bromatological OFI and OA during the dry and rainy seasons. 2) validate the methodology of microdilution and spread in plate (M2) as an alternative to the analysis of aerobic mesophilic bacteria (AMB) and total coliforms (TC) in raw milk of bovine, in replacement of the methodology established by the Mexican official standards (NOM) (NOM-092-SSA1-1994 and NOM-113-SSA1-1994 (M1)). 3) evaluate the antioxidant activity of methanol extracts from OFI and OA and determine their effect on AMB and TC when added directly to bovine RM. For the first particular objective cladodes of both species were obtained during both seasons of the year, 30 plants/species/parcel (15/season) 60 cladodes were selected and sampled randomly: 50% per level (3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> level) were obtained morphological and bromatological indicators species<sup>-1</sup>, level<sup>-1</sup> and season<sup>-1</sup>. For the second particular objective it was determined the number of colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> of AMB and TC per M2 according to the referenced NOM (M1). The statistical analysis to determine the concordance between methods (M1 vs M2) consisted mainly of checking the normality of the parameters studied by the statistical test of Kolmogorov-Smirnov; to determine extreme values (*outliers*) and determine the coefficient of correlation of concordance (CC) of Lin. For the third particular objective methanol extracts were extracted from cladode and epidermis of cladode from OFI and OA in Soxhlet equipment and by maceration extraction. In the extracts were determined the concentration of total phenols (TF), flavonoids (FL) and ability to inhibit radical DPPH, ABTS, and reduce iron. The extracts were added to the RM and 2 h post addition it was determined the number of colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> of AMB and TC per M2. The statistical analysis was through the methodology of generalized linear

models and statistical differences between groups were obtained by the method of least square means. Found that the cladodes *O. atropes* presented morphological indicators of lesser magnitude ( $P < 0.05$ ) that *O. ficus-indica*. The nutritional characteristics of *O. atropes* were similar to *O. ficus-indica* in the dry seasons: crude protein, 4.70 and 5.64%; ethereal extract 0.53 and 0.57%; nitrogen-free extract, 42.18 and 40.82% for *O. atropes* and *O. ficus-indica*, respectively. Fresh weight and crude fiber of *O. ficus-indica* decreases in rainy season, while the content of fat and carbohydrate is increased at this time. No difference was found ( $P > 0.05$ ) between averages of CFU mL<sup>-1</sup> of AMB and TC obtained by the established methodology (M1) and the M2. The averages of M1 and M2 were:  $2.4 \times 10^5$  and  $2.3 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> of AMB, respectively. TC were:  $4.6 \times 10^4$  and  $4.8 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>, respectively. TF and FL concentration was higher ( $P < 0.05$ ) to the extracts obtained by maceration that by Soxhlet, but most was found ( $P < 0.05$ ): concentration, bacteriostatic and antioxidant activity (decrease of CFU mL<sup>-1</sup> AMB and TC) of these compounds in extracts of epidermis. OA presented lower concentration ( $P < 0.05$ ) of FT and FL that OFI, but its bacteriostatic effect was equal ( $P > 0.05$ ). The addition of methanol extracts to RM allows to reach the quality standard for AMB; but not for TC. Epidermis extracts of *O. ficus-indica* possess greater antioxidant capacity, however, regardless of the species, the methanol extracts of epidermis from cladode show greater efficiency to decrease AMB and TC in raw milk.

**Key words:** *Opuntia* spp, bromatology, microbiology, validation, phenols.

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de leche de bovinos a escala familiar, tienen como objetivo el autoconsumo y la venta de excedentes, puesto que opera con mano de obra familiar y utiliza granos, forrajes y esquilmos, producidos también por la familia, para la alimentación del ganado (Murillo *et al.*, 2009; Flores y Reveles, 2010); por ello, este tipo de sistemas tienen el potencial de incrementar los ingresos del hogar, reducir pérdidas y generar empleo tanto con la comercialización de leche como con la venta de subproductos lácteos (Bennett *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2012). En México, los sistemas familiares de producción de leche aportan el 28% de la producción de leche a nivel nacional. Sin embargo, estos sistemas enfrentan una serie de problemas como: productividad baja (9 a 10 L cabeza<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>), falta de organización e integración económica, debido a: escasa o nula tecnificación (Castelán *et al.*, 2008), comercialización de sus productos en mercados locales. Además, el ordeño y la elaboración de subproductos lácteos se realizan bajo condiciones de poca higiene. Por lo anterior, existe riesgo para la salud de los consumidores de leche y sus derivados provenientes de este tipo de sistemas (Moreno *et al.*, 2012), puesto que la leche y sus derivados por sí solos son una fuente potencial para el desarrollo de microorganismos patógenos para los humanos, mismos que se incrementan ante la falta de higiene de la ubre, de los utensilios o recipientes para la leche e incluso por contacto directo con fuentes de contaminación (polvo) proveniente del entorno del sistema ( granja) o, por la excreción de este tipo de patógenos por un animal infectado (Oliver *et al.*, 2005).

En México, las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) marcan los valores estándar de unidades formadoras de colonia (UFC) mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT) para que se considere apta para el consumo humano: 6 y 2 (log<sub>10</sub>) UFC mL<sup>-1</sup> para BMA y CT, respectivamente. No obstante, en Michoacán, específicamente en el Noroeste del estado, la leche cruda proveniente de sistemas familiares de producción de bovinos presentó entre 6.7 a 7.9

---

(log<sub>10</sub>) UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y entre 2.3 a 3.5 (log<sub>10</sub>) UFC mL<sup>-1</sup> de CT (Carrión *et al.*, 2007). En el Municipio de Sahuayo, Michoacán, los estudios determinaron que la leche cruda contenía de 8.0 a 9.0 (log<sub>10</sub>) UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y de 5.7 a 8.0 (log<sub>10</sub>) UFC mL<sup>-1</sup> de CT (Flores *et al.*, 2009). Valores que superan los estándares y por ello, este tipo de leche no puede considerarse apta para el consumo humano (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004; Zamora *et al.*, 2012). No obstante, esta problemática no es exclusiva del estado de Michoacán, se presenta en todas las zonas rurales del país donde se han establecido los sistemas de producción de leche a escala familiar (Álvarez *et al.*, 2012).

Ante esta problemática, diversas investigaciones se han enfocado a evaluar diferentes tratamientos o procesos para incrementar la calidad e inocuidad de la leche retrasando o eliminado el crecimiento de microorganismos que alteren su composición o que sean potenciales vectores de infecciones para los humanos (Vera *et al.*, 2009). Las principales estrategias recomendadas por la FAO para evitar el deterioro de la leche son: a) almacenamiento en frío (4 °C) después del ordeño o b) hervir la leche (Muehlhoff *et al.*, 2013). Asimismo, existe la pasteurización: la leche se somete a una temperatura de 62.8°C por 30 min y se enfría rápidamente a menos de 10°C. Sin embargo, se ha evidenciado que los brotes de enfermedades en humanos, relacionados con el consumo de leche, fueron provocados por leche no pasteurizada, así como también por el consumo de leche pasteurizada (Oliver *et al.*, 2005). No obstante, el mayor consumo de leche no pasteurizada, por parte de la población en general, es a través de quesos fabricados con este tipo de leche. Mientras que los productores, empleados del sistema de producción, familia y vecinos consumen directamente la leche no pasteurizada (Rojas *et al.*, 2014). Por ello, es necesario establecer estrategias que coadyuven a reducir la contaminación bacteriana de la leche y sus subproductos y acercar a este tipo de productores a los estándares de

calidad que exigen las NOM para evitar que sigan siendo una fuente de riesgo para la salud pública.

Ante este reto, un grupo de investigadores de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), evaluaron el nopal (*Opuntia ficus-indica*) como parte de las dietas de vacas productoras de leche. Así, una dieta complementada con 12 kg d<sup>-1</sup> de *O. ficus-indica* cabeza<sup>-1</sup>, produjo: a) incremento de la producción láctea, b) mejoró la calidad bacteriológica y organoléptica de la leche y, c) se incrementó el rendimiento del queso fresco. En relación a la calidad bacteriológica de leche cruda esta contenía menores cuentas bacterianas (-1.0 UFC log<sub>10</sub> mL<sup>-1</sup>) para BMA y CT (-0.4 UFC log<sub>10</sub> mL<sup>-1</sup>) con respecto al número de UFC mL<sup>-1</sup> encontrados en leche cruda proveniente de vacas que no consumieron nopal, como complemento de su dieta (Ortiz *et al.*, 2012).

El hallazgo de la disminución de BMA y CT en leche cruda por efecto de la dieta complementada con nopal, produjo nuevas investigaciones con el fin de evaluar si la disminución era producida por los componentes del nopal o por la interacción del metabolitos producidos por el animal durante la digestión y los componentes de la cactácea. Por ello, se evaluó el efecto de la adición directa (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0% con base a 100 mL de leche) de nopal molido, mucílago, y epidermis de nopal a la leche cruda, sobre las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT. Esta investigación arrojó resultados similares a los obtenidos con la dieta complementada con nopal: se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) el número de UFC mL<sup>-1</sup> de dichas bacterias 2 h después de la adición directa de nopal (*O. ficus-indica*) a la leche cruda, ello en comparación con el testigo (leche cruda sin adición de nopal) (Ortiz *et al.*, 2013). Ortiz *et al.* (2013) concluyen que la adición de nopal a la leche cruda puede constituir una alternativa potencial para aumentar la vida útil y reducir el riesgo de infecciones transmitidas por la leche y sus derivados.

No obstante, aún se desconoce que compuestos químicos del nopal son los que realmente tienen efecto sobre los microorganismos que demeritan la calidad bacteriológica de la leche cruda. El efecto antibacteriano del nopal, pudiera asociarse a las defensas químicas (metabolitos secundarios) que poseen este tipo de plantas y que son parte constitutiva de las mismas. (Morrissey *et al.*, 1999; Nimchuk *et al.*, 2003; Mysore *et al.*, 2004; Glazebrook, 2005; Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005). Los metabolitos secundarios que se han identificado en algunas cactáceas y en otro tipo de plantas son los sesquiterpenos, lactonas, cetonas, ácidos fenólicos, flavonoides y taninos; mismos que presentan actividad antimicrobiana, ya que inhiben el crecimiento de bacterias y hongos (Gonzales, 2014). Tanto en flores como en cladodios y frutos de *O. ficus-indica* se han identificado fitoquímicos con propiedades funcionales (Stintzing y Carle, 2005; Livrea y Tesoriere, 2006) como los fenoles (Scalbert *et al.*, 2005); entre los que se encuentran los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, (Manach, *et al.*, 2004). Dichos compuestos fenólicos son parte de la resistencia al ataque de patógenos (Daglia, 2012).

Existen evidencias de que los ácidos fenólicos (cumárico, protocatecuico, ferúlico, hidroxibenzoico y salicílico) juegan un papel importante en la resistencia al estrés y ataque de patógenos; el ácido hidroxibenzoico, presenta actividad antimicrobiana (provoca la muerte de los microorganismos), mientras que el ácido gálico posee actividad bacteriostática (inhibe el crecimiento bacteriano) (Guevara, *et al.*, 2010). Estos fenoles ya han sido identificado también en *O. ficus-indica* (en variedades comerciales y silvestres). Independientemente de su origen biosintético (plantas, algas, bacterias y hongos) se han demostrado que las moléculas citadas anteriormente tienen funciones biológicas similares; por ejemplo, antioxidantes, antivirales, antibacteriana (Kahdem y Marles, 2010). Por lo que posiblemente, los compuestos fenólicos presentes en el nopal sean los responsables de la disminución de BMA y CT, en leche cruda de

bovinos; tanto cuando se alimenta a las vacas con una dieta complementada con nopal, como cuando el nopal es adicionado directamente a la leche cruda.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, es importante identificar y determinar los compuestos fenólicos presentes en el nopal; sin embargo, el logro de dichos objetivos implica técnicas de extracción que permitan separar la mayor cantidad o concentración de compuestos de la materia orgánica (Cevallos *et al.*, 2009) sin deterioro de sus características químicas para su análisis (Raaman 2006). En las técnicas de extracción se utilizan solventes de diferente polaridad (dependiendo de los compuestos que se quieran obtener) y extracciones sucesivas para la purificación parcial de los extractos obtenidos. Así, primeramente se obtienen lípidos y terpenoides con solventes no polares (hexano y cloroformo) y, posteriormente, se extraen compuestos de mayor polaridad (fenóles) con solventes polares como: acetato de etilo, alcohol, metanol o agua (Raaman 2006; Seth y Sarin, 2010). Para ello, el equipo comúnmente utilizado en la obtención de compuestos orgánicos, es el Soxhlet. No obstante, la extracción en Soxhlet requiere de temperaturas mayores a 50°C; temperatura que puede originar la pérdida de muchos compuestos químicos (Akowuah *et al.*, 2008); por lo que se recurre a la técnica de extracción por maceración, la cual se puede realizar a temperatura ambiente (Raaman, 2006).

Aunado a lo expuesto en el párrafo anterior, la cantidad de compuestos fenólicos presentes en nopal está relacionado con su composición bromatológica, aspecto que debe ser considerado al determinar dichos compuestos (Giletto *et al.*, 2013); puesto que, las características bromatológicas de una especie vegetal, como el nopal, pueden cambiar de una especie a otra y aun dentro de la misma por razones agroecológicas (Valares *et al.*, 2011) y, en consecuencia, la cantidad y tipo de fenoles puede variar (Copia *et al.*, 2012).

Actualmente, la determinación de los compuestos fenólicos en los alimentos es una práctica relevante, debido a su relación con los efectos benéficos sobre la salud humana; estos compuestos se asocian con la actividad antiinflamatoria, antioxidante, hipoglucémica, antimicrobiana y neuroprotectora (Mostafa *et al.*, 2014). Así, la correlación entre el contenido de fenoles y flavonoides se vincula a la actividad antioxidante y esta última, se asocia con la actividad antibacteriana (Leyva *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014). Sin embargo, la actividad antioxidante de una muestra no puede determinarse basándose en una prueba, se requieren de dos o más: la determinación de la capacidad reductora del radical 2,2' bis-azino (3-etilbenzotiazolinasulfonato) (ABTS), capacidad captadora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y la habilidad reductora de hierro (siglas en inglés: FRAP; Ferric reducing ability of plasma) (Huang *et al.*, 2005).

Por otra parte, los métodos comunes para determinar la actividad antimicrobiana de nuevos compuestos químicos son las pruebas de sensibilidad antimicrobiana por: dilución en caldo, dilución en agar o agar vertido en placa y difusión en disco. Sin embargo, en el análisis microbiológico de leche, la metodología exigida por las NOM para la determinación del número de colonias de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales (NOM-092-SSA1 1994 y NOM-113-SSA1 1994, respectivamente) se basan en la técnica de agar vertido en placa. Técnica que únicamente permite hacer el análisis de pocas muestras y repeticiones si se cuenta con una campana convencional. Además, si se requiere de trabajar con más muestras, debe hacerse a intervalos de tiempo. Bajo este escenario, se dificulta la evaluación del efecto de compuestos químicos sobre la microbiología de leche en donde estén implicados varios tratamientos con sus repeticiones y, es común, que dichos tratamientos no se analicen en el mismo tiempo y en las mismas condiciones. Por ello, y para salvar esta desventaja, las diluciones decimales de la muestra en solución salina (0.85%) se pueden hacer con base en microlitros ( $\mu\text{L}$ ); a esta

conversión se le conoce como microdilución. No obstante, la cantidad del inóculo también debe ser en microlitros y para inocularlo en el medio se puede utilizar la técnica de inóculo extendido en placa (Bozek *et al.*, 2014); en la cual, el inóculo se agrega sobre la superficie del agar ya solidificado y se espera la absorción del mismo para incubar.

Las ventajas de la técnica del inóculo extendido en placa son: no existe peligro de eliminar microorganismos cuando se vierte el agar líquido (45°C) sobre el inóculo, el conteo de UFC es fácil puesto que las colonias crecen en la superficie del agar y el volumen de inóculo para sembrar es limitado; 0.5 a 0.1 mL o menor, lo que facilita el conteo de UFC; ya que el número esperado es de 20 a 200 o menor (Bozek *et al.*, 2014). Por ello, no requiere de un gran volumen de muestra en el cual aplicar los tratamientos de interés y las diluciones pueden ser en menor volumen de solución salina. En este sentido, Wu *et al.* (2015) determinaron que los resultados obtenidos por microdilución son comparables a la macrodilución (utilizada comúnmente en la técnica inóculo extendido en placa). No obstante, se requiere validar dicha técnica al utilizar como referente los resultados del análisis microbiológico de leche de acuerdo a las NOM.

Por todo lo referido en los párrafos anteriores, el objetivo general de la presente investigación fue evaluar el efecto de extractos metanólicos de cladodio y epidermis de cladodio de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* sobre la microbiología de leche cruda (LC) bovina, mientras que los objetivos particulares fueron: a) Caracterizar y modelar esquemáticamente los indicadores morfológicos (largo, ancho, grueso y peso) y análisis proximal de *O. ficus-indica* y *O. atropes* durante las épocas de estiaje y lluvias, b) Evaluar el efecto de extractos metanólicos de cladodio y epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* y *O. atropes* sobre la microbiología de leche cruda bovina, c) Evaluar el número de UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales por microdilución y extendido en placa y comparar con los resultados obtenidos conforme a las Normas Oficiales Mexicanas NOM-092-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994 y, d) Evaluar el

efecto de la adición de extractos metanólicos de *O. ficus-indica* y *O. atropes* a leche cruda bovina sobre su microbiología. Mismos que fueron cumplidos y abordados a lo largo del presente trabajo a en forma de artículos.

En el primer artículo “Caracterización, modelación morfológica y análisis proximales de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* durante las épocas de estiaje y lluvias” (Publicado en Revista Electrónica Nova Scientia, 2015, N° 15 7(3), 133-152) se estableció que en *O. ficus-indica*, el peso fresco del cladodio disminuye con las prácticas culturales y esto se acentúa durante época de lluvias. En estiaje, se incrementa el largo del cladodio y, en lluvias, el ancho del cladodio se incrementa. Pero, en esta especie, el contenido de grasa y carbohidratos se incrementa durante la época de lluvias, con o sin prácticas culturales. Por su parte, la proteína cruda y la materia seca no se modifican en *O. ficus-indica* por efecto de época de año o por presencia o ausencia de prácticas culturales. Con respecto a *O. atropes*, ésta cactácea presenta características morfológicas de menor magnitud que *O. ficus-indica*, pero sus características nutricionales son similares a ésta en ambas épocas del año. Sin embargo, presenta serias dificultades para adaptarse a terrenos de cultivo (parcela).

En el segundo artículo “Efecto de la adición de extractos de cladodios y epidermis de *O. ficus indica* y *O. atropes* a leche cruda bovina sobre bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales” se logró determinar que la adición de extractos metanólicos de epidermis de cladodio o cladodio completo de *O. ficus indica* y *O. atropes* a la leche cruda, proveniente de sistemas de producción con deficiente sistemas de salud de la ubre y ordeño, mejoró la calidad microbiológica de ésta, puesto que disminuyó el número de UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales. Aunque si bien, los extractos metanólicos de *O. atropes* (epidermis y cladodio) presentan menor valor de fenoles totales que los extractos metanólicos de *O. ficus indica* (epidermis y

cladodio) poseen mayor efecto sobre cuentas bacterianas cuando se adicionan directamente a la leche cruda.

Para el tercer artículo “Validación de la metodología de microdilución y expansión en placa como alternativa para el análisis microbiológico de mesófilas aerobias y coliformes totales en leche cruda”, se comprobó que la microdilución y cultivo por expansión para el análisis microbiológico de leche permiten obtener resultados comparables a los obtenidos bajo la metodología indicada por las NOM para el análisis microbiológico de leche cruda y permite el análisis de más muestras en un único intervalo de tiempo.

Finalmente, en el cuarto artículo “Análisis de la actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* y su efecto sobre bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales al adicionarlos directamente a leche cruda bovina” se evidenció que la adición de extractos metanólicos de *O. ficus-indica* y *O. atropes* a leche cruda disminuyó el número de UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales. No obstante, aun y cuando la actividad antioxidante de los extractos no siempre fue equivalente, todos los extractos presentaron la propiedad bacteriostática.

## LITERATURA CITADA

- Asao, T., Kumeda, Y., Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., y Kozaki, S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and infection*, 130(01), 33-40.
- Bennett, A., Lhoste, F., Crook, J. y Phelan, J., 2006. The future of small scale dairying. Global perspective. *FAO Livestock report 2006*. 51-62.
- Boczek, L.A., Rice, E.W. y Johnson, C.H. 2014. Total viable counts. Spread plate technique in Batt, C.A. (ed.) *Encyclopedia of Food Microbiology* (2<sup>da</sup> Ed.), 636-637.
- Carrión, G.M., Flores, M.R. y González, V.J. 2007. Estudio Microbiológico de la leche cruda entera en explotaciones bovinas lecheras del Noroeste de Michoacán. 1er Congreso Regional de BUIATRIA. Memorias. Morelia Mich.
- Castelán, O.O.A., Estrada, F.J., Espinoza O.A., Sánchez, V.E., Ambriz, V.V., Hernández, O.M. 2008. Strategies for the management of agroecosystem resources in temperates zones of Mexico: the case of campesino milk farmers in the central highlands. En: Castelán, O.O., Bernués, J.A., Ruiz, S.R., Mould, F.L. (Eds.). *Opportunities and challenges for smallholder ruminant systems in Latin America, resource management, food safety, quality and market access*. p. 133-160. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.
- Cevallos, C.J.M., Reyes, D.C.J.I., Etxeberria, E., Danyluk, M.D., y Rodrick, G.E. 2009. Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11), 557-566.
- Copia, J., Gaete, H., Zúñiga, G., Hidalgo, M., y Cabrera, E. 2012. Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella* sp. *Latin american journal of aquatic research*, 40(1), 113-123.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 174-181.
- Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D. y Zhao, Y. 2014. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*, 38, 184-191.
- Flores, M.R., Carrión, G.M., Nuñez, S.M. y Basrerra, C.H., 2009. Calidad sanitaria del proceso de extracción de la leche cruda entera del municipio de Sahuayo, Michoacán. 5to Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología. Morelia, Michoacán. 323-325.

- Flores, O.M.A y Reveles, H.M. 2010. Producción de nopal forrajero de diferentes variedades y densidades de plantación. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er. Internacional de “Producción y Aprovechamiento del Nopal. Escobedo, N.L. México. Noviembre 2010. Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial. No. 5, 130-210.
- Giletto, C., Monti, M.C., Ceroli, P., y Echeverría, H. 2013. Efecto de la fertilización con nitrógeno sobre la calidad de tubérculos de papa (Var. Innovator) en el sudeste Bonaerense. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha 14(2), 217-222.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic And Necrotrophic Pathogens. Annual Review of Phytopathology. 43(1), 205-227.
- González, A.L.F. 2014. Planta contra diabetes e hipertensión. Revista Ciencia y Desarrollo. mayo-junio. Vol. 40 (271) [en línea] <http://www.cyd.conacyt.gob.mx/> [Consulta: 18 de junio del 2014].
- Huang, D., Ou, B., y Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of agricultural and food chemistry, 53(6), 1841-1856.
- Khadem, S. y Marles, R.J. 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. Molecules 15, 7985-8005.
- Leyva, J.M., Pérez, C.J.J., González, A.G.A., Esqueda, M., y Ayala, Z.J.F. 2013. Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*. Revista mexicana de micología, 37, 11-17.
- Livrea, M.A. y Tesoriere, L. 2006. Health benefits and bioactive components of the fruits from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. Journal of the Professional Association for Cactus Development, 8, 73-90.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, E., Rémésy, C. y Jimenez, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 79, 727-747.
- Moreno, G.A., Herrera, A.G., Carrión, G.M., Álvarez, B.D, Pérez, S.R. y Ortiz, R.R. 2012. Caracterización y modelación esquemática de un sistema familiar de bovinos productores de leche en la Ciénega de Chapala, México. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. Vol. 20, Núm. 3-4. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México. 85-94.
- Morrissey, J.P. y Osbourn, A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(3), 708.
- Muehlhoff, E., Bennett, A., y McMahon, D. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 243-263.

- Murillo, A.B., López, A.R., García, H.J.L., Nieto, G.A., Troyo, D.E., Ávila, S.N., Espinoza, V.J.L., Ortega, P.R., Palacios, E.A. y Plascencia, J.A. 2009. Cultivos forrajeros alternativos para zonas áridas y semiáridas. *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias*. Foro consultivo, Científico y Tecnológico, 1(21), 1.
- Mysore, K.S. y Ryu, C.M. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science*, 9(2), 97-104.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt Iii, B.F. y Dangl, J.L. 2003. Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics*, 37(1), 579-609
- NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Counting of somatic cells by flowcy to metry. Disponible en internet: [www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php](http://www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php).
- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>.
- NOM-113-SSA 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>.
- Oliver, S.P., Jayarao, B.M., y Almeida, R.A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), 115-129.
- Pérez, S.R.E., García, S.P.A., Ángel, P.M.E., Valdez, J.J., Ramos, B., Ortiz, R.R. y Ramírez, G. 2010. Producción de la leche provenientes de vacas Holstein bajo una dieta complementada con nopal (*Opuntia ficus-indica*). Morelia Michoacán, México. Disponible en internet: <http://www.engormix.com/MAGanaderiache/nutricion/articulos/produccionleche-provenientes-vacas-t3072/141-p0.htm>.
- Raaman, N. 2006. *Phytochemical Techniques*. New India Publishing Agency, New Delhi, India. 10, 25-28.
- Rojas, R.M.R., Lammoglia, V.M.A., Daniel, R.A.I.C., Cabrera, N. y Cruz, B.E. 2014. Presencia de microorganismos en leche cruda de vaca durante la ordeña en clima tropical. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán, México del 2 al 4 de Julio de 2014. 487- 491.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., y Jiménez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.

- Seth, R., y Sarin, R. 2010. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. Archives of applied science Research, 2(5), 285-291.
- Stintzing, F.C., y Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia spp.*): A review on their chemistry, technology, and uses. Molecular Nutrition and Food Research, 49, 175-194.
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P. y Singh, K.B. 2005. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? Functional Plant Biology, 32(1), 1-19.
- Valares, M.C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura. 15-32.
- Vera, A.H., Hernández, A.L., Espinoza, G.J., Ortega, R.L., Díaz, A.E., Román, P.H., Núñez, H.G., Medina, C.M. y Ruiz, L.F. (Eds.) 2009. Producción de leche de bovino en el sistema familiar. p. 384 INIFAP. CIRGOC. Libro técnico Núm. 24. Veracruz, México.
- Wiermer, M., Feys, B.J. y Parker, J.E. 2005. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. Current Opinion in Plant Biology, 8(4), 383-389.
- Wu, G., Yang, Q., Long, M., Guo, L., Li, B., Meng, Y. y Zou, L. 2015. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility. The Journal of antibiotics, 68(11), 661-665.
- Zamora, V.R., Eduardo, M.F.H.E., Montañés, S.J.L., Huerta, S.U., Pérez, S.R.E., 2012. Estudio microbiológico de queso fresco adicionado con el probiótico *Saccharomyces boulardii* Biológicas, 14(2), 37-41.

---

**Caracterización, modelación morfológica y análisis proximales de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* durante las épocas de estiaje y lluvias**

**Characterization, morphological modeling and proximate analysis of *Opuntia ficus-indica* and *O. atropes* during the dry and rainy seasons**

**Rosa E. Pérez-Sánchez<sup>1</sup>, Lauro A. Delgado-Sánchez<sup>2</sup>, Pedro A. García-Saucedo<sup>1</sup>, Juan Pulido<sup>3</sup> y Ruy Ortiz-Rodríguez<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, <sup>2</sup>Posgrado Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán, <sup>3</sup>Universidad Autónoma Chapingo. Campus Morelia, Michoacán, <sup>4</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH, Morelia, Michoacán

**RESUMEN**

El objetivo fue caracterizar y modelar esquemáticamente los indicadores morfológicos (largo, ancho y grueso) y análisis proximal de las especies *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* durante la época de estiaje y lluvias. La investigación se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH. Se obtuvieron cladodios de ambas especies y épocas del año de dos parcelas: parcela con prácticas culturales (PCP) y sin prácticas culturales (PSP). Se seleccionaron al azar 30 plantas/especie/parcela (15/época) y se muestrearon 60 cladodios: 50% por nivel (3er y 4to nivel); 40 de *O. ficus-indica* (20 en PCP y 20 en PSP), mientras que en *O. atropes*, fueron 20 cladodios en PSP. Se obtuvieron los indicadores morfológicos y bromatológicos/especie, nivel y época. El análisis estadístico se realizó mediante Modelos de Efectos Fijos y las diferencias estadísticas ( $\alpha=0.05$ ) entre parcelas, especies y época, se obtuvieron a través de medias ajustadas por mínimos cuadrados. Se encontró que el peso fresco, en estiaje fue mayor ( $P<0.05$ ) en *O. ficus-indica* en PSP ( $1.59 \pm 0.25$  kg) que en lluvias ( $0.85 \pm 0.18$  kg); sin embargo, el valor nutricional aumentó en el estiaje, específicamente en extracto etéreo ( $2.97 \pm 1.04\%$ ) y en extracto libre de nitrógeno ( $64.17 \pm 2.36\%$ ). Las características nutricionales de *O. atropes* fueron similares a *O. ficus-indica* en el estiaje: proteína cruda, 4.70 y 5.64%; extracto etéreo, 0.53 y

0.57%; extracto libre de nitrógeno, 42.18 y 40.82% para *O. atropes* y *O. ficus-indica*, respectivamente. El peso fresco y la fibra cruda de *O. ficus-indica* disminuye en época de lluvias, mientras que el contenido de grasa y carbohidratos se incrementa en dicha época. Pero, la proteína cruda permanece estable en ambas épocas del año. Por su parte, *O. atropes* presenta características morfológicas de menor magnitud que *O. ficus-indica*. Sin embargo, sus características nutricionales son similares a esta, tanto en época de lluvias como en estiaje.

**Palabras clave:** *Opuntia* spp, prácticas culturales, análisis proximal, época

### ABSTRACT

The aim of this research was to characterize and to model schematically morphological indicators (long, wide and thick) and the proximate analysis of the species *Opuntia ficus-indica* and *O. atropes* during rainy and dry seasons. This research was made at the Faculty of Veterinary Medicine–UMSNH. Cladodes from both species and seasons were obtained from two plots: a plot with cultural practices (PCP) and a plot without cultural practices (PSP). 30 plants/species/plot (15/season) were selected randomly and 60 cladodes were sampled: 50% by level (3rd and 4th level); 40 of *O. ficus-indica* (20 in PCP and 20 in PSP) and 20 cladodes of *O. atropes* in PSP. The morphological and proximate indicators for each species, levels and seasons were obtained. The statistical analysis was performed by the Fixed Effect Model and statistical differences ( $\alpha=0.05$ ), between plots, species and seasons, were calculated by comparing the least square means. Results showed that the mean fresh weight was greater during dry season ( $P<0.05$ ) in *O. ficus-indica* in PSP ( $1.59 \pm 0.25$  kg) than in rainy season ( $0.85 \pm 0.18$  kg), however, the nutritional value increased during dry season, specifically in ether extract ( $2.97 \pm 1.04\%$ ) and in nitrogen free extract ( $64.17 \pm 2.36\%$ ). Cladodes of *O. atropes* showed morphological indicators of smaller magnitude ( $P<0.05$ ) than *O. ficus-indica*. In addition to this, nutritional characteristics of both species were similar during dry season as follows: crude protein, 4.70 and 5.64%; ether

extract, 0.53 and 0.57%; nitrogen free extract, 42.18 and 40.82% for *O. atropes* and *O. ficus-indica*, respectively. The fresh weight and the crude fiber of *O. ficus-indica* decreases in the rainy season, while the fat and carbohydrates is increased in that time, but the crude protein values remains stable for both seasons. Meanwhile, *O. atropes* showed morphological characteristics of lesser magnitude than *O. ficus-indica*. However, their nutritional characteristics are similar to this, both in rainy and dry season.

**Keywords:** *Opuntia* spp, cultural practices, proximate analysis, season.

## INTRODUCCIÓN

Algunas especies de cactáceas, en la actualidad, juegan un papel importante dentro de la alimentación humana (frutas y verduras) (Nerd *et al.*, 2002) y de animales (Palacios, 2010). En humanos y en animales, la especie *Opuntia ficus-indica* es la más utilizada comercialmente (Esquivel y Araya, 2012). En México, cerca de 150,000 ha de cultivo de nopal son utilizadas como forraje para la alimentación animal (Palacios, 2010), sobre todo en zonas marginadas y con periodos de sequía prolongados (Gebremeskel *et al.*, 2013). Sin embargo, las cactáceas utilizadas como forraje para el ganado, generalmente sólo se ofrecen como alimento de emergencia (Zimmermann *et al.*, 2007; Reveles y Flores, 2010), puesto que, los valores de proteína (5.7% de PC) y energía (2.5 Mcal kg<sup>-1</sup>) que presenta esta planta, son menores a otros forrajes convencionales para alimentación del ganado (Baraza *et al.*, 2008; Vázquez *et al.*, 2008). Así, una dieta complementada con 12 kg d<sup>-1</sup> de *O. ficus-indica* cabeza<sup>-1</sup>, durante la época de estiaje produce: a) incremento de la producción láctea, b) mejora la calidad bacteriológica de leche cruda y queso fresco y, c) mejora la calidad organoléptica y el rendimiento del queso fresco (Ortiz *et al.*, 2012).

En la actualidad, el nopal es una alternativa en la alimentación del ganado en zonas rurales con estiaje prolongado, sin embargo, *O. ficus-indica* es la especie más estudiada en comparación con *O. atropes*, especie nativa del estado de Michoacán, México (López *et al.*, 2008); misma que, posiblemente posea cualidades que permitan su utilización en dietas para el ganado. Por ello, el objetivo fue caracterizar y modelar esquemáticamente los indicadores morfológicos (largo, ancho, grueso y peso) y análisis proximal de *O. atropes* y *O. ficus-indica* durante las épocas de estiaje y lluvias.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en Morelia, Michoacán, México, donde se obtuvieron cladodios de *Opuntia atropes* (OA) y *O. ficus-indica* (OFI) durante las épocas de estiaje y lluvias. Las características climatológicas fueron: templado sub-húmedo, temperatura media anual entre 12° y 18°C, temperatura en invierno de 6 a 11°C, precipitación de 786 mm promedio anual; lluvias en invierno de 4 a 5 mm (CONABIO, 2008). Los cladodios de OA y OFI provenían de dos parcelas: en la primera parcela o parcela con prácticas culturales, se cultivó OFI en una superficie de 10 m<sup>2</sup>; las practicas que se realizaron, en esta parcela, fueron: control de arvenses, poda de formación y saneamiento. En la segunda parcela o parcela sin prácticas culturales, se cultivó OA y OFI en una superficie de 250 m<sup>2</sup>; 125 m<sup>2</sup> destinados a OA y 125 m<sup>2</sup> para OFI; en esta parcela no se realizaron prácticas de control de arvenses, poda de formación y saneamiento.

Para la caracterización de las dimensiones morfológicas del cladodio (largo, ancho y grueso) de ambas especies se seleccionaron al azar, del total de plantas parcela<sup>-1</sup> especie<sup>-1</sup>, 15 plantas época<sup>-1</sup>: cinco de *O. ficus-indica* en PCP, cinco de *O. ficus-indica* en PSP y cinco de *O. atropes* en PSP. De cada planta se recolectó al azar un cladodio del 3er nivel y uno del 4to nivel y se registró: peso fresco (peso<sup>F</sup>), éste se obtuvo con una báscula digital (Torrey; modelo L-EQ para lb, kg y

oz: México); largo (largo<sup>C</sup>) y ancho del cladodio (ancho<sup>C</sup>), medidos con una cinta métrica (cm); grosor de la punta (grosor<sup>P</sup>); grosor de la base (grosor<sup>B</sup>) y grosor medio del cladodio (grosor<sup>M</sup>), estas medidas se obtuvieron con un vernier (Somet Inox: 6"/150 mm).

Obtenidas las dimensiones morfológicas por cladodio, se realizaron los análisis proximales o bromatológicos correspondientes, bajo la metodología descrita por la AOAC (1990). Se determinó: materia seca (MS), humedad (H), proteína cruda (PC), fibra cruda (FC), extracto etéreo (EE), cenizas (C) y extracto libre de nitrógeno (ELN). Además, se estimó la producción de mucilago deshidratado (MD)/especie/parcela/época; a partir de muestras de 300 g de materia fresca. El MD se obtuvo mediante la metodología modificada por Rodríguez (2010). La extracción de mucilago y el análisis proximal se realizaron en el laboratorio de investigación y desarrollo de alimentos (LIDA) de la Facultad de Químico Farmacobiología-UMSNH.

Para determinar la caracterización de las dimensiones morfológicas y bromatológicas se utilizó un diseño factorial: 2x2x2 exclusivamente para OFI: 2 épocas (lluvias y estiaje); 2 parcelas (PCP y PSP) y 2 niveles (3er y 4to nivel). Para la comparación de las dimensiones morfológicas y bromatológicas entre OFI y OA en PSP, se utilizó un factorial, 2x2x2; 2 especies (OFI y OA); 2 épocas (lluvias y estiaje) y 2 niveles (3er y 4to nivel). El análisis estadístico se realizó mediante la metodología de Modelos de Efectos Fijos (Littell *et al.*, 2006) y, las diferencias estadísticas entre especie, parcela, época y nivel ( $\alpha=0.05$ ) se obtuvieron mediante la metodología de medias ajustadas por mínimos cuadrados (Littell *et al.*, 2002).

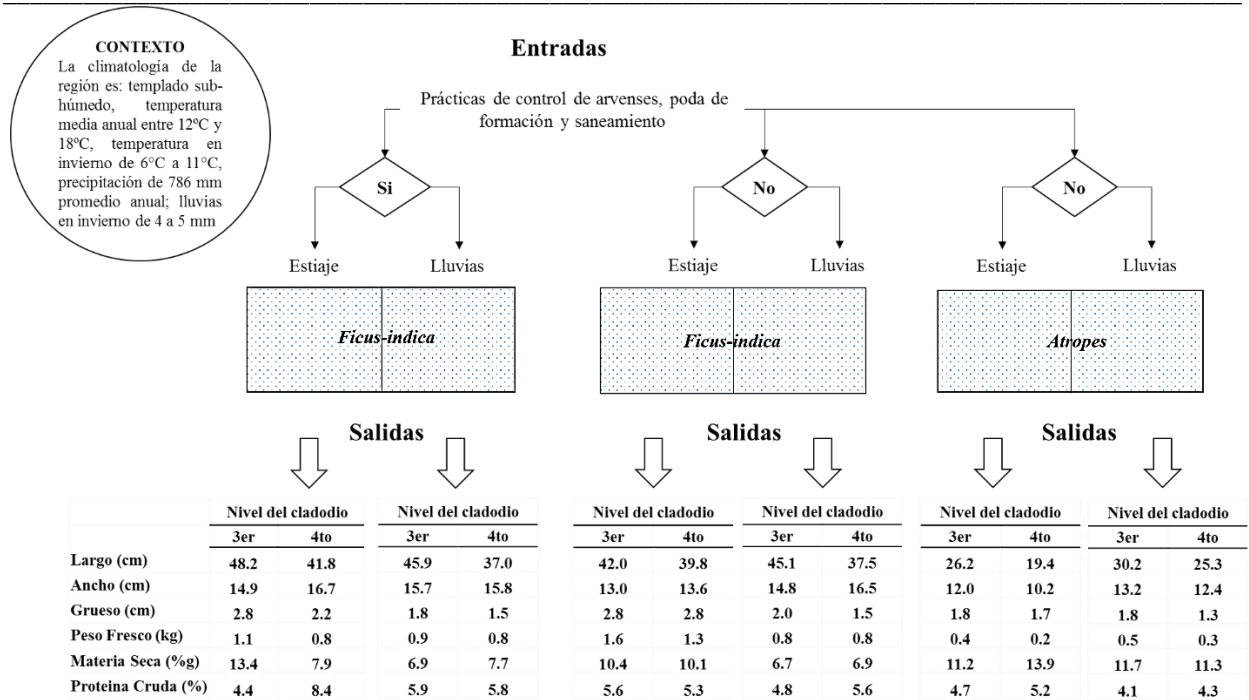
Para el diseño del modelo esquemático se consideró que, un modelo es un bosquejo que representa un conjunto real con cierto grado de precisión y en la forma más completa posible, pero sin pretender aportar una réplica de lo que existe en la realidad (Wadsworth, 1997). Además, las características propias del cultivo de *Opuntia* spp dificultan su estudio, pues el control de los

eventos climáticos, bajo la producción en parcelas, fue prácticamente nulo; por lo tanto, se caracterizó y modeló el sistema de producción de nopal en parcela (con y sin prácticas culturales) y por época (estiaje y lluvias) bajo dos esquemas de organización: el primero tomó un enfoque de *caja negra*, en donde se obtuvieron los factores que pudieron condicionar el funcionamiento del sistema; en el segundo esquema, se consideró un enfoque con mayor formalidad en donde la información recabada se integró considerando los criterios de: i) homogeneidad interna con respecto a una propiedad del sistema; ii) interdependencia relativa de los componentes del sistema; iii) disciplinas afines como base para descomponer el sistema (Juárez *et al.*, 2008). Para el diseño del modelo esquemático, que representó el comportamiento morfológico y bromatológico de los cladodios de ambas especies analizadas, se utilizó la metodología de las correlaciones de Pearson (SAS, 2010).

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los sistemas agrícolas se crean, operan y producen en función de las características de su contexto, puesto que éste determina en gran medida los insumos, la especie [plantas] presente en el sistema, las estrategias de producción, la tecnología y la inversión económica (Moreno *et al.*, 2012). En lo que respecta al contexto (Figura 1) donde se cultivaban las especies analizadas (*O. ficus-indica* y *O. atropes*) éste fue diferente a su hábitat natural: *Opuntia* spp se desarrolla en climas áridos o semiáridos (Lozano, 2011).

Como se puede observar en la Figura 1, tanto OFI como OA muestran un comportamiento diferente, de acuerdo a la época del año, en cuanto a sus dimensiones morfológicas y a su contenido nutricional. Además, OFI presenta diferente comportamiento en dichas variables cuando se somete a prácticas culturales o no. Sin embargo, ambas especies analizadas presentan mejor comportamiento en los indicadores morfológicos y bromatológicos en época de estiaje.



**Figura 1.** Modelo de *caja negra* para esquematizar las características morfológicas (largo, ancho, grueso y peso) y bromatológicas de los cladodios de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes*.

Hernández *et al.* (2007), Muñoz *et al.* (2008), Hernández *et al.* (2011) y Lozano (2011) determinaron que, las diferencias morfológicas y bromatológicas entre nopales de la misma especie, pero diferente población, pueden deberse a efectos climáticos, tales como: humedad, temperatura, luz, tipo de suelo y elementos del suelo; así por ejemplo, la proteína cruda se incrementa en respuesta a la acidez o salinidad de los suelos (Lozano, 2011), mientras que, el peso del cladodio mejora con las prácticas agronómicas (Mondragón *et al.*, 2003).

Al analizar los indicadores morfológicos de *O. ficus-indica*, se observó que, el largo del cladodio (Largo<sup>C</sup>) del 3er nivel fue de mayor magnitud ( $P < 0.05$ ) bajo parcela con prácticas culturales y durante la época de estiaje:  $48.2 \pm 6.6$  cm. En época de lluvias, fue de  $45.9 \pm 3.1$  cm en PCP y de  $45.1 \pm 4.0$  cm en parcela sin prácticas culturales. En el 4to nivel, el largo<sup>C</sup> no fue afectado ( $P > 0.05$ ) por la época ni por el tipo de parcela (Tabla 1).

**Tabla 1.** Dimensiones morfológicas de *Opuntia ficus-indica* de acuerdo a época, tipo de parcela y nivel de cladodio

Parcela	Variable	Época de estiaje			
		$\bar{X}$ Nivel 3	$\pm$	$\bar{X}$ Nivel 4	$\pm$
Con prácticas	Largo <sup>1</sup>	48.2 <sup>a1</sup>	6.6	41.8 <sup>a2</sup>	5.1
	Ancho <sup>1</sup>	14.9 <sup>a1</sup>	2.4	16.7 <sup>a1</sup>	2.0
	Grosor Medio <sup>1</sup>	2.8 <sup>a1</sup>	0.4	2.2 <sup>a2</sup>	0.4
	Grosor Punta <sup>1</sup>	2.4 <sup>a1</sup>	0.5	2.0 <sup>a1</sup>	0.7
	Grosor Base <sup>1</sup>	3.7 <sup>a1</sup>	0.4	2.8 <sup>a2</sup>	0.8
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	1.11 <sup>a1</sup>	0.4	0.85 <sup>a2</sup>	0.24
Sin prácticas	Largo <sup>1</sup>	42.0 <sup>b1</sup>	1.9	39.8 <sup>a1</sup>	4.8
	Ancho <sup>1</sup>	13.0 <sup>b1</sup>	1.7	13.6 <sup>b1</sup>	1.3
	Grosor Medio <sup>1</sup>	2.8 <sup>a1</sup>	0.4	2.8 <sup>b1</sup>	0.4
	Grosor Punta <sup>1</sup>	3.0 <sup>b1</sup>	0.7	2.2 <sup>a2</sup>	0.4
	Grosor Base <sup>1</sup>	4.2 <sup>a1</sup>	0.4	3.4 <sup>b2</sup>	0.5
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	1.59 <sup>b1</sup>	0.2	1.25 <sup>b2</sup>	0.28
Época de lluvias					
Con prácticas	Largo <sup>1</sup>	45.9 <sup>b1</sup>	3.1	37.0 <sup>a2</sup>	2.1
	Ancho <sup>1</sup>	15.7 <sup>a1</sup>	2.3	15.8 <sup>a1</sup>	1.4
	Grosor Medio <sup>1</sup>	1.8 <sup>b1</sup>	0.3	1.5 <sup>c1</sup>	0.2
	Grosor Punta <sup>1</sup>	2.0 <sup>a1</sup>	0.4	1.9 <sup>a1</sup>	0.5
	Grosor Base <sup>1</sup>	2.6 <sup>b1</sup>	0.6	2.5 <sup>a1</sup>	0.5
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	0.85 <sup>c1</sup>	0.2	0.77 <sup>a1</sup>	0.10
Sin practicas	Largo <sup>1</sup>	45.1 <sup>b1</sup>	4.0	37.5 <sup>a2</sup>	2.4
	Ancho <sup>1</sup>	14.8 <sup>a1</sup>	1.7	16.5 <sup>a1</sup>	2.3
	Grosor Medio <sup>1</sup>	2.0 <sup>b1</sup>	0.6	1.5 <sup>c1</sup>	0.1
	Grosor Punta <sup>1</sup>	2.1 <sup>a1</sup>	0.5	1.8 <sup>a1</sup>	0.3
	Grosor Base <sup>1</sup>	2.7 <sup>b1</sup>	0.6	2.3 <sup>a1</sup>	0.4
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	0.83 <sup>c1</sup>	0.2	0.82 <sup>a1</sup>	0.16

<sup>&</sup>= kilogramos; <sup>1</sup>= centímetros

<sup>a, b</sup>= diferencias ( $P < 0.05$ ) dentro de columna

<sup>1, 2</sup>= diferencias ( $P < 0.05$ ) dentro de fila.

En relación al ancho del cladodio (Ancho<sup>C</sup>), se encontró que, durante el estiaje éste fue mayor en el 3er (14.9  $\pm$  2.4 cm) y 4to nivel (16.7  $\pm$  2.0 cm) en PCP. En lluvias, el ancho<sup>C</sup> fue igual en ambas parcelas ( $P > 0.05$ ) (Tabla 1). Para grosor medio (Grosor<sup>M</sup>) del cladodio no se observaron diferencias ( $P > 0.05$ ) por parcela, pero si por época; las mayores dimensiones ( $P < 0.05$ ) se encontraron en el estiaje (Tabla 1). Finalmente, el peso fresco (Peso<sup>F</sup>) de los cladodios de *O. ficus-indica* cambia ( $P < 0.05$ ) dependiendo del tipo de parcela, nivel del cladodio y época: cladodios del 3<sup>er</sup> nivel presentaron menor Peso<sup>F</sup> ( $P < 0.05$ ) en época de lluvias: 0.830 a 0.850 kg;

en estiaje fue de  $1.11 \pm 0.45$  y  $1.59 \pm 0.25$  kg en PCP y PSP, respectivamente. El Peso<sup>F</sup> del 4<sup>to</sup> nivel, fue mayor durante el estiaje ( $P < 0.05$ ) en PSP:  $1.25 \pm 0.28$  kg (Tabla 1).

Estos resultados sugieren que *O. ficus-indica* se comporta mejor en estiaje y bajo prácticas culturales. Aspectos que no concuerdan con Nobel (2002), Blanco y Leyva (2007) y Reveles y Flores (2010): en época de lluvias las cactáceas mejoran su comportamiento. Pero, las diferencias morfológicas en la misma especie se presentan bajo efectos climáticos y culturales diferentes (Hernández *et al.*, 2007; Muños *et al.*, 2008). Respecto al Peso<sup>F</sup>, se ha establecido que, éste mejora con las prácticas agronómicas (Mondragón *et al.*, 2003). No obstante, las arvenses mantienen: humedad, materia orgánica, nitrógeno e insectos; todos ellos, benéficos para el cultivo del nopal (Doporto, 2014). Camacho *et al.* (2007) determinaron que la competencia por la humedad entre arvenses y *Opuntia* spp genera disminución de ésta en el suelo, lo que incrementa la producción de biomasa del nopal (5 a 25%). Aspecto que podría explicar el mayor contenido de materia fresca de *O. ficus-indica* en la época de estiaje y sin prácticas culturales (Tabla 1).

En cuanto a las dimensiones de *O. atropes*, se encontró que el Peso<sup>F</sup>, Largo<sup>C</sup>, Ancho<sup>c</sup>, y Grosor<sup>M</sup> de cladodios del 3<sup>er</sup> nivel no fueron afectados ( $P > 0.05$ ) por la época (Tabla 2). Reyes *et al.* (2005) establecieron que, en *Opuntia* spp existen especies con menor grado de domesticación y, debido a su variabilidad genética, les permite expresar dimensiones morfológicas sin cambios observables de una época de año a otra. No obstante, en el 4<sup>to</sup> nivel, el Largo<sup>C</sup> ( $25.3 \pm 2.0$  cm) y Ancho<sup>C</sup> ( $12.4 \pm 0.9$  cm) fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en época de lluvias (Tabla 2). Aun así, las dimensiones de *O. atropes* fueron similares a lo encontrado por González (1999).

Al comparar las dimensiones morfológicas de los cladodios se determinó que *O. ficus-indica* posee mayores dimensiones que *O. atropes* en ambas épocas del año ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, en lluvias *atropes* presentó dimensiones similares ( $P > 0.05$ ) a *O. ficus-indica* en cuanto a: Ancho<sup>C</sup> y

Grosor<sup>M</sup> (Tabla 2). Posiblemente ésta similitud fue determinada por el nivel de humedad; puesto que, *O. ficus-indica* se comportó mejor durante el estiaje y *O. atropes*, en época de lluvias.

Tabla 2. Dimensiones morfológicas de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* de acuerdo a época y nivel de cladodio

Especie	Variable	Época de estiaje			
		$\bar{X}$ Nivel 3	$\pm$	$\bar{X}$ Nivel 4	$\pm$
<i>O. ficus-indica</i>	Largo <sup>1</sup>	42.0 <sup>a1</sup>	1.9	39.8 <sup>a1</sup>	4.8
	Ancho <sup>1</sup>	16.0 <sup>a1</sup>	1.7	14.4 <sup>a1</sup>	1.3
	Grosor Medio <sup>1</sup>	2.8 <sup>a1</sup>	0.4	2.8 <sup>a1</sup>	0.4
	Grosor Punta <sup>1</sup>	3.0 <sup>a1</sup>	0.7	2.2 <sup>a1</sup>	0.4
	Grosor Base <sup>1</sup>	4.2 <sup>a1</sup>	0.4	3.4 <sup>a2</sup>	0.5
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	1.580 <sup>a1</sup>	0.251	1.150 <sup>a2</sup>	0.278
<i>O. atropes</i>	Largo <sup>1</sup>	26.2 <sup>b1</sup>	6.7	19.4 <sup>b2</sup>	3.3
	Ancho <sup>1</sup>	12.0 <sup>b1</sup>	1.9	10.2 <sup>b1</sup>	1.3
	Grosor Medio <sup>1</sup>	1.8 <sup>b1</sup>	0.2	1.7 <sup>a1</sup>	0.3
	Grosor Punta <sup>1</sup>	1.7 <sup>b1</sup>	0.1	1.2 <sup>b1</sup>	0.3
	Grosor Base <sup>1</sup>	2.8 <sup>b1</sup>	0.4	2.2 <sup>b1</sup>	0.4
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	0.430 <sup>c1</sup>	0.196	0.190 <sup>c2</sup>	0.096
Época de lluvias					
<i>O. ficus-indica</i>	Largo <sup>1</sup>	45.1 <sup>a1</sup>	4.0	37.5 <sup>a2</sup>	2.4
	Ancho <sup>1</sup>	14.6 <sup>b1</sup>	1.7	14.5 <sup>a1</sup>	2.3
	Grosor Medio <sup>1</sup>	2.0 <sup>b1</sup>	0.6	1.5 <sup>a1</sup>	0.1
	Grosor Punta <sup>1</sup>	2.1 <sup>b1</sup>	0.6	1.8 <sup>b1</sup>	0.3
	Grosor Base <sup>1</sup>	2.8 <sup>b1</sup>	0.6	2.2 <sup>b1</sup>	0.4
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	0.956 <sup>b1</sup>	0.191	0.620 <sup>b2</sup>	0.164
<i>O. atropes</i>	Largo <sup>1</sup>	30.2 <sup>b1</sup>	2.2	25.3 <sup>c2</sup>	2.1
	Ancho <sup>1</sup>	13.2 <sup>b1</sup>	0.7	12.4 <sup>c1</sup>	0.9
	Grosor Medio <sup>1</sup>	1.8 <sup>b1</sup>	0.5	1.3 <sup>a1</sup>	0.3
	Grosor Punta <sup>1</sup>	1.8 <sup>b1</sup>	0.3	1.5 <sup>b1</sup>	0.4
	Grosor Base <sup>1</sup>	2.6 <sup>b1</sup>	0.6	1.7 <sup>b2</sup>	0.7
	Peso Fresco <sup>&amp;</sup>	0.468 <sup>c1</sup>	0.073	0.302 <sup>c1</sup>	0.073

<sup>&</sup>=kilogramos; <sup>1</sup>= centímetros

<sup>a, b</sup>=diferencias (P<0.05) dentro de columna

<sup>1, 2</sup>=diferencias (P<0.05) dentro de fila.

En cuanto a los valores bromatológicos de *O. ficus-indica*, se encontró que la materia seca (MS) fue mayor (P<0.05) en ambas parcelas durante el estiaje: 13.39  $\pm$  2.6% en PCP y de 10.39  $\pm$  0.69% en PSP. En época de lluvias, la MS fue igual (P>0.05) en ambas parcelas y ambos niveles: 6.72 a 7.72% (Tabla 4). Sáenz (2006), encontró que en esta especie la MS es variable (9 a 12%) y su valor se incrementa con la madurez del cladodio.

Tabla 3. Características bromatológicas de *Opuntia ficus-indica* de acuerdo a tipo de parcela, época y nivel de cladodio

Parcela	Variable	Época de estiaje			
		$\bar{X}$ Nivel 3	$\pm$	$\bar{X}$ Nivel 4	$\pm$
Con prácticas	Humedad <sup>g%</sup>	86.61 <sup>a1</sup>	2.67	92.08 <sup>a2</sup>	0.98
	Materia Seca <sup>g%</sup>	13.39 <sup>a1</sup>	2.67	7.92 <sup>a2</sup>	0.98
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	0.27 <sup>a1</sup>	0.06	0.82 <sup>a1</sup>	0.10
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	31.70 <sup>a1</sup>	3.55	25.13 <sup>a1</sup>	0.73
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	4.38 <sup>a1</sup>	1.07	8.34 <sup>a2</sup>	0.09
	Cenizas <sup>g%</sup>	22.30 <sup>a1</sup>	1.06	25.07 <sup>a1</sup>	2.41
	E.L.N. <sup>g%</sup>	41.36 <sup>a1</sup>	2.34	40.64 <sup>a1</sup>	3.02
	Mucílago <sup>g</sup>	1.76 <sup>a1</sup>	0.42	1.56 <sup>a1</sup>	0.34
Sin prácticas	Humedad <sup>g%</sup>	89.62 <sup>b1</sup>	0.69	89.95 <sup>b1</sup>	1.07
	Materia Seca <sup>g%</sup>	10.38 <sup>b1</sup>	0.69	10.05 <sup>b1</sup>	1.07
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	0.23 <sup>a1</sup>	0.13	0.57 <sup>a1</sup>	0.03
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	28.80 <sup>a1</sup>	5.04	32.90 <sup>a1</sup>	2.50
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	5.64 <sup>b1</sup>	0.53	5.29 <sup>b1</sup>	0.08
	Cenizas <sup>g%</sup>	24.50 <sup>a1</sup>	2.86	26.55 <sup>a1</sup>	2.27
	E.L.N. <sup>g%</sup>	40.82 <sup>a1</sup>	8.11	35.69 <sup>a1</sup>	0.51
	Mucílago <sup>g</sup>	2.66 <sup>a1</sup>	1.39	2.30 <sup>a1</sup>	0.31
Con prácticas	Época de lluvias				
	Humedad <sup>g%</sup>	93.13 <sup>c1</sup>	0.83	92.28 <sup>a1</sup>	1.91
	Materia Seca <sup>g%</sup>	6.87 <sup>c1</sup>	0.83	7.72 <sup>a1</sup>	1.91
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	2.97 <sup>b1</sup>	1.04	2.01 <sup>b1</sup>	1.21
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	18.57 <sup>b1</sup>	10.83	10.82 <sup>b1</sup>	1.13
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	5.92 <sup>b1</sup>	1.02	5.85 <sup>b1</sup>	0.94
	Cenizas <sup>g%</sup>	24.35 <sup>a1</sup>	3.60	23.42 <sup>a1</sup>	3.80
	E.L.N. <sup>g%</sup>	48.18 <sup>a1</sup>	13.16	57.89 <sup>b1</sup>	4.53
Sin prácticas	Humedad <sup>g%</sup>	93.28 <sup>c1</sup>	0.38	93.08 <sup>a1</sup>	0.48
	Materia Seca <sup>g%</sup>	6.72 <sup>c1</sup>	0.38	6.92 <sup>a1</sup>	0.48
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	2.25 <sup>b1</sup>	1.65	0.72 <sup>a2</sup>	0.29
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	22.62 <sup>b1</sup>	9.11	8.04 <sup>b2</sup>	3.92
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	4.76 <sup>b1</sup>	1.55	5.61 <sup>b1</sup>	0.97
	Cenizas <sup>g%</sup>	22.22 <sup>a1</sup>	4.74	21.07 <sup>a1</sup>	2.43
	E.L.N. <sup>g%</sup>	47.51 <sup>a1</sup>	13.84	64.17 <sup>b2</sup>	2.36
	Mucílago <sup>g</sup>	1.75 <sup>a1</sup>	0.82	1.41 <sup>a1</sup>	0.20

g% = porcentaje de muestra en gramos, g = gramos

<sup>a, b</sup> = diferencias ( $P < 0.05$ ) dentro de columna

<sup>1,2</sup> = diferencias ( $P < 0.05$  dentro de fila).

La fibra cruda (FC) de *O. ficus-indica* se incrementó ( $P < 0.05$ ) en ambas parcelas y niveles durante el estiaje: 25.13 a 32.90% (Tabla 4). Posiblemente la disminución de humedad del suelo provocó la acumulación de biomasa en esta cactácea; puesto que, la hemicelulosa, componente de FC, se incrementa entre 8 a 16% (Camacho *et al.*, 200). En cuanto al extracto libre de nitrógeno

(ELN), no se observaron diferencias ( $P>0.05$ ) por parcela ni por época, en el 3<sup>er</sup> nivel: 40.82 a 48.18%. Sin embargo, el 4<sup>to</sup> nivel presentó mayor ELN en época de lluvias ( $P<0.05$ ): 57.89 a 64.17% (Tabla 4); valores que concuerdan con Hernández *et al.* (2011): 42.9 a 60.7% de ELN en *O. ficus-indica*.

En relación a la proteína cruda (PC) de *O. ficus-indica*, se encontró menor porcentaje en el 3<sup>er</sup> nivel ( $P<0.05$ ), en la época de estiaje y bajo PCP ( $4.38 \pm 1.07\%$ ) y, el valor máximo se encontró en el 4<sup>to</sup> nivel, en la misma época y parcela (PCP):  $8.34 \pm 0.09\%$ . Hernández *et al.* (2011) sugieren que, la PC en *Opuntia* spp se incrementa en respuesta a la acidez o salinidad de los suelos. Sin embargo, Torres (2010) encontró 5.0% de PC en de *O. ficus-indica*, variedad Redonda y 5.3% en la variedad Gigante. Valores inferiores al obtenido en el 4<sup>to</sup> nivel, pero similares al resto de los resultados obtenidos (Tabla 4). Al respecto, Hernández *et al.* (2011) observaron 8.48% de PC en cladodios tiernos (450 g de Peso<sup>F</sup>).

En lo referente a *O. atropes*, en esta especie la MS no fue afectada por época ( $P> 0.05$ ) en cladodios del 3er nivel (11.7%), más no así para el 4<sup>to</sup> nivel; en éste se encontró mayor MS ( $P<0.05$ ) durante el estiaje:  $13.93 \pm 2.20\%$  (Tabla 5). Sin embargo, estos valores están dentro del rango de las cactáceas (De Andrade *et al.*, 2012, 170). En *O. atropes*, el EE fue mayor ( $P<0.05$ ) en el 3<sup>er</sup> nivel durante las lluvias:  $1.23 \pm 0.59\%$ . En el 4<sup>to</sup> nivel no se encontraron diferencias por época:  $0.53 \pm 0.14$  y  $0.90 \pm 0.60\%$  para estiaje y lluvias, respectivamente (Tabla 5). En *Opuntia* spp se han observado valores entre 0.40% a 1.73% de EE (Valdez *et al.*, 2008; Guzmán y Chávez, 2007).

De acuerdo con la Tabla 5, la FC en *O. atropes* mostró mayores valores ( $P < 0.05$ ) en época de estiaje, pero con variabilidad en el 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> nivel:  $31.32 \pm 2.46$  y  $28.62 \pm 2.72\%$ , respectivamente. Los valores de FC registrados en *Opuntia* spp oscilan entre 7.2 a 22.8% (Baraza *et al.*, 2008). Las

diferencias por época podrían deberse a la relación inversa entre humedad del suelo y FC del cladodio (Camacho *et al.*, 2007, 254). El contenido de ELN fue mayor ( $P < 0.05$ ) en época de lluvias:  $64.95 \pm 4.50\%$  y  $68.29 \pm 5.69\%$ , para 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> nivel, respectivamente (Tabla 5). Valores similares a lo reportado por Kang y Guitari (2009): 58.16 a 68.89% en *Opuntia* spp. Finalmente, no se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) en PC de acuerdo a la época o nivel del cladodio, ésta osciló entre 4.10 a 5.21% (Tabla 5).

Cuando se comparan las especies analizadas, no se encontraron diferencias en PC por especie, época o nivel ( $\leq 5.64\%$ ). En cambio, se observó que, la MS fue mayor en *O. atropes* que en *O. ficus-indica* en ambos niveles durante la época de lluvias ( $P < 0.05$ ) (Tabla 5). En EE no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en época de estiaje entre especies. Sin embargo, en época de lluvias el EE fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el 3<sup>er</sup> nivel de *O. ficus-indica* ( $2.25 \pm 1.65\%$ ) que en *O. atropes* (Tabla 5). La posible explicación de estos resultados, hasta cierto grado, es la madurez del cladodio (Guzmán y Chávez, 2007; Guevara y Suassuna, 2009; Hernández *et al.*, 2011). En relación a FC, los cladodios de *O. ficus-indica* y *O. atropes*, en ambos niveles, fueron iguales en la época de estiaje ( $P > 0.05$ ): 28.62 a 32.90%. Pero en lluvias, *O. atropes* presentó menor FC que *ficus-indica* ( $P < 0.05$ ):  $9.68 \pm 1.08$  y  $6.51 \pm 2.28\%$ , para 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> nivel, respectivamente (Tabla 5). El contenido del ELN fue mayor en atropes en ambas épocas ( $P < 0.05$ ) que en *O. ficus-indica*. Pinos *et al.* (2010), Torres (2011) y De Andrade *et al.* (2012) señalan que, las características bromatológicas de *Opuntia* spp varían de acuerdo a la especie, edad del cladodio, prácticas agronómicas, fertilidad del suelo y época del año.

**Tabla 4.** Características bromatológicas de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* en parcela sin prácticas culturales

Especie	Variable	Época de estiaje			
		$\bar{X}$ Nivel 3	±	$\bar{X}$ Nivel 4	±
<i>O. ficus-indica</i>	Humedad <sup>g%</sup>	89.62 <sup>a1</sup>	0.69	89.95 <sup>a1</sup>	1.07
	Materia Seca <sup>g%</sup>	10.38 <sup>a1</sup>	0.69	10.05 <sup>a1</sup>	1.07
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	0.23 <sup>a1</sup>	0.13	0.57 <sup>a1</sup>	0.03
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	28.80 <sup>a1</sup>	5.04	32.90 <sup>a1</sup>	2.50
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	5.64 <sup>a1</sup>	0.53	5.29 <sup>a1</sup>	0.08
	Cenizas <sup>g%</sup>	24.50 <sup>a1</sup>	2.86	26.55 <sup>a1</sup>	2.27
	E.L.N. <sup>g%</sup>	40.82 <sup>a1</sup>	8.11	35.69 <sup>a1</sup>	0.51
	Mucílago <sup>g</sup>	2.66 <sup>a1</sup>	1.39	2.30 <sup>a1</sup>	0.31
<i>O. atropes</i>	Humedad <sup>g%</sup>	88.85 <sup>a1</sup>	1.06	86.07 <sup>b2</sup>	2.20
	Materia Seca <sup>g%</sup>	11.15 <sup>a1</sup>	1.06	13.93 <sup>b2</sup>	2.20
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	0.17 <sup>a1</sup>	0.03	0.53 <sup>a1</sup>	0.14
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	31.32 <sup>a1</sup>	2.46	28.62 <sup>a1</sup>	2.72
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	4.70 <sup>a1</sup>	0.40	5.21 <sup>a1</sup>	0.11
	Cenizas <sup>g%</sup>	21.70 <sup>a1</sup>	4.73	14.07 <sup>b2</sup>	1.42
	E.L.N. <sup>g%</sup>	42.18 <sup>a1</sup>	3.54	51.58 <sup>b2</sup>	3.90
	Mucílago <sup>g</sup>	3.96 <sup>b1</sup>	0.54	3.78 <sup>b1</sup>	0.88
<i>O. ficus-indica</i>	Humedad <sup>g%</sup>	93.28 <sup>b1</sup>	0.38	93.08 <sup>c1</sup>	0.48
	Materia Seca <sup>g%</sup>	6.72 <sup>b1</sup>	0.38	6.92 <sup>c1</sup>	0.48
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	2.25 <sup>b1</sup>	1.65	0.72 <sup>a2</sup>	0.29
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	22.62 <sup>b1</sup>	9.11	8.04 <sup>b2</sup>	3.92
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	4.76 <sup>a1</sup>	1.55	5.61 <sup>a1</sup>	0.97
	Cenizas <sup>g%</sup>	22.22 <sup>a1</sup>	4.74	21.07 <sup>a1</sup>	2.43
	E.L.N. <sup>g%</sup>	47.51 <sup>c1</sup>	13.84	64.17 <sup>c2</sup>	2.36
	Mucílago <sup>g</sup>	1.75 <sup>a1</sup>	0.82	1.41 <sup>a1</sup>	0.20
<i>O. atropes</i>	Humedad <sup>g%</sup>	88.26 <sup>a1</sup>	1.96	88.72 <sup>a1</sup>	1.22
	Materia Seca <sup>g%</sup>	11.74 <sup>a1</sup>	1.96	11.28 <sup>a1</sup>	1.22
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	1.23 <sup>c1</sup>	0.59	0.90 <sup>a1</sup>	0.66
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	9.68 <sup>c1</sup>	1.08	6.51 <sup>b1</sup>	2.28
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	4.10 <sup>a1</sup>	1.26	4.33 <sup>a1</sup>	1.00
	Cenizas <sup>g%</sup>	20.05 <sup>a1</sup>	4.82	19.96 <sup>a1</sup>	5.14
	E.L.N. <sup>g%</sup>	64.95 <sup>c1</sup>	4.50	68.29 <sup>c1</sup>	5.69
	Mucílago <sup>g</sup>	3.24 <sup>b1</sup>	1.12	2.77 <sup>b1</sup>	0.77

g% = porcentaje de muestra en gramos, g = gramos

<sup>a,b</sup> = diferencias ( $P < 0.05$ ) dentro de columna

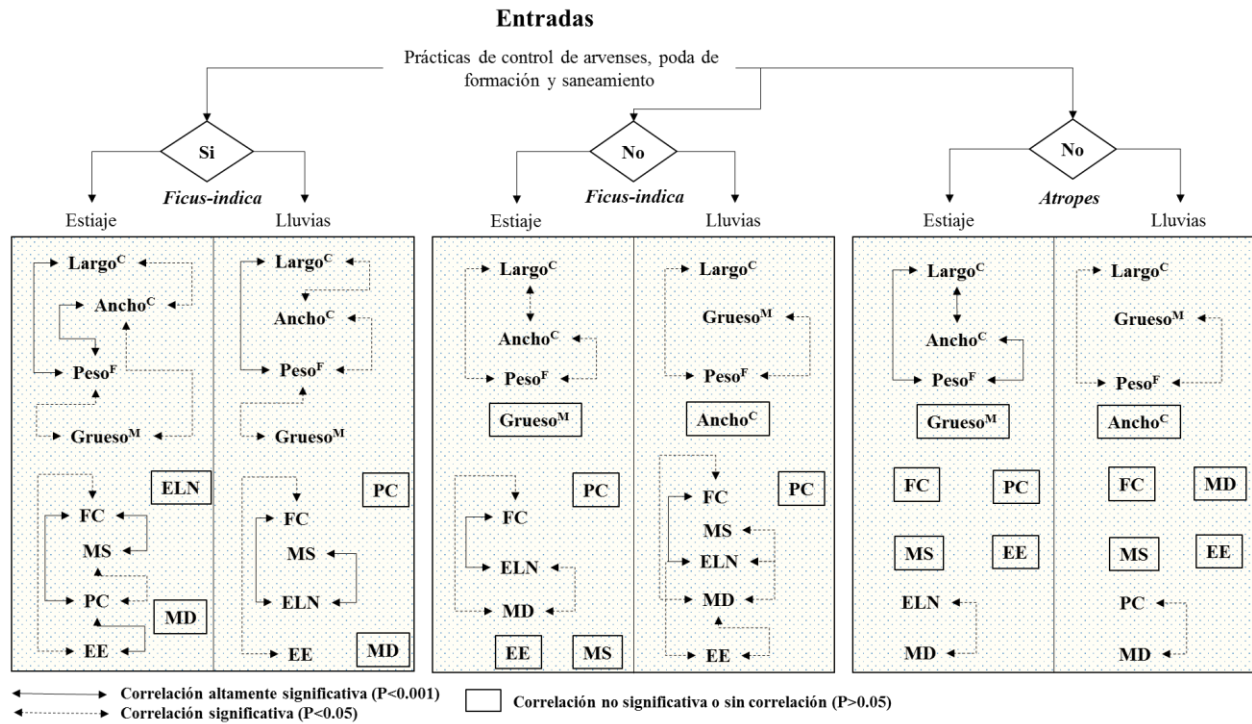
<sup>1,2</sup> = diferencias ( $P < 0.05$ ) dentro de fila.

En lo que respecta a la producción de mucilago deshidratado (MD), *O. atropes* produjo entre 2.77 y 3.96 g de MD a partir de 300 g de Peso<sup>F</sup>. Producción mayor ( $P < 0.05$ ) a *O. ficus-indica*: 2.66 g

(Tabla 5). Rodríguez (2010), encontró en *O. ficus-indica* 1.08 g de MD a partir de 200 g de Peso<sup>F</sup>; lo que equivale a 1.62 g por ajuste de 200 a 300 g de Peso<sup>F</sup>. Sin embargo, la cantidad de MD depende de: la edad del nopal (cladodio), proceso de extracción, pérdidas en la molienda o centrifugación (Rodríguez, 2010).

Finalmente, la reformulación del modelo esquemático (*caja negra*) para el establecimiento del comportamiento morfológico y bromatológico de *O. ficus-indica* y *O. atropes*, por efecto de época y de parcela, permitió establecer que, las dimensiones de los cladodios de *O. ficus-indica*, durante el estiaje y bajo prácticas culturales se expresan mejor: existe mayor número de asociaciones ( $P < 0.05$ ) entre largo, ancho y grueso con el Peso<sup>F</sup>, en comparación con PSP, en la misma época: en ésta, el Grosor<sup>M</sup> no se correlaciona ( $P > 0.05$ ) con el resto de las dimensiones analizadas (Figura 2). Sin embargo, en época de lluvias y bajo PCP, el Grosor<sup>M</sup> de los cladodios de *O. ficus-indica* se correlaciona ( $P < 0.05$ ) con el Peso<sup>F</sup>, pero no se asocia con el Ancho<sup>C</sup> ( $P > 0.05$ ). En PSP y en la misma época, ocurre algo similar; el Ancho<sup>C</sup> no se correlaciona ( $P > 0.05$ ) con el resto de las dimensiones analizadas ni con el Peso<sup>F</sup> (Figura 2).

Para el caso de *O. atropes*, analizada únicamente en PSP, se puede observar que, en la época de estiaje presenta un comportamiento similar al *O. ficus-indica* bajo PSP: asociación del Peso<sup>F</sup> con Ancho<sup>C</sup> y Largo<sup>C</sup>; mientras que, Grosor<sup>M</sup> no se correlaciona con ningún indicador morfológico. En la época de lluvias, atropes presenta el mismo comportamiento que *O. ficus-indica* cultivada en PSP: el Ancho<sup>C</sup> no se correlaciona ( $P > 0.05$ ) con el resto de las dimensiones analizadas, ni con el Peso<sup>F</sup> (Figura 2).



**Figura 2.** Reformulación de la *caja negra* para la modelación esquemática del efecto de época de año y de prácticas culturales sobre las dimensiones morfológicas y bromatológicas del cladodio de *O. ficus-indica* y *O. atropes*.

El modelo esquemático sugieren que, tanto *O. ficus-indica* como *O. atropes* presentan un mayor equilibrio entre sus dimensiones morfológicas y el  $\text{Peso}^F$  en la época de estiaje. Aunque si bien, esto fue más evidente para *O. ficus-indica* cultivada en PCP. Para el caso de la época de lluvias y en parcela sin prácticas culturales (PSP), tanto *O. ficus-indica* como *O. atropes* manifiestan desequilibrio entre el  $\text{Peso}^F$  del cladodio y sus dimensiones morfológicas. Fenómeno que, pudo deberse a exceso de humedad; puesto que, el ambiente natural donde se desarrolla *Opuntia* spp es árido o semiárido (Lozano, 2011) y, la disminución de humedad en la parcela mejora su productividad (Camacho *et al.*, 2007). Vázquez *et al.* (2007) determinaron que, el crecimiento es un proceso relacionado al incremento de tamaño (largo, ancho y grueso) unido al incremento de  $\text{Peso}^F$  y, la ausencia de exceso de agua mejora los procesos de crecimiento del nopal (Nobel 2002). Mientras que, Mondragón *et al.* (2003) sugieren que, el peso del cladodio de *Opuntia* spp

se afecta por la competencia de las arvenses por la humedad, materia orgánica y nitrógeno. Aspectos que pudieran explicar el desequilibrio entre el Peso<sup>F</sup> y las dimensiones morfológicas de los cladodios analizados en PSP (Figura 2).

En cuanto al comportamiento de los indicadores bromatológicos de *O. ficus-indica* y *O. atropes*, de acuerdo al modelo esquemático (Figura 2), se puede observar que, la cantidad de MD y ELN presentes en *O. ficus-indica* bajo PCP y durante el estiaje, no se correlacionan ( $P > 0.05$ ) entre ellas, ni con el resto de los indicadores bromatológicos analizados. No obstante, la PC se asocia ( $P < 0.05$ ) con MS y FC ( $P < 0.001$ ). Sin embargo, cuando *O. ficus-indica* se encuentra en PSP y en el estiaje, PC y MS no se correlacionan ( $P > 0.05$ ) entre ellas, ni con el resto de los indicadores analizados. En la época de lluvias, el comportamiento de *O. ficus-indica* cambia: PC y MD, no presentan asociación ( $P > 0.05$ ) entre ellas, ni con el resto de los indicadores analizados en PCP. Sin embargo, el comportamiento mejora en PSP, pues solamente la PC no se correlaciona ( $P > 0.05$ ) con el resto de las variables bromatológicas analizadas en esta época (Figura 2).

De acuerdo con el modelo esquemático (Figura 2) parece que, *O. ficus-indica* bajo PSP y en época de lluvias muestra cierto grado de estrés; puesto que, existe menor integración entre los indicadores bromatológicos: la PC no se asocia ( $P < 0.05$ ) con el resto de indicadores analizados. Blanco y Leyva (2007) establecen que las arvenses son un fuerte competidor para las plantas por la humedad y nutrientes del suelo. Por lo que, posiblemente *Opuntia* spp al ser nativa de regiones con poca precipitación pluvial (Lozano, 2011) se estrese al cultivarse en terrenos donde exista poco drenaje y el exceso de humedad provoque que el desequilibrio entre los indicadores bromatológicos.

En relación a *O. atropes*, se observa un cambio en las asociaciones entre los indicadores bromatológicos de una época a otra: en el estiaje, PC, MS, FC y EE no se correlacionaron ( $P > 0.05$ ) entre ellas, ni con los otros indicadores bromatológicos; únicamente se asociaron ELN y MD ( $P < 0.05$ ). En época de lluvias, MS, FC, ELN y EE no se correlacionan ( $P < 0.05$ ), sólo PC y MD se asocian ( $P < 0.05$ ) entre ellas (Figura 2). Este comportamiento sugiere que, las arvenses compiten por nutrientes (Blanco y Leyva, 2007, 21) con *O. atropes* y *O. ficus-indica*, durante el estiaje. Pero, en la época de lluvias, tanto *O. atropes* como *O. ficus-indica* son afectadas por exceso de humedad reflejándose en la pérdida de relación entre sus indicadores bromatológicos (Esquema 2).

## CONCLUSIONES

En *O. ficus indica*, el peso fresco del cladodio disminuye con las prácticas culturales y esto se acentúa durante época de lluvias. Mientras que, el ancho, largo y grosor del cladodio se modifica de acuerdo a la época del año; en estiaje, se incrementa el largo y, en lluvias, el ancho se incrementa. Pero, en esta especie, el contenido de grasa y carbohidratos se incrementa durante la época de lluvias, con o sin prácticas culturales y, disminuye fibra cruda. Finalmente, la proteína cruda y la materia seca no se modifican por efecto de época de año o por presencia o ausencia de prácticas culturales. Aspecto que sigue siendo una limitante en la alimentación animal.

*O. atropes*, presenta características morfológicas de menor magnitud que *O. ficus-indica*, pero sus características nutricionales son similares a esta, en ambas épocas del año. Sin embargo, presenta serias dificultades para adaptarse a terrenos de cultivo (parcela), tal como lo demuestra la desvinculación entre sus indicadores bromatológicos en ambas épocas del año. No obstante, *O. atropes* es apta para complementar las dietas de bovinos en cualquier época del año, de acuerdo a sus características bromatológicas, más que morfológicas.

## LITERATURA CITADA

- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. EUA.
- Baraza, R.E., Campos, S.A., García, P.A. y Valiente, B.A. (2008). Nuevos recursos naturales como complemento de la dieta de caprinos durante la época seca, en el Valle de Tehuacán, México. Asociación Interciencia Venezuela, 33(12): 891-896.
- Blanco, Y., y Leyva, A. (2007). Las arvenses en el agroecosistema y sus beneficios agroecológicos como hospederas de enemigos naturales. Cultivos Tropicales, 28(2): 21-28.
- Camacho O.C., Peña, V.C.B. y Sánchez, U.A.B. (2007). Efecto del potencial hídrico del suelo en el crecimiento y contenido de polisacáridos estructurales de nopalito (*Opuntia* spp.) Rev. Fav. Agron. (LUZ). 24 (1): 254-259.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2008). Catalogo de Metadatos Geográficos. México. Disponible en internet: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> (18 de marzo de 2014).
- De Andrade, F.M., Bispo, S.V., Rocha, F.R.R., Urbano, S.A., y Costa, C.T.F. (2012). The use of cactus as forage for dairy cows in semi-arid regions of Brazil. Organic Farming and Food Production. 169- 189.
- Doportó, A.R.A. (2014). Arvense en una plantación de eucalipto (*Eucalyptus pellita* F. Muell) en Huimanguillo, Tabasco, México. Tesis como requisito para obtener el grado de Maestro en ciencias. Colegio de postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. H. Cárdenas, Tabasco, México. 1- 6.
- Esquivel, P. y Araya, Q.Y. (2012). Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria. Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 3 (1): 113-129.
- Gebremeskel, G., Getachew A. and Firew T. 2013: Assessment of the potential of cactus pear (*Opuntia ficus indica*) as livestock feed in Northern Ethiopia. Livestock Research for Rural Development. 25, 1-17,
- González, C.F., Llamas L.G. y Bonilla, A.J. (1999). Utilización del nopal como sustituto parcial de alfalfa en dietas para vacas lecheras. Tec. Pecuaria en México. 36:73-81.
- Guevara, J. C., Suassuna, P. and Felker, P. (2009). *Opuntia* Forage Production Systems: Status and Prospects for Rangeland. Rangel and Ecology & Management. 62(5): 428-434.
- Guzmán, L.C. y Chávez, J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. Rev Soc Quím Perú. 73 (1): 41-45.

- 
- Hernández M., Terrazas T., Delgado, A.A. y Luna, C.M. (2007). Los estomas de *Myrtillocactus geometrizans* (Mart. Ex. Pfeiff.) console (Cactaceae): variación en su área de distribución. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 235-240.
- Hernández, U.M.I., Pérez, T.E., y Rodríguez, G.M.E. (2011). Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus-indica*) at varied ages in an organic harvest. *International journal of environmental research and public health*. 8(5): 1287-1295.
- Juárez, C. A., Ortiz, R.R, Pérez, S.R.E., Gutiérrez, V.E. y Val, A.D. (2008). Caracterización y modelación del sistema de producción avícola familiar. *Livestock Research for Rural Development*. 20 (25), 2 10.
- Kang'ara, J.N.N. and Gitari, J.N. (2009). Exploiting fodder potentials of Cactus (*Opuntia* spp) in Kenya for pastoral livestock feeding under a changing climate. 2-5.
- Littell, C.R., Milliken, A.G., Stroup, W.W., Wolfinger, D.R., Schabenberger, O. (2006). SAS® for Mixed Models. Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA. 733-735.
- Littell, C.R., Stroup, W.W., Freund, J.R. (2002). SAS® for Linear Models, Fourth Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA. 191-194.
- López, A.S., Nuño, R.R. y Torres, M.M.I. (2008). Prueba de significancia de tres métodos para calcular el área de cladodios en plantas de nopal para verdura. *Avances en la investigación científica*. Centro universitario de ciencias biológicas y agropecuarias (CUCBA-UDG). Zapopan, Jalisco, México. 49- 55.
- Lozano, L. (2011). Ecofisiología de la tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). *Horticultura Argentina*. Universidad Nacional de Salta. 30(72): 37-52.
- Mondragón, J.C., Méndez, G.S. De J. y Olmos O.G., (2003). El cultivo de *Opuntia* para la producción de forraje: de la reforestación al cultivo hidropónico. In: Mondragón, J.C. y Pérez, G.S. (Eds.), *Estudio FAO-Producción y Protección Vegetal*. Food & Agriculture Org. (FAO). Roma, Italia., 169. 129-146.
- Moreno, G.A., Herrera, A.G., Carrión, G.M., Álvarez, B.D., Pérez, S.R.E. y Ortiz, R.R. (2012). Caracterización y modelación esquemática de un sistema familiar de bovinos productores de leche en la Ciénega de Chapala, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 20(3-4):85-94.
- Muñoz, U.A., Palomino, H.G., Terrazas, T., García, V.A. y Pimienta, B.E. (2008). Variación anatómica y morfológica en especies y entre poblaciones de *Opuntia* en la porción sur del desierto chihuahuense. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (83): 1-11.

- Nerd, A., Sitrit, Y., Kaushik, R. A. y Mizrahi, Y. (2002). High summer temperatures inhibit flowering in vine pitaya crops (*Hylocereus* spp.). *Scientia Horticulturae*, 96(1): 343-350.
- Nobel, P. S. (Ed.). (2002). *Cacti: biology and uses*. Univ of California Press. 57-74.
- Ortiz, R.R., Valdez, A.J.J., Gómez, R.B., López, M.J., Chávez, M.M.P., García, S.P.A., Pérez, S.R.E. (2012). Yield and microbiological quality of raw milk and fresh cheese obtained from Holstein cows receiving a diet supplemented with nopal (*Opuntia ficus-indica*). *African Journal of Microbiology Research*. 6: 3409-3414.
- Palacios, R.M.P. (2010). Efectos del cambio climático sobre la distribución de nopales (género *Opuntia* y *Nopalea*: Cactaceae) en la región central de México. Tesis para obtener el título de; Maestra en ciencias biológicas (biología ambiental). Universidad autónoma de México. Instituto de biología. México. D.F. 8-15.
- Pinos, R.J.M., Velázquez, J.C., González, S.S., Aguirre, J.R., García, J.C., Álvarez, G., y Jasso, Y. (2010). Effects of cladode age on biomass yield and nutritional value of intensively produced spineless cactus for ruminants. *South African Journal of Animal Science*, 40(3): 245-250.
- Reveles, H.M. y Flores, O.M. (2010). Producción de nopal forrajero de diferentes variedades y densidades de plantación. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er. Internacional de "Producción y Aprovechamiento del Nopal. Escobedo, N.L. México. Noviembre 2010. *Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial. No. 5:130-210.*
- Reyes, A.J.A., Aguirre, R.J.R. y Flores, F.J.L. (2005). Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia*. 30: 476-484.
- Rodríguez, G.S. (2010). Efecto de la incorporación de mucílago de nopal sobre las propiedades sensoriales y texturales de una pasta a base de huitlacoche *Ustilago maydis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-Facultad de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán. México. 34-54.
- Sáenz, C. (2006). Características y composición química de los nopales. Utilización agroindustrial del nopal. *In: Utilización Agroindustrial del Nopal*. Rosell, C. (ed). Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas. Food & Agriculture Org. (FAO). Roma, Italia. 162: 7 – 22.
- SAS Institute Inc. 2010. Correlation of Pearson. In Chapter 2. The CORR Procedure. Base SAS® 9.2 Procedures Guide: Statistical Procedures, Third Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc. pp. 3 – 59.
- Torres, S.A. (2011). Composición química del nopal y sus implicaciones en la nutrición de rumiantes (experiencias de Brasil). VIII Simposium-Taller Nacional y 1er.

Internacional de “Producción y Aprovechamiento del Nopal. Escobedo, N.L. México. Noviembre 2010. Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial, 5: 143-151.

Valdez, C.R.D., Blanco, M.F., Vázquez, A.R.E. y Magallanes, Q.R. (2008). Producción y usos del nopal para verdura. Revista Salud Pública y Nutrición. 14: 1-19.

Vázquez, A.R.E., Valdez, C.R., Gutiérrez, O.E. y Blanco, M.F. (2008). Caracterización e identificación de nopal forrajero en el noreste de México. Revista Salud Pública y Nutrición. 14: 21-36.

Vázquez, V.C., Zúñiga, T.R., Orona, C.I., Murillo, A.B., Salazar, S.E., Vázquez, A.R., García, H.J.L., Troyo, D.E. (2007). Root Growth Rate Analysis in Four *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Varieties. Journal of the Professional Association for Cactus Development. 9: 82-90.

Wadsworth J. (1997). Análisis de sistemas de producción animal: las herramientas básicas. Estudio FAO Producción y sanidad animal 140/2. pp. 1 - 13. <http://www.fao.org/docrep/w7452s/w7452s00.htm> (15 de marzo del 2014).

Zimmermann, H.G., Bloem, S. y H. Klein. (2007). Biología, historia, amenaza, monitoreo y control de la palomilla del nopal, *Cactoblastis cactorum*. IAEA. pp. 96.

---

**Efecto de la adición de extractos de cladodios y epidermis de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* a leche cruda bovina sobre bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales**

**RESUMEN**

Se evaluó el efecto de extractos metanólicos (EM) de cladodio y epidermis de *Opuntia ficus-indica* (OFI) y *O. atropes* (OA) sobre la microbiología de leche cruda (LC). Los EM de OFI y OA fueron obtenidos por maceración. Los EM de cada especie se adicionaron a LC (5 repeticiones tratamiento<sup>-1</sup>). El análisis microbiológico de LC fue 2 h posterior a la adición de los EM. Las UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT) en LC, con EM, se redujeron ( $p < 0.05$ ) en comparación al testigo:  $\leq 3.1 \times 10^5$  y  $1.5 \times 10^6$  de BMA, en LC con y sin EM, respectivamente y,  $\leq 1.9 \times 10^5$  y  $1.2 \times 10^6$  de CT, en LC con y sin EM, respectivamente. La adición de EM a LC logró el estándar de calidad para BMA; más no, para CT. La adición de EM de OFI y OA a LC reducen las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT y mejora la calidad microbiológica de ésta.

**Palabras clave:** calidad de leche, *Opuntia spp.*, metabolitos secundarios, extractos polares.

**ABSTRACT**

The aim of this research was to evaluate the effect of methanolic extracts (ME) from complete cladodes and cladode epidermis of *Opuntia ficus-indica* (OFI) and *O. atropes* (OA) on bovine raw milk microbiology (RM). The ME of OFI and OA were performed by maceration. The EM specie<sup>-1</sup> added at RM (5 repetitions per treatment<sup>-1</sup>). RM microbiological analysis were two hours after ME addition. The UFC mL<sup>-1</sup> of aerobic mesophilic bacteria (AMB) and total coliforms (TC) in RM, decreased ( $p < 0.05$ ) in comparison to the control;  $\leq 3.1 \times 10^5$  and  $1.5 \times 10^6$  of AMB,

and,  $\leq 1.9 \times 10^5$  and  $1.2 \times 10^6$  of TC, for RM with and without ME, respectively. The addition of ME to RM achieved Mexican quality standards for AMB; but not for TC. However both species reduced AMB and TC UFL mL<sup>-1</sup> counts improving microbiological quality of RM.

**Key words:** quality of milk, *Opuntia spp.*, secondary metabolites, polar extracts.

## INTRODUCCIÓN

La leche de bovinos (*Bos Taurus*) es recomendada dentro de la alimentación humana por la Organización de la Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura (Muehlhoff *et al.*, 2013), puesto que es un alimento nutritivo. Sin embargo, la leche también es un medio para el crecimiento de microorganismos patógenos y, el crecimiento de estos microorganismos hacen de la leche un vector de enfermedades para el consumidor (Muehlhoff *et al.*, 2013). Dada estas características de la leche, su producción se encuentra dentro de las estrategias de seguridad alimentaria y bajo normas de calidad en muchos países (Fuentes *et al.*, 2013), incluido México. En el país existen Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que establecen las especificaciones sanitarias y nutrimentales que debe cumplir la leche para que se considere apta para consumo humano (NOM-243-SSA1-2010). Sin embargo, debido a la idiosincrasia, economía y escasa tecnología presentes en las zonas rurales del país, la producción de leche y elaboración de subproductos lácteos se comercializan sin tener en cuenta los riesgos de salud pública que puedan generar (Moreno *et al.*, 2012).

En México la producción de leche de bovinos se acerca a los 12 millones de litros/año, de esta producción la ganadería a escala familiar aporta el 9.4% de la producción nacional (3.000 kg cabeza<sup>-1</sup> año) (Vera *et al.*, 2009, SIAP 2011) y abastece el 50% de las queserías de tipo artesanal (Garcés *et al.*, 2005). No obstante, en este tipo de sistemas (familiar) la producción de leche y elaboración de derivados se realiza bajo escasa tecnificación y prácticas de higiene (Moreno *et*

al., 2012, Arriaga *et al.*, 2013), representando el principal riesgo hacia la salud del consumidor; puesto que la leche obtenida en este tipo de sistemas y sus derivados artesanales se utilizan para venta o autoconsumo (Rojas *et al.*, 2014). Además, a este tipo de productores les resulta inviable la inversión de un tanque enfriador o cubrir los costos que genera enfriar y en el proceso de pasteurización de la leche (Muehlhoff *et al.*, 2013). Tal vez por ello, en México, es común utilizar la leche cruda sin refrigeración o pasteurización para el consumo o la elaboración de subproductos lácteos (Rojas *et al.*, 2014).

Bajo problemas económicos, tecnológicos y productivos de los productores a escala familiar es difícil que se ejerzan las NOM establecidas para la producción y consumo de la leche y sus derivados. Por ello, es necesario establecer estrategias que coadyuven a reducir la contaminación bacteriana de la leche y sus subproductos y acercar a este tipo de productores a los estándares de calidad que exigen las NOM para que deje de ser un riesgo a la salud pública. Se ha establecido que los frutos y cladodios de *O. ficus-indica* contienen fitoquímicos con propiedades funcionales (Stintzing y Carle, 2005; Livrea y Tesoriere, 2006), como los fenoles (Scalbert *et al.*, 2005), los cuales, están considerados como componentes antimicrobianos en plantas (Marzieh y Seyed, 2012) y, fungen como parte de la resistencia al ataque de patógenos a las plantas (Daglia, 2012). Además, se ha demostrado que dichas moléculas, tienen funciones biológicas como por ejemplo, antioxidantes, antivirales, antibacteriana (bactericida y bacteriostático) (Kahdem y Marles, 2010).

La cantidad y tipo de fenoles totales en extractos de plantas pueden estar afectados por diversos aspectos tales como: edad de la planta, genotipo y características bromatológicas (Koolen *et al.*, 2013). En relación a estas últimas se ha determinado que tanto la proteína como la materia seca pueden afectar la cantidad de fenoles totales en los extractos de las plantas (Giletto *et al.*, 2013) y modificar su eficacia como bactericidas o bacteriostáticos. Al respecto, se ha documentado que al implementar el nopal (*Opuntia* spp.) en la dieta de bovinos productores de leche (12 kg d<sup>-1</sup> de *O.*

---

*ficus-indica* cabeza<sup>-1</sup> más alimento convencional) se incrementa la producción láctea, mejora la calidad organoléptica y bacteriológica de leche cruda y queso fresco (Pérez *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2012). Posiblemente estas mejoras en la leche se deban a que el nopal posee propiedades bacteriostáticas, puesto que disminuye el promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT) en leche cruda, derivada de vacas alimentadas con una dieta complementada con nopal (Ortiz *et al.*, 2011).

El efecto de la dieta complementada con nopal sobre cuentas bacterianas en leche cruda también se ha observado cuando se adiciona directamente a la leche cruda el nopal. Al respecto, Ortiz *et al.*, (2013), al evaluar el efecto de la adición directa de nopal molido, mucílago, y epidermis de nopal (en porcentajes de 0.5, 1.0 y 2% con base a 100 mL de leche) a la leche cruda, sobre las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT, encontraron una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) de UFC mL<sup>-1</sup> para dichas bacterias dos horas después de la adición directa de nopal (*O. ficus-indica*) a la leche cruda, ello en comparación con el testigo (leche cruda sin adición de nopal). Resultados importantes dentro de la seguridad alimentaria y la problemática de salud pública que enfrentan los pequeños productores de ganado lechero, tanto para los posibles consumidores de leche y queso fresco, como para la familia del productor cuando implementan el autoconsumo de leche y sus subproductos. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de extractos metanólicos de cladodio y epidermis de cladodio de *O. ficus indica* y *O. atropes* sobre la microbiología de leche cruda bovina. Debido a que se ha comprobado que los factores agroclimáticos y prácticas culturales influyen en la producción de metabolitos secundarios de las plantas por esto fue el interés de evaluar los cladodios de dichas especies provenientes de dos parcelas diferentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de cladodios de nopal se obtuvieron en Morelia Michoacán México, pertenecían a las especies *O. ficus-indica* y *O. atropes*. Mismas que se encontraban en dos parcelas con manejo diferente: en la primera parcela o parcela con prácticas culturales (PCP), se cultivaba *O. ficus-indica*; las prácticas culturales, en esta parcela, fueron: control de arvenses, poda de formación y saneamiento. En la segunda parcela o parcela sin prácticas culturales (PSP), se cultivaban *O. atropes* y *O. ficus-indica*. La colecta de los cladodios se realizó durante el mes de marzo. El clima de la región es templado, sub-húmedo, que corresponde a la clasificación Cw (García, 1998); con temperatura media anual entre 18.6°C y precipitación de 786 mm (INEGI, 2010).

Las muestras de cladodios para la extracción de fenoles totales fueron del cuarto nivel, de acuerdo a lo establecido por Santos *et al.* (1990): 0 a la base del nopal, 1 al primer cladodio (del suelo hacia arriba) y así sucesivamente. De cada especie en cada parcela se identificó una planta para obtener una muestra de cladodio al azar por planta y se formaron tres grupos de muestras (cladodios): grupo 1 (27 cladodios de *O. ficus-indica* en PCP), grupo 2 (17 cladodios de *O. ficus-indica* en PSP) y grupo 3 (29 cladodios de *O. atropes* en PSP). De cada grupo se recolectaron 5 cladodios del tercer nivel para el análisis bromatológico de cladodios de ambos niveles. Se identificaron y recolectaron en total 83 cladodios. Cada cladodio se identificó y midió el largo con una cinta métrica (cm).

Obtenidas las dimensiones morfológicas por cladodio, se realizaron los análisis bromatológicos correspondientes, bajo la metodología descrita por la AOAC (1991). Se determinó: materia seca (MS), humedad (H), proteína cruda (PC), fibra cruda (FC), extracto etéreo (EE), cenizas (C) y extracto libre de nitrógeno (ELN). Además, se estimó la producción de mucílago deshidratado

(MD)/especie/parcela/época; a partir de muestras de 300 g de materia fresca. El MD se obtuvo mediante la metodología modificada por Rodríguez (2010, 17).

### **MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Posterior al lavado de los cladodios, la mitad de muestras del cuarto nivel (cladodios) de cada grupo se cortó en trozos de 2 cm<sup>3</sup> para obtener de estos los extractos de cladodios. Del resto de cladodios del cuarto nivel, se retiró la epidermis con un pelador manual. Los trozos de cladodios y de epidermis se deshidrataron a 40°C por 72 y 24 h respectivamente. Deshidratadas las muestras se molieron en mortero de porcelana hasta obtener polvo para mezclar este y homogenizar de acuerdo al tipo de muestra (cladodio o epidermis) y grupo de muestra (especie y tipo de parcela), así se almacenó a - 4°C en oscuridad. Los extractos se obtuvieron por el método de maceración con extracciones sucesivas utilizando n-hexano, cloroformo y metanol, en este orden de acuerdo a la metodología descrita por Raaman (2006). Se utilizaron 5 g de muestra (cladodio o epidermis de cladodio/grupo) para macerar con 50 mL de cada solvente en agitación orbital (Thermo Scientific MaxQ), durante tres días a temperatura ambiente (25°C). Entre cada cambio de solvente el extracto se filtró para almacenarlo en oscuridad a - 4°C y la muestra se maceró con el solvente siguiente (Raaman, 2006). La extracción se realizó con 3 repeticiones por grupo.

### **CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES**

Los compuestos fenólicos totales (FT) se cuantificaron únicamente en los extractos metanólicos. La mezcla de reacción consistió en: 550 µL de agua destilada; 50 µL de extracto y 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (FC; Sigma Aldrich®). 8 min después de iniciada la reacción de oxidación, se agregaron 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para dejar reposar por 15 min a temperatura

ambiente. Transcurrido este tiempo, se tomó la lectura de absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis Nanodrop 2000C<sup>®</sup>), con su respectivo blanco (Makkar, 2000).

Para la determinación de los valores de FT, en extractos, se construyó una recta de ácido gálico (AG) partiendo de una solución con 0.5  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de AG, de la cual, se tomaron volúmenes de 5 a 350  $\mu\text{L}$  con intervalos de 10  $\mu\text{L}$ , añadiendo agua destilada necesaria para alcanzar los 600  $\mu\text{L}$  y reactivos (100  $\mu\text{L}$  de FC y 300  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Cada volumen se midió con 6 repeticiones. Los valores se midieron en  $\mu\text{g}$  equivalentes a ácido gálico (EAG)  $\mu\text{L}^{-1}$  ello de acuerdo con Makkar, (2000), para ello, se estimó el valor  $\mu\text{g EAG } \mu\text{L}^{-1}$  con base a los promedios de absorbancia por volumen analizado. Esto se realizó por medio de los estimadores de la regresión lineal (SAS, 2008); donde  $\beta_0$  fue igual a 0.359 ( $P < 0.001$ ) y  $\beta_1$  fue de 20.081 ( $P < 0.001$ ), lo que significó que por cada unidad de absorbancia (nm) se incrementa en 20.081  $\mu\text{g EAG}$ . Los valores obtenidos se expresaron como  $\text{mg EAG}/100 \text{ g}^{-1}$  de peso seco (PS).

### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LECHE CRUDA BOVINA

Se utilizaron 3,500 mL de leche cruda (LC) recién ordeñada y almacenada en un tanque frío de 500 lts, misma que fue depositada en un recipiente hermético estéril para transportarla a 4 °C, tal como lo marca la NOM (NOM-SSA-109-1994). Del total de LC obtenida se formaron siete grupos de tratamientos, cada uno con 5 muestras por grupo (100 mL de leche cruda/muestra). Los grupos fueron; grupo 1) testigo; LC sin extracto, grupo 2) LC con extractos de cladodios de *O. ficus-indica* en PCP, grupo 3) LC con extractos de cladodios de *O. ficus-indica* en PSP, grupo 4) LC con extractos de cladodios de *O. atropes* en PSP, grupo 5) LC con extractos de epidermis de cladodios de *O. ficus-indica* en PCP, grupo 6) LC con extractos de epidermis de cladodios de *O. ficus-indica* en PSP y grupo 7) LC con extractos de epidermis de cladodios de *O. atropes* en PSP.

La adición de extractos metanólicos a LC, se realizó en igual dosis de FT; 1390 µg EAG/µL por muestra, para ello y para retirar el metanol, se concentró el volumen de extracto suficiente con base en los valores de FT encontrado en cada grupo (Tabla 2), en un evaporador giratorio acoplado a una bomba de vacío hasta obtener una completa sequedad del extracto esto de acuerdo a la metodología descrita por Tolosa y Cañizares (2002). el extracto concentrado se disolvió en 4 mL de agua destilada estéril. A cada muestra de LC de 100 mL, se le adicionó directamente la dosis de extracto diluido en agua (1390 µg/4 mL). Todas las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente (25°C) por 2 h.

El análisis microbiológico de las muestras se realizó bajo los criterios de las NOM: NOM-110-SSA1 (1994), NOM-113-SSA1 (1994) y NOM-092-SSA1-1994, 2 h post-tratamiento de la LC con extractos. El conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) mL<sup>-1</sup>, tanto para CT como para BMA, se realizó a las 24 y 48 h.

Con la información recabada se elaboró una base de datos para su análisis estadístico, previa transformación de los valores a log<sub>10</sub>, a través de la metodología de los Modelos lineales generalizados (GLM, siglas en inglés) (SAS, 2000) y las diferencias estadísticas entre grupos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (Lsmeans, siglas en inglés) (SAS, 2000).

## RESULTADOS

El análisis bromatológico de los cladodios de *O. ficus-indica* y *O. atropes* y la comparación entre estas especies determinaron que la MS fue mayor ( $P < 0.05$ ) en *O. atropes* que en *O. ficus-indica* en ambos niveles (Tabla 1). Para el extracto etéreo (EE), se encontró que éste fue mayor ( $P < 0.05$ ) en cladodios del 3<sup>er</sup> nivel de *O. ficus-indica* y *O. atropes* comparados con los cladodios de 4<sup>to</sup> nivel dentro de la misma especie (Tabla 1). No obstante, *O. ficus-indica* mostró mayor ( $P <$

0.05) concentración de EE que *O. atropes*. En relación a fibra cruda (FC), los cladodios de *O. atropes* presentaron menor FC ( $9.68 \pm 1.08$  y  $6.51 \pm 2.28\%$ , para 3<sup>er</sup> y 4<sup>to</sup> nivel, respectivamente) que *O. ficus-indica* ( $P < 0.05$ ). El contenido del ELN fue mayor en *O. atropes* ( $P < 0.05$ ) que en *O. ficus-indica*. En lo que respecta a la producción de mucílago deshidratado (MD), *O. atropes* produjo entre 2.77 y 3.96 g de MD a partir de 300 g de peso fresco (PF).

**Tabla 1.** Características bromatológicas de cladodios de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* en parcela sin prácticas culturales.

Especie	Variable	$\bar{X}$ Nivel 3	$\pm$	$\bar{X}$ Nivel 4	$\pm$
<i>O. ficus-indica</i>	Humedad <sup>g%</sup>	93.28 <sup>b1</sup>	0.38	93.08 <sup>c1</sup>	0.48
	Materia Seca <sup>g%</sup>	6.72 <sup>b1</sup>	0.38	6.92 <sup>c1</sup>	0.48
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	2.25 <sup>b1</sup>	1.65	0.72 <sup>a2</sup>	0.29
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	22.62 <sup>b1</sup>	9.11	8.04 <sup>b2</sup>	3.92
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	4.76 <sup>a1</sup>	1.55	5.61 <sup>a1</sup>	0.97
	Cenizas <sup>g%</sup>	22.22 <sup>a1</sup>	4.74	21.07 <sup>a1</sup>	2.43
	E.L.N. <sup>g%</sup>	47.51 <sup>c1</sup>	13.84	64.17 <sup>c2</sup>	2.36
	Mucílago <sup>g</sup>	1.75 <sup>a1</sup>	0.82	1.41 <sup>a1</sup>	0.20
<i>O. atropes</i>	Humedad <sup>g%</sup>	88.26 <sup>a1</sup>	1.96	88.72 <sup>a1</sup>	1.22
	Materia Seca <sup>g%</sup>	11.74 <sup>a1</sup>	1.96	11.28 <sup>a1</sup>	1.22
	Extracto Etéreo <sup>g%</sup>	1.23 <sup>c1</sup>	0.59	0.90 <sup>a1</sup>	0.66
	Fibra Cruda <sup>g%</sup>	9.68 <sup>c1</sup>	1.08	6.51 <sup>b1</sup>	2.28
	Proteína Cruda <sup>g%</sup>	4.10 <sup>a1</sup>	1.26	4.33 <sup>a1</sup>	1.00
	Cenizas <sup>g%</sup>	20.05 <sup>a1</sup>	4.82	19.96 <sup>a1</sup>	5.14
	E.L.N. <sup>g%</sup>	64.95 <sup>c1</sup>	4.50	68.29 <sup>c1</sup>	5.69
	Mucílago <sup>g</sup>	3.24 <sup>b1</sup>	1.12	2.77 <sup>b1</sup>	0.77

g% = porcentaje de muestra en gramos, g = gramos

<sup>a,b</sup> = diferencias ( $P < 0.05$ ) dentro de columna

<sup>1,2</sup> = diferencias ( $P < 0.05$  dentro de fila).

Finalmente, no se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) en proteína cruda (PC) de acuerdo a la especie o nivel del cladodio, ésta osciló entre 4.10 a 5.61%. En relación a fenoles totales presentes en los extractos metanólico se encontró efecto ( $P = 0.0001$ ) de la interacción fuente del extracto (cladodio o epidermis)\*especie (*O. ficus-indica* y *O. atropes*)\*tipo de parcela (CPC y SPC) sobre fenoles totales (Tabla 2). Al respecto, los extractos obtenidos de epidermis de cladodio presentaron mayor cantidad (348 a 569 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) de fenoles totales ( $P < 0.05$ ), en comparación con los extractos obtenidos de cladodios completos (174 a 268 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>).

Mientras que, los extractos de *O. ficus indica* en PCP y PSP mostraron mayor ( $P < 0.05$ ) cantidad de fenoles totales (268 a 569 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) con respecto a *O. atropes* en PSP: 174 a 348 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> en PS, para cladodio completo y epidermis, respectivamente (Tabla 2).

**Tabla 2.** Fenoles totales de extractos metanólicos de cladodio y epidermis de nopal de acuerdo a especie y parcela.

	<b>Especie</b>	<b>Parcela</b>	<b>Promedio D.E. (mg EAG/100 g)</b>
Cladodio	<i>O. ficus-indica</i>	Con prácticas	268 <sup>a</sup> ± 43
	<i>O. ficus-indica</i>	Sin prácticas	263 <sup>a</sup> ± 24
	<i>O. atropes</i>	Sin prácticas	174 <sup>b</sup> ± 48
Epidermis	<i>O. ficus-indica</i>	Con prácticas	500 <sup>c</sup> ± 39
	<i>O. ficus-indica</i>	Sin prácticas	569 <sup>d</sup> ± 30
	<i>O. atropes</i>	Sin prácticas	348 <sup>e</sup> ± 33

a, b, c, d y e= diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) dentro de columna.  
D.E.= desviación estándar.

De acuerdo con los valores de la Tabla 2, los extractos de epidermis de *O. ficus-indica* cultivada en PSP mostraron mejor comportamiento ( $P < 0.05$ ) en cuanto a FT (569 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>). En cuanto a extractos de epidermis se refiere, *O. atropes* cultivada en PSP fueron los que menor cantidad ( $P < 0.05$ ) de FT produjeron (348 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>).

En relación al efecto de la adición de extractos metanólicos a la leche cruda (LC) sobre cuentas bacterianas (UFC mL<sup>-1</sup>) de BMA se encontró que, la fuente del extracto (cladodio y epidermis) y parcela no afectó ( $P > 0.05$ ) las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA en LC. Por el contrario la especie del nopal (*O. ficus-indica* y *O. atropes*) afectó las UFC mL<sup>-1</sup> de dichas bacterias en LC ( $P < 0.05$ ). Se encontró que la LC adicionada con extractos de *O. atropes* redujo ( $P < 0.05$ ) con mayor eficiencia las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA (5.0x10<sup>4</sup> y 7.9x10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, para extractos de cladodios y epidermis, respectivamente) en comparación con las cuentas bacterianas de LC adicionada con extractos de *O. ficus-indica* (3.1x10<sup>5</sup> y 1.9x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de BMA, para extractos de cladodios y epidermis, respectivamente). No obstante, las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA en LC de todos los

tratamientos analizados fueron menores ( $P < 0.05$ ) al tratamiento testigo ( $1.5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de BMA en LC sin adición de extractos de nopal) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Microbiológico de leche cruda adicionada con extractos metanólicos de cladodio y epidermis de nopal de acuerdo a especie y parcela.

Sección	Especie	Parcela	Mesófilas aerobias		Coliformes totales	
			Prom. (UFC/mL)	E.E.	Prom. (UFC/mL)	E.E.
Testigo*	---	---	$1.5 \times 10^{6a}$	$0.14 \times 10^1$	$1.2 \times 10^{6a}$	$0.13 \times 10^1$
Cladodio	<i>O. ficus-indica</i>	Con prácticas	$1.9 \times 10^{5b}$	$0.14 \times 10^1$	$7.9 \times 10^{4b}$	$0.13 \times 10^1$
		Sin prácticas	$3.1 \times 10^{5b}$	$0.14 \times 10^1$	$3.9 \times 10^{4b}$	$0.13 \times 10^1$
Epidermis	<i>O. atropes</i>	Con prácticas	$5.0 \times 10^{4c}$	$0.14 \times 10^1$	$5.0 \times 10^{4b}$	$0.13 \times 10^1$
		Sin prácticas	$1.9 \times 10^{5b}$	$0.14 \times 10^1$	$1.9 \times 10^{5c}$	$0.13 \times 10^1$
	<i>O. ficus-indica</i>	Con prácticas	$1.5 \times 10^{5b}$	$0.14 \times 10^1$	$1.0 \times 10^{5c}$	$0.13 \times 10^1$
		Sin prácticas	$7.9 \times 10^{4c}$	$0.14 \times 10^1$	$3.9 \times 10^{4b}$	$0.13 \times 10^1$

a, b y c = diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) dentro de columna.

\*= leche cruda sin extracto.

Para CT se encontró efecto ( $P = 0.0001$ ) de la fuente del extracto (cladodio o epidermis) y de especie. Las UFC/mL de CT en LC adicionada con extractos de nopal (cladodio o epidermis), independientemente de la especie, fueron menores ( $P < 0.05$ ) al tratamiento testigo ( $1.2 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de CT en LC). Sin embargo, las UFC mL<sup>-1</sup> de CT en LC adicionada con extractos de cladodios de *O. ficus-indica*, independientemente del tipo de parcela en la que se cultivó, mostraron mayor reducción CT en LC ( $3.9 \times 10^4$  a  $7.9 \times 10^4$ ) en comparación con extractos de epidermis de *O. ficus-indica* ( $1.0 \times 10^5$  a  $1.9 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>). Para el caso de los tratamiento con extractos de cladodios o de epidermis de *O. atropes*, se encontró que ambos extractos tuvieron el mismo efecto ( $P < 0.05$ ) sobre la reducción de cuentas bacterianas de CT en LC ( $5.0 \times 10^4$  y  $3.9 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Resultados estos, iguales ( $P > 0.05$ ) a los observados en LC adicionada con extractos de cladodio de *O. ficus-indica* (Tabla 3).

## DISCUSIÓN

Se ha establecido que la composición bromatológica puede afectar la síntesis y la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos de las plantas. Giletto *et al.* (2013) observaron que a

mayor concentración de nitrógeno (PC) la MS disminuye y la cantidad de fenoles totales se incrementa. Con respecto a los resultados de MS obtenidos en cladodios de *O. ficus-indica* y *O. atropes* (Tabla 1), estos valores estuvieron dentro del rango de las cactáceas: 76 a 165 g de MS por cada 1000 g de materia fresca (MF) (De Andrade *et al.*, 2012). En los aspectos de la PC de los cladodios de las especies analizadas (Tabla 1), los valores son consistentes con lo establecido para *Opuntia* spp. Torres (2011) encontró 5.0% de PC en *O. ficus-indica*, variedad Redonda y 5.3% en la variedad Gigante. Valores similares a los resultados obtenidos en este estudio. Hernández *et al.* (2011) observaron 8.48% de PC en cladodios tiernos (450 g de PF); no obstante, estos mismos investigadores sugieren que la PC en las cactáceas se incrementa en respuesta a la acidez o salinidad de los suelos. De acuerdo a lo citado anteriormente, dentro de los factores que pueden determinar, hasta cierto punto, la cantidad de FT presentes en los extractos de nopal analizados en esta investigación sería la MS.

En lo referente a la cantidad de FT obtenidos a partir de extractos de *O. ficus-indica* y *atropes*, se ha reportado valores de 900 a 1100 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> (Moussa *et al.*, 2014) y 1780 a 1990 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> (Guevara *et al.*, 2010) de FT obtenidos de extractos de cladodios completos de *O. ficus-indica*. Valores superiores a los obtenidos en este trabajo con cladodios de *O. ficus-indica* (263 ± 28 a 268 ± 43 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) y *O. atropes* (174 ± 48 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>). Variación que posiblemente está relacionada con factores, tales como: condiciones agroecológicas de la región donde se recolectaron los cladodios, especie, madurez del cladodio, métodos de extracción y método de análisis de FT (Koolen *et al.*, 2013). Así, por ejemplo, en la presente investigación se encontró que la asociación entre materia seca (MS) de los cladodios y FT fue negativa ( $r = -0.54$ ;  $P=0.003$ ) y los estimadores de la regresión ( $\beta_0 = 0.345$ ;  $P = 0.001$  y  $\beta_1 = -0.012$ ;  $P=0.003$ ) determinaron que, por cada gramo de MS del cladodio se obtiene -0.012 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>; al respecto, la MS promedio de los cladodios (90 días de edad) utilizados para obtener los extractos

fue de  $6.7 \pm 1.65$  y  $11.7 \pm 1.96$  g (por cada 100 g de materia fresca) para *O. ficus-indica* y *O. atropes*, respectivamente. Mientras que Guevara *et al.* (2010), utilizaron cladodios jóvenes, los cuales debieron tener entre 3.0 a 3.7 g de MS, ello de acuerdo con la clasificación de la edad de *O. ficus-indica* a partir de MS (Pinos *et al.*, 2010).

En cuanto a valores de FT de extractos de epidermis de cladodio Cai *et al.* (2010) encontraron 555.0 mg EAG  $100\text{ g}^{-1}$ ; valor similar al encontrado en epidermis de *O. ficus-indica* cultivada en PCP, menor a *O. ficus-indica* cultivada en PSP y, mayor a la cantidad de fenoles totales encontrado en extractos de epidermis de *O. atropes* (Tabla 2). De la misma forma, otras investigaciones hacen referencia a que en este tipo de extractos, la cantidad de FT es mayor en extractos de epidermis de plantas o frutos, derivados del proceso de transformación de frutas y verduras, en comparación con la pulpa del producto de origen (Ndhlala *et al.*, 2007; Conde *et al.*, 2010; Parashar *et al.*, 2014). En este sentido, Moussa *et al.* (2014), encontraron mayor cantidad de FT en la cáscara del fruto de *O. ficus-indica* (Tuna) que en la pulpa. Hallazgos que concuerdan con los resultados de la presente investigación: mayor cantidad de FT en extractos de epidermis ( $P < 0.05$ ) que en los extractos de cladodios completos (Tabla 2).

La importancia de los extractos analizados en esta investigación radicó en probar su efecto sobre BMA y CT presente en la leche cruda (LC) de bovinos. Al respecto, la LC adicionada con extractos de cladodio o epidermis mostraron menor carga de BMA y CT ( $P < 0.05$ ) en comparación con el testigo (Tabla 3); además, los valores de BMA en LC, adicionado con dichos extractos de nopal, se encontraron dentro de los estándares de calidad para que la LC se considere apta para consumo o elaboración de subproductos ( $1.2 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de BMA), ello de acuerdo a la NOM (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004). Aspecto que no ocurrió con CT, aun y cuando las cuentas de este tipo de bacterias en LC se redujeron en comparación con el testigo, los valores

encontrados no cumplieron con los estándares establecidos por la NOM ( $1 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> de CT) para que la leche se considere apta para consumo humano (NMX-F-700-COFOCALEC 2004).

En relación al efecto bacteriostático de los extractos de nopal (*O. ficus-indica* y *O. atropes*) analizados sobre la carga bacteriana (BMA y CT) de la LC, Sánchez *et al.* (2010), determinaron efecto de extractos etanólicos y metanólicos de cladodios de *O. ficus-indica* sobre bacterias Gram-negativas, como el caso de *Vibrio cholerae*. Por su parte, Ortiz *et al.* (2013), al adicionar directamente epidermis de cladodios y fragmentos de cladodios de *O. ficus-indica* en base fresca, observaron resultados similares a los encontrados en la presente investigación: las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA se redujeron y lograron los valores establecidos por la NOM ( $P < 0.05$ ), para el caso de las cuentas de CT en LC, éstas también disminuyeron en comparación al testigo ( $P < 0.05$ ); pero, no lograron disminuir la carga de CT en LC a niveles exigidos por la NOM.

El menor efecto de los extractos metanólicos sobre CT puede deberse a que las bacterias Gram-negativas ofrecen mayor resistencia que las Gram-positivas a la entrada de antimicrobianos a la célula (Nikaido, 2003), pues poseen una membrana celular externa la cual, tiene como límite de exclusión moléculas mayores a 600 Da mientras que, el límite de exclusión en Gram-positivas que carecen de membrana celular externa es de 100 kDa, mucho mayor que la mayoría de compuestos que actúan como antimicrobianos (Calvo y Martínez, 2009). Al respecto, se considera como bacterias coliformes totales a bacterias Gram-negativas de la familia *Enterobacteriaceae* (Savichtcheva y Okabe, 2006). No obstante, las BMA incluyen a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que pueden crecer a temperaturas de 35 a 48° C (NOM-092-SSA1-1994). Así, los CT de LC adicionada con extractos de cladodio y epidermis de *Opuntia spp* presentan mayor resistencia a los compuestos fenólicos que las BMA.

Los efectos de los extractos de cladodios o epidermis sobre las cuentas bacterianas en LC puede deberse a los fenoles encontrados en extractos polares (metanol, etanol y agua) de cladodios de *O. ficus-indica* como los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Lee *et al.*, 2003; Ginestra *et al.*, 2009; Moussa *et al.*, 2014). Respecto a los ácidos fenólicos, Gutiérrez *et al.* (2012), evaluaron la concentración inhibitoria mínima de ácidos fenólicos como el hidroxibenzoico, protocatecuico y gálico, sobre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas patógenas de alimentos y encontraron inhibición de las bacterias por efecto de todos los ácidos fenólicos evaluados. Al respecto, Otshudi *et al.* (2000), encontraron que las plantas que presentan mayor cantidad de fenoles tienen mayor actividad antimicrobiana.

La acción de los fenoles sobre las bacterias, de acuerdo con Sánchez *et al.* (2010), puede establecerse a partir de que estos compuestos dañan la membrana celular, provocan la disminución del pH citoplasmático y la producción de ATP. Ultee *et al.* (2002), determinaron que la actividad antimicrobiana de los fenoles se debe a su anillo aromático y principalmente al grupo hidroxilo (-OH), con el que cuentan los fenoles (a veces con más de uno). Con el -OH, los fenoles pueden actuar como acarreadores de cationes monovalentes del citoplasma al espacio extracelular; al llegar un fenol al citoplasma intercambia su protón hidrogeno (H<sup>+</sup>) por un ion potasio (K<sup>+</sup>) u otro catión (Ultee *et al.*, 2002). Este intercambio provoca la despolarización de la membrana celular (Whiteaker *et al.*, 2001) y, la despolarización o polarización de la membrana celular es considerado como daño en la misma (Yuroff *et al.*, 2003; Bot y Prodan, 2009), afectando la homeostasis y finalmente muerte celular (Ultee *et al.*, 2002).

Para el caso del mayor efecto de los extractos de cladodio o epidermis de *O. atropes* en comparación con *O. ficus-indica* sobre BMA (Tabla 3), ello pudo deberse al tipo de fenoles presentes en cada extracto más que a la cantidad de fenoles totales. Sin embargo, en la presente investigación no se determinó la composición de los fenoles totales de acuerdo al tipo de extracto

(epidermis o cladodio completo) y especie (*O. ficus-indica* o *atropes*). No obstante, que el compuesto de referencia fue ácido Gálico, el tipo de fenoles totales puede variar y esta variación afecta su capacidad antimicrobiana (Blainsky *et al.*, 2013). Ultee *et al.* (2002), determinaron que a pesar de que dos fenoles pueden ser muy similares éstos no reflejan la misma actividad antimicrobiana y antioxidante. Esto podría sugerir que los fenoles presentes en los extractos de *O. atropes* presenten más actividad antimicrobiana independientemente de que en éstos se encontró menor cantidad de fenoles.

## CONCLUSIÓN

La adición de extractos metanólicos de epidermis de cladodio o cladodio completo de *O. ficus indica* y *O. atropes* a la leche cruda, proveniente de sistemas de producción con deficiente sistemas de salud de la ubre y ordeño, permitió mejorar la calidad microbiológica de esta, puesto que disminuyó el número de UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales. Aunque si bien, los extractos metanólicos de *O. atropes* (epidermis y cladodio) presentan menor valor de fenoles totales que los extractos metanólicos de *O. ficus indica* (epidermis y cladodio) poseen mayor efecto sobre cuentas bacterianas cuando se adicionan directamente a la leche cruda.

## LITERATURA CITADA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. EUA.
- Arriaga, J.C., Heredia, N.D., Martínez, G.C. y Rayas, A.A. 2013. Importancia de los Sistemas de Producción de Leche a Pequeña Escala en México. 1er Congreso Nacional de Producción, Calidad, Transformación, Comercialización y Nutrición de la Leche y sus Derivados. Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto de Ciencias Agropecuario y rural (ICAR).
- Blainski, A., Lopes, G.C., y De Mello, J.C.P. 2013. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18(6), 6852-6865.

- Bot, C., y Prodan, C. 2009. Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 38,1049-1059.
- Cai, W., Gu, X., y TaNG, J. 2010. Extraction, purification and characterisation of the flavonoids from *Opuntia* Milpa Alta skin. *Czech J Food Sci.* 2, 108-116.
- Calvo, J. y Martínez, M.L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 27(1), 44-52.
- Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., y Rizvi, S.S.H. 2010. Extraction of natural antioxidants from plant foods. Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries. 506-594.
- De Andrade, F.M., Bispo, S.V., Rocha, F.R.R., Urbano, S.A., y Costa, C.T.F. 2012. The use of cactus as forage for dairy cows in semi-arid regions of Brazil. *Organic Farming and Food Production.* 169-189.
- Fuentes, C.G., Ruiz, R.R.A., Sánchez, G.J.I., Ávila, R.D.N., y Escutia, S.J. 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 10(4), 419-432.
- Garcés, R., Brito, C., Cabello, M., Orellana, A., Brandl, E. y López, J.L. 2005. Determinación de la calidad microbiológica de la leche cruda y del queso artesanal elaborado en una cooperativa de campesinas en una zona del centro-sur de Chile. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos* 366, 62-69.
- García, E. 1998. Modificaciones al sistema de clasificación Köppen: para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana. 5ta ed. Series Libro Num. 6 (Ed). Instituto de geografía. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2004. 18-21.
- Giletto, C., Monti, M.C., Ceroli, P., y Echeverría, H. 2013. Efecto de la fertilización con nitrógeno sobre la calidad de tubérculos de papa (Var. Innovator) en el sudeste Bonaerense. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 14(2), 217-222.
- Ginestra, G., Parker, M.L., Bennett, R.N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A. y Waldron, K.W. 2009. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(21), 10323-10330.
- Guevara, F.T., Jiménez, I.H., Reyes, E.M.L., Mortensen, A.G., Laursen, B.B., Li, W.L., De León, R.A., Fomsgaard, S. y Barba, R.A.P. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of food composition and analysis* 23(6), 525-532.
- Gutiérrez, L.M., Rúa, J., Caro, I., de Castro, C., de Arriaga, D., García, A.M.R., y del Valle, P. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control* 26(2), 555-563.
- Hernández, U.M.I., Pérez, T.E., y Rodríguez, G.M.E. 2011. Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus-indica*) at varied ages in an organic

- harvest. International journal of environmental research and public health 8(5), 1287-1295.
- INEGI: instituto nacional de estadística geografía e información. 2010. Anuario estadístico del estado de Michoacán. 127-142
- Khadem, S. y Marles, R.J. 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules* 15, 7985-8005.
- Koolen, H.H., Da Silva, F.M., Gozzo, F.C., de Souza, A.Q., y de Souza, A.D. 2013. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC-ESI-MS/MS. *Food Research International*. 51(2), 467-473.
- Lee, E.H., Kim, H.J., Song, Y.S., Jin, C., Lee, K.T., Cho, J., y Lee, Y.S. 2003. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Archives of pharmacal research* 26(12), 1018-1023.
- Livrea, M.A., y Tesoriere, L. 2006. Health benefits and bioactive components of the fruits from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 8, 73-90.
- Makkar, H.P.S. 2000. Quantification of Tannins in Tree Foliage: A laboratory manual for the fao/iaea co-ordinated research project on use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assay for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on the tanniniferous tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria. 1-29.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 174-181.
- Marzieh, R., Majid, K. y Seyed, M.J. 2012. Bacteriostatic Agents. Chapter 11. In: A Search for Antibacterial Agents. Varaprasad B. (ed). Editorial: InTech. 229-230. Disponible en internet: <http://www.intechopen.com/books/a-search-for-antibacterial-agents>.
- Moreno, G.A., Herrera, A.G., Carrión, G.M., Álvarez, B.D, Pérez, S.R. y Ortiz, R.R. 2012. Caracterización y modelación esquemática de un sistema familiar de bovinos productores de leche en la Ciénega de Chapala, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Vol. 20, Núm. 3-4. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México. 85-94.
- Moussa, A.T.E., El-Hady, E.S.A.A., Omran, H.T., El-Samahy, Kroh, L.W.S.K., y Rohn, S. 2014. Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. *Food Research International* 64, 864-872.
- Muehlhoff, E., Bennett, A., y McMahon, D. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 243-263.
- Ndhkala, A.R., Kasiyamhuru, A., Mupure, C., Chitindingu, K., Benhura, M.A. y Muchuweti, M. 2007. Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and

Sclerocarya birrea. Department of Biochemistry, University of Zimbabwe. Food Chemistry 103, 82-87.

Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 67: 593-656.

NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Counting of somatic cells by flowcy to metry. Disponible en internet: [www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php](http://www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php)

NOM-109-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana NOM -109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>

NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>

NOM-110-SSA-1994. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>

NOM-113-SSA 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>

NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaria de salud. Disponible en internet: [http://www.hablemosclaro.org/Repositorio/biblioteca/b\\_164\\_NOM-243-SSA1-2010-%20Leche.pdf](http://www.hablemosclaro.org/Repositorio/biblioteca/b_164_NOM-243-SSA1-2010-%20Leche.pdf)

Ortiz, R.R., García, G.R.A., Valdez, A.J.J., Lara, B.N. y Pérez, S.R.E. 2011. Estudio exploratorio del efecto de la adición de nopal (*Opuntia ficus-indica*) a la leche cruda sobre las cuentas bacterianas: mesófilas aerobias y coliformes totales. Reuniones Nacionales de Investigación e Inocuidad Pecuaria, Agrícola, Forestal y Acuícola Pesquera. León Guanajuato. Octubre 2011.

Ortiz, R.R., García, G.R.A., Valdez, A.J.J., Lara, C.Ma.B.N., y Pérez, S.R.E. 2012. Estudio exploratorio del efecto de la adición de nopal (*Opuntia ficus-indica*) a la leche cruda sobre cuentas bacterianas: mesófilas aerobias y coliformes. XXII Encuentro de investigación veterinaria y producción animal. p. 21-26.

Ortiz, R.R., Valdez, A.J.J., Garcidueñas, P.R., Chávez, M.M.P., Val, A.D., Hernández, V. E.F. y Pérez, S.R.E. 2013. Effect of added nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) on microbial content in raw milk. African Journal of Microbiology Research. 12 July, 2013. 7(28), 3675-3680.

- Otshudi, A.L., Vercruysse, A., y Foriers, A. 2000. Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhoea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC). *Journal of ethnopharmacology* 71(3), 411-423.
- Parashar, S., Sharma, H., y Garg, M. 2014. Antimicrobial and Antioxidant activities of fruits and vegetable peels: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3(1), 160-164.
- Pérez, S.R.E., García, S.P.A., Ángel, P.M.E., Valdez, J.J., Ramos, B., Ortiz R.R. y Ramírez, G. 2010. Producción de la leche provenientes de vacas Holstein bajo una dieta complementada con nopal (*Opuntia ficus-indica*). Morelia Michoacán, México. Disponible en internet: <http://www.engormix.com/MAGanaderiache/nutricion/articulos/produccionleche-provenientes-vacas-t3072/141-p0.htm>.
- Pinos, R.J.M., Velázquez, J.C., González, S.S., Aguirre, J.R., García, J.C., Álvarez, G. y Jasso, Y. 2010. Effects of cladode age on biomass yield and nutritional value of intensively produced spineless cactus for ruminants. *South African Journal of Animal Science* 40(3), 245-250.
- Raaman, N. 2006. *Phytochemical Techniques*. New India Publishing Agency, New Delhi, India, p. 10.
- Rodríguez, G.S. 2010. Efecto de la incorporación de mucílago de nopal sobre las propiedades sensoriales y texturales de una pasta a base de huitlacoche *Ustilago maydis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-Facultad de Químico Farmacobiología. Morelia, Michoacán. México. p. 34-54.
- Rojas, R.M.R., Lammoglia, V.M.A., Daniel, R.A.I.C., Cabrera, N. y Cruz, B.E. 2014. Presencia de microorganismos en leche cruda de vaca durante la ordeña en clima tropical. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán, México del 2 al 4 de Julio de 2014. p. 487-491.
- Sanchez, E., Santos, G., y Heredia, H. 2010. Extracts of Edible and Medicinal Plants Damage Membranes of *Vibrio cholera*. *Applied and environmental microbiology* 76 (20), 6888–6894.
- Santos, M.V.F., Lira, M.A. y Burity, H.A. 1990. Número, dimensões e composição química de artículos de palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) cv. gigante, de diferentes ordens. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, 7 (especial), 69-79.
- SAS/STAT 2000. Guide for personal computers. Version 9.1. Statistical Analysis System (SAS) Institute in Company. Cary electronic version available on CD.
- SAS/STAT. 2008. The REG Procedure. Chapter 34; In; SAS Institute Inc. 2008. 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 5428-5434.

- Savichtcheva, O., y Okabe, S. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water research* 40 (13), 2463-2476.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.
- Stintzing, F.C. y Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research* 49, 175-194.
- Tolosa, L., y Cañizares, E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. 43(1-2), 37-55.
- Torres, S.A. 2011. Composición química del nopal y sus implicaciones en la nutrición de rumiantes (experiencias de Brasil). VIII Simposium-Taller Nacional y 1er. Internacional de "Producción y Aprovechamiento del Nopal. Escobedo, N.L. México. Noviembre 2010. *Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial*, 5, 143-151.
- Whiteaker, K.L., Gopalakrishnan, S.M., Groebe, D., Shieh, C.C., Warrior, U., Burns, D.J., Coghlan, M.J., Scott, V.E., y Gopalakrishnan, M. 2001. Validation of FLIPR membrane potential dye for high throughput screening of potassium channel modulators. *J. Biomol. Screen.* 6, 305-312.
- Yuroff, A.S., Sbat, G. y Hickey, W.J. 2003. Transporter-mediated uptake of 2-chloro and 2-hydroxibenzoato by *Pseudomonas huttensis* strain D1. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 7401-7408.

## **Validación de la metodología de microdilución y expansión en placa como alternativa para el análisis microbiológico de mesófilas aerobias y coliformes totales en leche cruda**

### **RESUMEN**

El objetivo fue validar la metodología de microdilución y extensión en placa (M2) como alternativa para el análisis de mesófilas aerobias (MA) y coliformes totales (CT) en leche cruda de bovinos, en sustitución de la metodología establecida por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM): NOM-092-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994 (M1). Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mL<sup>-1</sup> de MA y CT por M2 y como referencia de acuerdo a las NOM (M1). Obtenidos los valores de cada metodología (M1 y M2), el análisis estadístico consistió en lo siguiente: 1) Comprobar normalidad de los parámetros estudiados por la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov; 2) Determinar valores extremos (outliers); 3) Determinar el coeficiente de correlación de concordancia (CC) de Lin; 4); Obtener los valores de la pendiente y la ordenada al origen (regresión lineal) y 5) Análisis gráfico de Bland-Altman, para evaluar la concordancia entre métodos (M1 vs M2). No se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los promedios de UFC mL<sup>-1</sup> de MA y CT obtenidos por la metodología establecida por la M1 y M2. Los promedios de M1 y M2 fueron:  $2.4 \times 10^5$  y  $2.3 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> de BMA, respectivamente, y para CT fueron:  $4.6 \times 10^4$  y  $4.8 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>, respectivamente. El método de microdilución y cultivo por expansión para el análisis de MA y CT de leche cruda es una alternativa en sustitución a la metodología indicada por las normas oficiales mexicanas puesto que demuestra exactitud y equivalencia con los resultados del análisis convencional (NOM).

**Palabras clave:** Calidad de leche, microbiología, correlación, acreditación.

## ABSTRACT

The objective was to validate the methodology of microdilution and spread in plate (M2) as an alternative to the analysis of aerobic mesophilic bacteria (AMB) and coliforms total (TC) of raw milk of bovine, in replacement of the methodology established by the Mexican Official Standards (MOS): NOM-092-SSA1-1994 and NOM-113-SSA1-1994 (M1). It determined the number of colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> of AMB and TC per M2 and referenced according to the MOS (M1). The statistical analysis consisted of the following: 1) check the normality of the parameters studied by the statistical test of Kolmogorov-Smirnov. 2) Determine extreme values (*outliers*). 3) Determine the correlation coefficient of concordance (CC) of Lin. 4) to get the values of the slope and the intercept at the origin (linear regression). 5) To make graphical analysis of Bland-Altman, to evaluate the correlation between methods (M1 vs M2). There were no significant difference ( $P > 0.05$ ) between averages of CFU mL<sup>-1</sup> of AMB and TC obtained by the methodology established by the M1 and M2. Averages of M1 and M2 were:  $2.4 \times 10^5$  and  $2.3 \times 10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> of AMB, respectively, and for TC were:  $4.6 \times 10^4$  and  $4.8 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>, respectively. The method of microdilution and spread in plate for the analysis of AMB and TC of raw milk is an alternative to substitute the methodology indicated by the Mexican Official Standards since it shows accuracy and equivalence with the results of the conventional analysis (MOS).

**Palabras clave:** milk of quality, microbiology, correlation, accreditation.

## INTRODUCCIÓN

En los países en desarrollo, la leche (rico en macro y micronutrientes) es un alimento importante; debido a que en este tipo de poblaciones, la escasez de recursos económicos repercute de manera negativa en la adquisición e ingesta de alimentos de origen animal (Muehlhoff *et al.*, 2013). Sin embargo, la propia composición nutricional de la leche hacen de este alimento un sustrato ideal para el crecimiento de microorganismos patógenos para el humano, aspecto que le otorga, en ciertos casos, la categoría de riesgo alimentario para el consumidor (Pacheco y Galindo, 2010). Por ello, la necesidad de legislar en torno a este alimento y establecer estándares de calidad de la leche, bacteriológica y bromatológicamente, para consumo humano o como materia prima de calidad para la elaboración de subproductos lácteos, para garantizar la inocuidad en su consumo directo (NOM-092-SSA1, 1994; NOM-113-SSA1, 1994; NOM-700-COFOCALEC, 2012).

Con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica de la leche en México, la Norma Oficial Mexicana (NOM) 700-COFOCALEC (2012) establece el número de unidades formadoras de colonias (UFC)  $\text{mL}^{-1}$  de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT) en la leche para considerarse apta para el consumo y producción de lácteos (Vera *et al.*, 2009). Mientras que la metodología para evaluar el número de UFC  $\text{mL}^{-1}$  de BMA y CT, lo indican la NOM-092-SSA1 (1994) y NOM-113-SSA1 (1994), respectivamente. De aquí que la aplicación de estas normas es obligatoria en leche destinada para consumo y elaboración de productos lácteos. Sin embargo, ésta metodología (Boczek *et al.*, 2014a) es costosa y poco práctica para fines de investigación del efecto de compuestos antimicrobianos adicionados directamente a la leche sobre la calidad microbiológica de la misma; es costosa por el tipo y volumen de material y reactivos empleados; poco práctica por los procedimientos y recopilación de datos requeridos para la obtención de resultados, mismos que requieren de bastante tiempo para evaluar

simultáneamente gran cantidad de tratamientos y repeticiones dentro de una campana de flujo convencional (Özer y Yaman, 2014).

En la actualidad, en países en desarrollo, existe el interés por encontrar alternativas tecnológicas que permitan evaluar en paralelo mayor número de muestras (tratamientos y repeticiones) de leche desde el punto bacteriológico bajo condiciones de laboratorio. Al respecto, el instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CSLI: siglas en inglés, 2008) promueve el método de la microdilución en sustitución del método de macrodilución (realizada para la técnica de agar vertido en placa). Puesto que, la microdilución en conjunto con la técnica de extendido en placa (Boczek, *et al.*, 2014b) agiliza el procedimiento y recopilación de datos. Esta unión de técnicas permite evaluar simultáneamente mayor cantidad de tratamientos y repeticiones dentro de una campana de flujo convencional. Por ello, el objetivo de esta investigación fue validar la metodología de microdilución y extensión en placa como alternativa para el análisis de BMA y CT en leche cruda de bovinos tomando como referencia la metodología establecida por las normas oficiales mexicanas NOM-092-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación se llevó a cabo en Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CEMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ)-UMSNH, ubicada en el km 9.5 de la carretera Morelia-Zinapecuaro, municipio de Tarimbaro, Michoacán, México; cuyas características fisiográficas son: Latitud Norte: 19° 40' 0"; Longitud Oeste: 102° 9' 30"; altitud sobre el nivel del mar: 1.875 m, con temperatura media de 18.6° C y precipitación media anual de 773.9 mm (INEGI, 2010). La región es sub-húmeda y semi-húmeda con clima templado que corresponde a la clasificación Cw (García, 2004).

Para el desarrollo de la validación se utilizaron 2525 mL de leche cruda (LC) recién ordeñada proveniente del sector de bovinos de productores de leche de la FMVZ-UMSNH y almacenada en un tanque frío (4°C) de 500 lts. El traslado de las muestras de LC al laboratorio, fue a través de recipientes herméticos previamente esterilizados, la leche se depositó y mantuvo en dichos recipientes a una temperatura de 4°C tal como lo marca la NOM (NOM-SSA-109-1994) hasta su análisis. El volumen total de LC obtenida (2525 mL) se fraccionó en dos porciones, una para cada metodología (M): M1 (2500 mL de LC), análisis microbiológico de acuerdo a las NOM para BMA (NOM-092-SSA1, 1994) y CT (NOM-113-SSA1, 1994), para ello, se formaron 25 muestras de 100 mL de LC muestra<sup>-1</sup> y, M2 (25 mL de LC), para análisis microbiológico por microdilución y extendido en placa, metodología en la cual se formaron 25 muestras de 1 mL de LC muestra<sup>-1</sup>.

El análisis microbiológico bajo M1 fue como sigue: primeramente se preparó agar cuenta estándar y agar bilis rojo violeta de acuerdo a las indicaciones del proveedor, mismas que se atemperaron a 45°C. Posteriormente, en cada muestra (100 mL de LC muestra<sup>-1</sup>) se hicieron diluciones decimales con 1 mL de LC en 9 mL de agua peptonada dilución<sup>-1</sup>, hasta llegar a la dilución 10<sup>-5</sup>, ello de acuerdo a lo estipulado por la NOM-110-SSA (1994). Una vez hechas las diluciones, se tomó 1 mL de las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> para inocular en 150 cajas de Petri (1 mL por caja): en 75 cajas Petri (25 por dilución) se vertió agar cuenta estándar para el análisis microbiológico de BMA y, en las cajas restantes se vertió agar bilis rojo violeta para el análisis microbiológico de CT. El inóculo se mezcló con el agar mediante seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás a adelante, hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio. Posteriormente, se dejó solidificar. Este proceso se realizó cinco veces, cada vez con cinco muestras (100 mL muestra<sup>-1</sup>) para obtener 25 repeticiones por dilución. Las cajas se incubaron en posición invertida

a 35°C. El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) mL<sup>-1</sup> se realizó a 24 y 48 h, para CT y BMA, respectivamente.

En el caso del análisis microbiológico por M2 (microdilución y extendido en placa) el procedimiento fue como sigue: se prepararon 50 cajas Petri: 25 con agar cuenta estándar para el conteo de BMA y, 25 con agar bilis rojo violeta para el conteo de CT. La preparación de los medios de cultivo fue de acuerdo a las indicaciones del proveedor y se dejaron solidificar hasta sequedad (20 min pre-cultivo). Previo al cultivo, las 50 cajas Petri se dividieron en tres áreas con un marcador por la parte inferior para cultivar una dilución por área (tres diluciones caja<sup>-1</sup>). La microdilución se realizó a partir de muestras homogéneas de 1 mL de LC, diluyendo 100 µL en 900 µL de agua peptonada dilución<sup>-1</sup>, hasta la dilución 10<sup>-5</sup>. Para el cultivo por extendido en placa, se inoculó una microgota de 5 µL dilución<sup>-1</sup> en el área correspondiente en el agar ya solidificado. Para el conteo de BMA, se cultivaron las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> en agar cuenta estándar y para el conteo de CT se cultivaron las diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> en agar bilis rojo violeta. En cada área se rotuló la dilución cultivada. En el método extendido en placa, con microgota (5 µL), se realizaron 12 movimientos: seis de izquierda a derecha y después de girar la caja Petri a 90° se repiten seis movimientos de izquierda a derecha, evitando la mezcla entre inóculos de diferente dilución. Una vez inoculadas las cajas, se dejó absorber la microgota hasta sequedad para invertir las cajas y así incubarlas a 35°C. Este proceso se realizó una sola vez para todas las muestras. El conteo de UFC para ambos tipos de bacterias (BMA y CT) se realizó entre 12 y 15 h; dicha variación en el periodo de incubación, con respecto al método de macrodilución (24 a 48 h) se debe a la proliferación bacteriana más rápida en M2 (12 a 15 h) que en M1 y se realiza a 24 ó 48 h (dependiendo si es para BMA o par CT) dificultaría el conteo de UFC si se ajustará al tiempo que pide M1.

Obtenidos los valores de UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT en cada metodología (M1 y M2) se procedió con el análisis estadístico en el siguiente orden: 1) Comprobar normalidad de los parámetros estudiados. Para ello, se utilizó la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov; 2) Determinar valores extremos (outliers); en donde se compararon las diferencias absolutas entre cada método. Dichas diferencias no deben superar cuatro veces el valor de la media de las diferencias absolutas; 3) Estimar el coeficiente de correlación (r); si éste es superior o igual a 0.975, el intervalo de valores puede ser considerado adecuado y, por lo tanto, se puede utilizar una regresión lineal para estimar la pendiente y la ordenada en el origen; 4) Mediante regresión lineal, se obtienen los valores de la pendiente y la ordenada al origen para cada par de resultados, así como, sus respectivos intervalos de confianza (IC) al 95%.

Cumplidos los cinco criterios señalados en el párrafo anterior, se evaluó la concordancia entre ambos métodos (M1 vs M2) mediante: i) análisis gráfico de Bland-Altman y, ii) determinación del coeficiente de correlación de concordancia (CC) de Lin. Para dichos análisis se empleó el paquete estadístico SAS (2010).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

No se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los promedios de UFC mL<sup>-1</sup> obtenidos por la metodología establecida por la NOM (M1) y la metodología de microdilución y extendido en placa (M2), para BMA y CT (Tabla 1). Los promedios para BMA fueron:  $2.4 \times 10^5$  y  $2.3 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> para M1 y M2, respectivamente. Mientras que para CT fueron:  $4.6 \times 10^4$  y  $4.8 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> para M1 y M2, respectivamente. El intervalo de confianza (IC) para BMA fue de  $2.1 \times 10^5$  a  $2.6 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> para M1. Para M2, el IC fue de  $2.2 \times 10^5$  a  $2.4 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. En el caso de los IC para CT estos fueron:  $4.0 \times 10^4$  a  $5.2 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> para M1 y  $4.3 \times 10^4$  a  $5.3 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> para M2.

Tavolaro *et al.* (2005), concluyeron que los microorganismos propios de leche no afectan los resultados al comparar entre métodos automáticos y el método de cuenta en placa (M1) para la determinación de BMA, puesto que encontró coeficientes de correlación de 0.90, entre estos métodos (automáticos y convencional).

**Tabla 1.** Resultados descriptivos de las UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales obtenidas por metodología convencional (M1) y microdilución y expansión en placa (M2).

	Mesófilas aerobias UFC mL <sup>-1</sup>		Coliformes totales UFC mL <sup>-1</sup>	
	M1	M2	M1	M2
UFC mL <sup>-1</sup> Mínimas	1.6x10 <sup>5</sup>	1.6x10 <sup>5</sup>	2.8x10 <sup>4</sup>	2.8x10 <sup>4</sup>
UFC mL <sup>-1</sup> Máximas	3.4x10 <sup>5</sup>	3.6x10 <sup>5</sup>	8.4x10 <sup>4</sup>	8.0x10 <sup>4</sup>
Media aritmética (UFC mL <sup>-1</sup> )	2.4x10 <sup>5</sup> IC(2.1x10 <sup>5</sup> a 2.6x10 <sup>5</sup> )	2.3x10 <sup>5</sup> IC(2.2x10 <sup>5</sup> a 2.4x10 <sup>5</sup> )	4.6x10 <sup>4</sup> IC(4.0x10 <sup>4</sup> a 5.2x10 <sup>4</sup> )	4.8x10 <sup>4</sup> IC(4.3x10 <sup>4</sup> a 5.3x10 <sup>4</sup> )
	Coeficientes de variación			
Mínimo (%)	0		0	
Máximo (%)	8.1		8.4	
Promedio (%)	4.8		3.1	

IC= intervalo de confianza 95%.

En lo referente a los valores de los coeficientes de variación (CV) entre ambas metodologías, este no supero el 5% de variabilidad: 4.8% para BMA y 3.1% en CT, al respecto, el CV es la variación, entorno a la media aritmética, expresada en porcentaje (Vásquez y Caballero 2011), por lo que la variabilidad obtenida en esta investigación indica la analogía entre los valores obtenidos (UFC mL<sup>-1</sup>) en ambas metodologías analizadas. Resultados que concuerdan con Sánchez y Delgado (2010), quienes encontraron resultados comparables entre el análisis microbiológico por macrodilución (indicada por las NOM) y por microdilución.

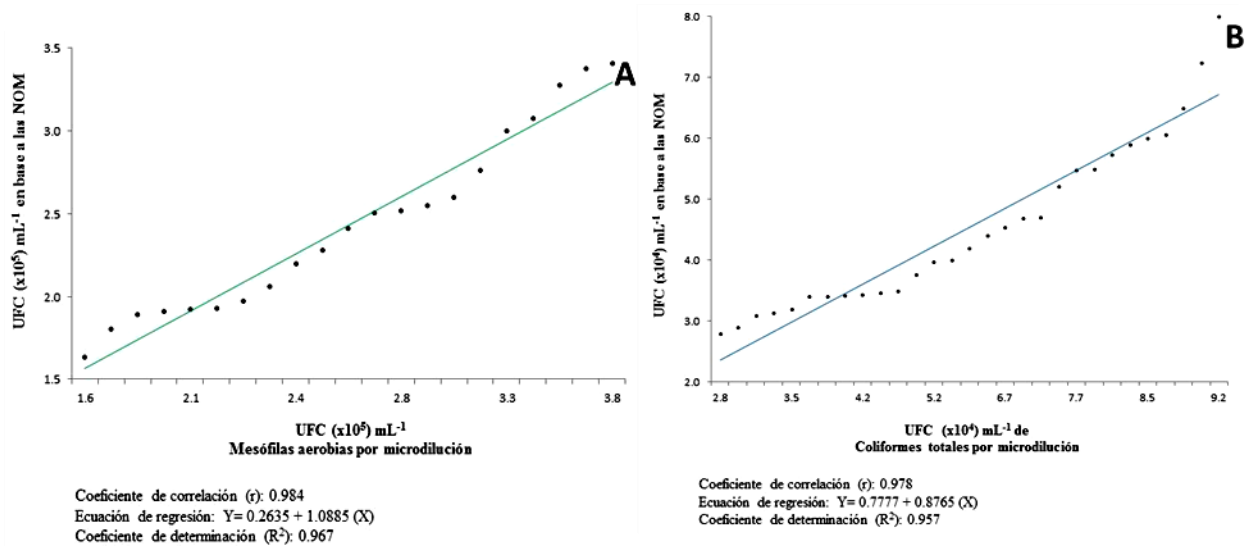
Los resultados del análisis estadístico (Kolmogorov-Smirnov) determinaron que, el número de UFC mL<sup>-1</sup> obtenidas por M1 y por M2 presentaron una distribución normal con una probabilidad de 0.134 para M1 y de 0.151 por M2, para BAM, mientras que las probabilidades para las UFC mL<sup>-1</sup> en CT fueron de 0.144 con la M1 y de 0.122 con la M2, sin registro de valores atípicos

(outlier) mayores a una desviación estándar (Figura 1 y 2). Además, la distribución lineal encontrada presentó una dispersión constante, cuyos coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) fueron de 0.98 y de 0.97 para BMA y CT, respectivamente. Mientras que los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron de 0.97 y 0.95 ( $P < 0.05$ ). Lo que indica que el método analítico mantuvo la proporción entre la concentración del analito y su respuesta (Vinagre, 2007), para este caso entre el método M2 y el número de UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

Duffao *et al.* (2010) sugieren que es preciso que el coeficiente de correlación de Pearson sea mayor o igual a 0.99 para una curva de calibración; aunque, para el caso de trazas se admite un valor igual a 0.99. No obstante, hay controversias sobre la implementación de dicho coeficiente de correlación para determinar linealidad en la validación de un método (FAO, 2007; Duffao *et al.*, 2010). Ante esta situación, la FAO (2007) indica que el mejor indicador para establecer la linealidad en la validación de un método analítico, en reemplazo del coeficiente de correlación de Pearson, es el cálculo del estimador t Student para coeficiente de correlación de Pearson ( $t_r$ ) con  $n-2$  grados de libertad. Al respecto, los resultados mostraron que  $t_r$  fue significativo ( $P = 0.05$ ).

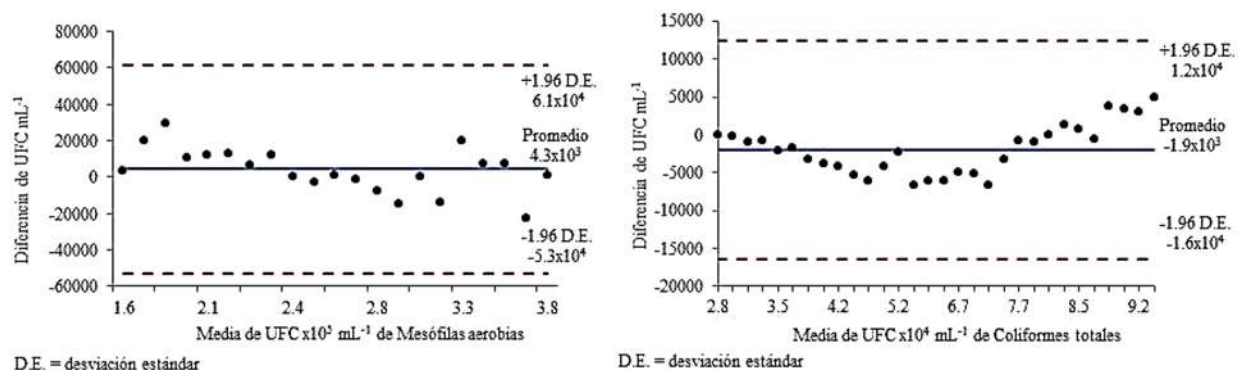
En contraste al método  $t_r$  se encuentra el coeficiente de correlación de concordancia (CC) de Lin, coeficiente que califica la fuerza de asociaciones en: casi perfecta, para valores mayores a 0.99; sustancial, de 0.95 a 0.99; moderado, de 0.90 a 0.94 y pobre, por debajo de 0.90 (Camacho, 2008; Cortéz, 2009). En ésta investigación el CC de Lin para BMA fue de 0.99, con IC 95% de 0.96 a 0.99; lo cual, ubica a la determinación de BMA (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) por M1 y M2 dentro de una concordancia casi perfecta. Mientras que para CT (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) el CC de Lin fue de 0.96, con IC% de 0.93 a 0.98; lo que ubica a la determinación de CT por M1 y M2 en una categoría sustancial. En este sentido, la combinación de las metodologías microdilución y extendido en placa son viables como alternativa de sustitución del método indicado por las NOM (M1).

Cumplido el criterio de correlación es factible utilizar los coeficientes de la regresión lineal ( $\beta_0$  y  $\beta_1$ ) para comprobar la linealidad de las técnicas de medición que están siendo evaluadas (Vinagre, 2007). Al respecto, los valores de dichos coeficientes para BMA fueron:  $\beta_0 = 0.2635$  y  $\beta_1 = 1.0885$  ( $P < 0.05$ ). Mientras que para CT,  $\beta_0$  fue de  $0.7777$  y  $\beta_1 = 0.8765$  para ( $P < 0.05$ ) (Figura 1).



**Figura 1.** Regresión lineal para UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias (A) y coliformes totales (B) entre la metodología establecida por la NOM y microdilución y expansión en placa.

La concordancia presentada por los análisis estadísticos, antes descritos, fue evaluada mediante el método gráfico de Bland-Altman (Figura 2); método que, permite evaluar si la diferencia entre los valores encontrados tiene o no, alguna relevancia desde un punto de vista clínico (Hanneman, 2008). Los resultados obtenidos por el método de Bland-Altman no mostraron valores fuera de los límites que marcan las diferencias a  $\pm 1.96$  desviación estándar. El sesgo determinado para BMA fue de  $4.3 \times 10^3$ , con límites de concordancia entre  $-5.3 \times 10^4$  y  $6.1 \times 10^4$ . Mientras que para el caso de CT, el sesgo fue de  $-1.9 \times 10^3$ , con límites de concordancia entre  $-1.6 \times 10^4$  y  $1.2 \times 10^4$ .



**Figura 2.** Grafica de Bland-Altman de UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales entre la metodología establecida por la NOM y microdilución y expansión en placa.

La diferencia entre M1 y M2 fue constante, ello de acuerdo al análisis de Bland-Altman (Figura 2). Las diferencias pueden deberse a la distribución aleatoria de la población bacteriana en cada una de las muestras, influenciada por la composición física de la misma y una mezcla inadecuada (Winward *et al.*, 2008). No obstante y de acuerdo con Ortega *et al.* (2013), cuando las diferencias entre los valores de referencia y los obtenidos por el método alternativo son constantes o mínimas se refleja en un menor sesgo. Además, habiendo analizado muestras idénticas un menor sesgo indica correspondencia entre ambas respuestas obtenidas y exactitud en los resultados del método alternativo, respecto a los valores de referencia.

## CONCLUSIÓN

El método de microdilución y cultivo por expansión en placa para el análisis de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales de leche cruda es una alternativa en sustitución a la metodología indicada por las NOM puesto que demuestra exactitud y equivalencia con los resultados del análisis convencional (NOM). Además, permite evaluar en paralelo mayor número de muestras (tratamientos y repeticiones) de leche bajo condiciones de laboratorio con menor volumen de muestra, cantidad de reactivos y material. Aspectos que reducen los costos y el tiempo en este tipo de análisis o investigaciones.

## LITERATURA CITADA

- Bennett, A., Lhoste, F., Crook, J. y Phelan, J. 2008. Futuro de la producción lechera en pequeña escala in Steinfeld, H. (ed.) Informe Pecuario 2006. Food & Agriculture Org. (FAO). 51-62.
- Boczek, L.A., Rice, E.W. y Johnson, C.H. 2014a. Total viable counts. Pour Plate Technique in Batt, C.A. (ed.) Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 625-629.
- Boczek, L.A., Rice, E.W. y Johnson, C.H. 2014b. Total viable counts. Spread plate technique in Batt, C.A. (ed.) Encyclopedia of Food Microbiology (2da Ed.), 636-637.
- Camacho, J. 2008 Coeficiente de concordancia para variables continuas. AMC. 50(4).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline. Third ed. CLSI document M23–A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cortéz, R.E. 2009. Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. Rev Colomb Obstet Ginecol. 61, 247-55.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago de Chile: Departamento de salud ambiental. Instituto de Salud Pública.
- FAO: Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. 2007. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Instituto de nutrición y tecnología de los alimentos. Universidad de Chile.
- Hanneman, S. K. 2008. Design, analysis and interpretation of method-comparison studies. AACN advanced critical care, 19(2), 223.
- Instituto nacional de estadística geografía e información (INEGI). 2010. Anuario estadístico del estado de Michoacán. 127-142
- López, A.S. y Belloso, O.M. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. International Dairy Journal, 18 (4), 329-343.
- Muehlhoff, E., Bennett, A., y McMahon, D. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 243-263.
- NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Counting of somatic cells by flowcy to metry. Disponible en internet: [www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php](http://www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php)

- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Secretaria de salud. México Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
- NOM-110-SSA-1994. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>
- NOM-113-SSA-1994. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. Secretaria de salud. México. Disponible en internet: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>
- Ortega, G.M., Rodríguez, M.C., y Zhurbenko, R. 2013. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(1), 111-121.
- Özer, B. y Yaman, H. 2014. Milk and milk products. *Microbiology of Liquid Milk in Food Science*, from *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 721-727.
- Pacheco, F. P., y Galindo, A. B. 2010. Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1205-1216.
- Rojas, R.M.R., Lammoglia, V.M.A., Daniel, R.A.I.C., Cabrera, N. y Cruz, B.E. 2014. Presencia de microorganismos en leche cruda de vaca durante la ordeña en clima tropical. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán, México del 2 al 4 de Julio de 2014. 487-491.
- Sánchez, C.C.S., y Delgado, D.R.A. 2010. Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajeno, malva olorosa). Tesis para obtener el título de; bioquímico farmacéutico. Facultad de ciencias químicas escuela de bioquímica y farmacia. Universidad de cuenca. Cuenca. Ecuador. p. 65.
- SAS: Statistical Analysis System Institute 2010. Guide for personal computers. Version 8.
- Tavolaro, P., Ferrati, A. R., Destro, M. T., Landgraf, M., y Franco, B. D. G. D. M. 2005. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3), 295-300.

- Vasquez, E.R., y Caballero, A. 2011. Inconsistencia del coeficiente de variación para expresar la variabilidad de un experimento en un modelo de análisis de varianza. *Cultivos Tropicales*, 32(3), 42-45.
- Vera, A.H., Hernández, A.L., Espinoza, G.J., Ortega, R.L., Díaz, A.E., Román, P.H., Núñez, H.G., Medina, C.M. y Ruiz, L.F. (Eds.) 2009. Producción de leche de bovino en el sistema familiar. INIFAP. CIRGOC. Libro técnico Núm. 24. Veracruz, México. 288-309.
- Vinagre, J. 2007. Capítulo 13: Calidad de métodos analíticos. FAO. 137-163.
- Winward G., L. Avery, T. Stephenson y B. Jefferson. 2008. Chlorine disinfection of grey water for reuse: Effects of organics and particles. *Water Research* 42, 483-491.

---

**Análisis de la actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Opuntia ficus-indica* y *O. atropes* y su efecto sobre bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales al adicionarlos directamente a leche cruda bovina**

**RESUMEN**

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante de extractos metanólicos de *Opuntia ficus-indica* (OFI) y *O. atropes* (OA) y determinar su efecto sobre bacterias mesófilas aerobias (BMA) y coliformes totales (CT) al adicionarse a leche cruda (LC) bovina. Se obtuvieron los extractos metanólicos de cladodios y epidermis de cladodio de OFI y OA mediante extracción en equipo Soxhlet y por maceración. En los extractos obtenidos se determinó la concentración de fenoles totales (FT), flavonoides (FL) y la capacidad para inhibir radicales DPPH, ABTS y reducir Hierro. Los extractos se adicionaron a la LC y 2 h post adición y se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) mL<sup>-1</sup> de BMA y CT. El análisis estadístico fue a través de la metodología de los Modelos lineales generalizados y las diferencias estadísticas entre grupos se obtuvieron a través del método de medias de mínimos cuadrados. La concentración de FT y FL fue mayor (P<0.05) en los extractos obtenidos por maceración que por Soxhlet, pero se encontró mayor (P<0.05) concentración de FT y FL en extractos de epidermis; igualmente estos extractos presentaron mayor actividad antioxidante y disminución de UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT (P<0.05). No obstante, que OA presentó menor concentración (P<0.05) de FT y FL que OFI, su efecto fue igual (P > 0.05) sobre las UFC de BMA y CT. Los extractos de epidermis de OFI muestran mayor capacidad antioxidante. Sin embargo, independientemente de la especie, los extractos de epidermis muestran mayor eficacia para disminuir BMA y CT en leche cruda.

**Palabras clave:** *Opuntia spp.*, extractos polares, calidad de leche, microbiología.

## ABSTRACT

The objective was evaluate the antioxidant activity of methanol extracts of *Opuntia ficus-indica* (OFI) and *O. atropes* (OA) and determine their effect on aerobic mesophilic bacteria (AMB) and total coliforms (TC) added to the bovine raw milk (RM). Methanol extracts from cladodes and epidermis of cladode of OFI and OA by means of Soxhlet equipment and maceration extraction were obtained. The concentration of total phenols (TF), flavonoids (FL) and ability to inhibit radicals DPPH, ABTS, and reduce iron in the extracts were determined. The extracts were added to the RM, 2 h post-addition and the number of colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> of AMB and TC was determined. The statistical analysis was through the methodology of generalized linear models and statistical differences between groups were obtained by means of least squares. TF and FL concentration was higher ( $P < 0.05$ ) in extracts of cladodes obtained by maceration that by Soxhlet, but higher still ( $P < 0.05$ ) was its concentration in extracts of epidermis; these extracts had higher antioxidant activity and decrease of CFU mL<sup>-1</sup> AMB and TC. However, that OA presented lower concentration ( $P < 0.05$ ) of TF and FL to OFI, its effect was the same ( $P > 0.05$ ) on the CFU of AMB and TC. Epidermis extracts of OFI show greater antioxidant capacity. However, regardless of the species extracts of epidermis, show greater efficiency to decrease AMB and TC in raw milk.

**Key words:** *Opuntia* spp., polar extracts, milk of quality, microbiology.

## INTRODUCCIÓN

El creciente interés actual por el estudio e implementación de fuentes naturales (compuestos químicos) como alternativas de sustitución de los métodos térmicos en la conservación de alimentos (López y Belloso, 2008) se debe a que este tipo de fuentes poseen propiedades acidificantes, antioxidantes y antimicrobianas (Lucera *et al.*, 2012). En general, los extractos de

plantas están siendo utilizados como aditivos antimicrobianos para prolongar la vida de anaquel de los alimentos (Sauceda, 2011); puesto que, han demostrado actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos patógenos de humanos que crecen en alimentos (Gyawali y Ibrahim 2014). Así, por ejemplo, la adición directa de extractos de plantas (en forma líquida o en polvo) a la leche, productos lácteos y otros alimentos es efectivo para reducir la carga bacteriana de estos productos y ha probado ser el método con mayor capacidad para mejorar la calidad bacteriológica de los alimentos hasta ahora probado (Cava *et al.*, 2007 citado por; Lucera *et al.*, 2012; Gyawali y Ibrahim 2014).

Ortiz *et al.* (2013) al evaluar el efecto de la adición directa de nopal molido, mucílago, y epidermis de nopal (en porcentajes de 0.5, 1.0 y 2% con base a 100 mL de leche) a la leche cruda, sobre las unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) de bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales, encontraron una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) de dichas bacterias, 2 h después de la adición de nopal (*O. ficus-indica*) a la leche cruda; ello, en comparación con el testigo (leche cruda sin adición de nopal). Resultados trascendentes dentro de la seguridad alimentaria y la problemática de salud pública, puesto que el contenido nutricional de la leche hace de este alimento un medio para el crecimiento de microorganismos patógenos (Muehlhoff *et al.*, 2013). Por ello, México estableció y fomentó la aplicación de las normas oficiales donde se especifica las características sanitarias y nutrimentales que debe cumplir la leche para considerarla apta para consumo humano (Fuentes *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a la idiosincrasia, economía y escasa tecnología presentes en las zonas rurales del país, la producción de leche y elaboración de subproductos lácteos se comercializan sin tener en cuenta dichas normas y los riesgos de salud pública que pueda generar la venta de este producto y sus derivados (Moreno *et al.*, 2012).

En el país, la producción de leche de bovinos asciende a 12 millones de litros año<sup>-1</sup>, aproximadamente y, de esta cantidad, la ganadería a escala familiar aporta 9.4% de la producción de leche (3.000 kg cabeza<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) a nivel nacional (Vera *et al.* 2009; SIAP, 2011), producción que abastece al 50% de las queserías de tipo artesanal (Garcés *et al.*, 2005). Sin embargo, la producción de leche y elaboración de productos lácteos, en este tipo de sistemas (familiar), se realiza y comercializa bajo escasa tecnificación y prácticas de higiene (Moreno *et al.*, 2012; Arriaga *et al.*, 2013). Aspectos que representan el principal riesgo hacia la salud del consumidor (Rojas *et al.*, 2014). Aunado a ello, a este tipo de sistemas (pequeños productores) les resulta inviable la inversión en un tanque enfriador o cubrir los costos que genera enfriar y/o hervir la leche (Muehlhoff *et al.*, 2013). Tal vez por ello, en las zonas rurales y marginales de México es común que se utilice la leche cruda sin refrigeración o pasteurización para el consumo o la elaboración de subproductos lácteos (Rojas *et al.*, 2014). Por lo que es inminente el establecimiento de estrategias que, permitan reducir la contaminación bacteriana de la leche y sus subproductos y con ello, incrementar la calidad bacteriológica de este tipo de productos y acercar a los sistemas familiares de producción de leche, a los estándares de calidad que exigen las NOM y dejen de ser un riesgo para la salud pública.

Una estrategia viable para la problemática descrita en los párrafos anteriores, puede ser el uso de extractos de nopal. Puesto que, la adición de fragmentos de esta cactácea a la leche cruda ha logrado disminuir la carga bacteriana de mesófilas aerobias y coliformes totales en leche cruda (Ortiz *et al.*, 2013). Por lo que, posiblemente este efecto se deba a que los cladodios, como todas las partes de la planta de nopal (*O. ficus-indica*), son ricos en compuestos fenólicos, principalmente en flavonoides y ácidos fenólicos (Ahmed *et al.*, 2005; De Leo *et al.*, 2010; Ammar *et al.*, 2012), mismos que han demostrado poseer funciones biológicas tales como: actividad antioxidantes, antiviral y antibacteriana (bactericida y bacteriostático) (Kahdem y

Marles, 2010). Los fenoles, por ejemplo, poseen potencial antioxidante; actividad que se relaciona con procesos anti-inflamatorios, hipoglucémicos, anti-microbianos y neuro-protectores (Mostafa *et al.*, 2014). Además, se ha evidenciado la existencia de la correlación entre el contenido de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y actividad antibacteriana (Leyva *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014). Por ello, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante de extractos metanólicos de *O. ficus-indica* y *O. atropes* y el efecto de su adición a leche cruda bovina sobre su microbiología, específicamente mesófilas aerobias y coliformes totales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de cladodios de nopal se obtuvieron en Morelia Michoacán México, los cladodios pertenecían a las especies *O. ficus-indica* y *O. atropes*. Los cladodios de ambas especies provenían de dos parcelas: en la primera parcela o parcela con prácticas culturales (PCP), se cultivaba *O. ficus-indica*; las prácticas culturales, en esta parcela, fueron: control de arvenses, poda de formación y saneamiento. En la segunda parcela o parcela sin prácticas culturales (PSP), se cultivaban tanto *O. ficus-indica* como *O. atropes*. La colecta de los cladodios se realizó en el mes de marzo. Las características climáticas de la región donde se encontraban las parcelas son: templado, sub-húmedo, con temperatura media anual entre 18.6°C y precipitación de 786 mm (INEGI, 2010), aspectos que lo ubican dentro de la clasificación climática Cw de acuerdo con García (1998).

Las muestras de cladodios elegidas para la extracción de fenoles totales correspondieron al cuarto nivel: 0 a la base del nopal, 1 al primer cladodio (del suelo hacia arriba) y así sucesivamente (Santos *et al.*, 1990). El procedimiento de la recolección de cladodios fue como sigue: de cada especie y en cada parcela se identificó una planta para obtener una muestra de cladodio (4<sup>to</sup> nivel)

al azar por planta. Por lo que se formaron tres grupos de cladodios: grupo 1 (27 cladodios de *O. ficus-indica* en PCP), grupo 2 (17 cladodios de *O. ficus-indica* en PSP) y grupo 3 (29 cladodios de *O. atropes* en PSP). Cada cladodio de cada grupo se identificó, pesó (g) y midió (ancho, largo y grueso). Para obtener el peso de cada cladodio se utilizó una báscula digital (DESEGO; modelo 303D para 3000g), para medir las dimensiones del cladodio se utilizó una cinta métrica (cm). Y fueron lavados antes de ser procesados, con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, seguido de un lavado con agua destilada para retirar los residuos de hipoclorito de sodio.

### EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Posterior al lavado de los cladodios la mitad de cada grupo, se cortaron en trozos de 2 cm<sup>3</sup> para obtener los extractos de estas cactáceas. Al resto de cladodios, se les retiró la epidermis con un pelador manual. Tanto los trozos de cladodios como la epidermis se deshidrataron a 40°C por 72 y 24 h, respectivamente. Deshidratadas las muestras se molieron en mortero de porcelana hasta obtener polvo para mezclar y homogenizar de acuerdo al tipo de muestra (cladodio o epidermis) y grupo de cladodios (especie y tipo de parcela). Con las muestras deshidratadas se formaron seis grupos (G) para obtener los extractos metanólicos: G1 y G2; cladodios y epidermis de *O. ficus-indica*, respectivamente; provenientes de PCP, G3 y G4; cladodios y epidermis de *O. ficus-indica*, respectivamente; provenientes de PSP, G5 y G6 cladodios y epidermis de *O. atropes*, respectivamente; provenientes de PSP. Las muestras se almacenaron a – 4°C en obscuridad.

Las extracciones de los compuestos fenólicos se realizaron por dos métodos de acuerdo a la metodología descrita por Raaman (2006): extracción en equipo Soxhlet y extracción por maceración. Se obtuvieron nueve extractos en total que se agruparon por parcela de origen (PCP o PSP), especie (*O. ficus-indica* o *O. atropes*), tipo de muestra (cladodio o epidermis de cladodio) y método de extracción (Soxhlet o maceración) (Tabla 1). En ambos métodos las extracciones

fueron sucesivas utilizando n-hexano, cloroformo y metanol, en este orden (Raaman, 2006). Para ambos métodos se utilizaron 5 g de muestra (cladodio o epidermis de cladodio) y, para la extracción por Soxhlet se requirieron de 150 mL de cada solvente en ebullición, misma que duró 5 horas; mientras que, para el método por maceración se utilizaron 50 mL de cada solvente y un agitador orbital (Thermo Scientific MaxQ), para que se mezclaran, la muestra y el solvente, durante tres días a temperatura ambiente (25°C); entre cada cambio de solvente, se filtró el extracto con papel Whatman (no. 4) y se agregaba a la muestra el siguiente solvente. Una vez concluida la extracción, esta se almacena en oscuridad a - 4°C.

**Tabla 1.** Extractos de metanólicos agrupados por tipo de muestra, especie, método de extracción y parcela de origen.

Grupo	Muestra y Metodología	Especie y Parcela	Abreviación
1	Cladodio Soxhlet	<i>O. ficus indica</i> PCP	CFICPS
2		<i>O. ficus indica</i> PSP	CFISPS
3		<i>O. atropes</i> PSP	CASPS
4	Cladodio Maceración	<i>O. ficus indica</i> PCP	CFICPM
5		<i>O. ficus indica</i> PSP	CFISPM
6		<i>O. atropes</i> PSP	CASPM
7	Epidermis Maceración	<i>O. ficus indica</i> PCP	EFICPM
8		<i>O. ficus indica</i> PSP	EFISPM
9		<i>O. atropes</i> PSP	EASPM

PCP= parcela con prácticas culturales, PSP= parcela sin prácticas culturales.

## DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES EN EXTRACTOS METANÓLICOS

Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron únicamente en los extractos metanólicos, siguiendo la metodología descrita por Makkar (2003). La mezcla de reacción consistió en: 550 µL de agua destilada; 50 µL de extracto y 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (FC; Sigma Aldrich®). 8 min después de iniciada la reacción de oxidación, se agregaron 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para dejar reposar por 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se tomó la lectura de absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis Nanodrop 2000C®), con su respectivo blanco. Para la determinación de los valores de fenoles totales, en extractos, se

construyó una recta de ácido gálico (AG) partiendo de una solución con  $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  de AG. Se midió absorbancia a diferentes concentraciones con 6 repeticiones por concentración. Los valores se midieron en  $\mu\text{g}$  equivalentes a ácido gálico (EAG)  $\mu\text{L}^{-1}$  (Makkar, 2003); para ello, se estimó el valor EAG ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) con base a los promedios de absorbancia por concentración analizada. Esto se realizó por medio de los estimadores de la regresión lineal (Freund y Littell, 1991; SAS, 2008); donde  $\beta_0$  fue igual a 0.511 ( $P < 0.001$ ) y  $\beta_1$  fue de 23.117 ( $P < 0.001$ ), lo que significó que por cada unidad de absorbancia (nm) se incrementa en  $23.117 \mu\text{g EAG } \mu\text{L}^{-1}$ . Los valores obtenidos se expresaron como  $\text{mg EAG mL}^{-1}$  de extracto.

### **CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS METANÓLICOS**

Para la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos, se repitió la extracción de acuerdo a la metodología previamente reportada por Raaman (2006); con algunas modificaciones; en ambos métodos de extracción se utilizaron 1.25 g de muestra cladodio o epidermis). En el método por maceración, la muestra fue macerada en 25 mL de cada solvente (n-hexano, cloroformo y metanol) por 12 h. Mientras que en la extracción en Soxhlet se utilizó 150 mL de cada solvente: El contacto de cada solvente con la muestra fue por 2 horas. Inmediatamente después, 6 mL de cada extracto metanólico se colocaron en una caja de Petri e introdujeron en una estufa eléctrica a  $45^\circ\text{C}$  por 5 horas, con el objetivo de que se evaporara el metanol y resuspender el extracto concentrado en agua destilada. Los extractos acuosos se purificaron en una columna cromatográfica de cristal (25x2 cm), se utilizó amberlite XAD-16 como fase estacionaria, agua destilada para eluir los compuestos no fenólicos y etanol (96%) para recuperar el extracto fenólico concentrado (Lee *et al.*, 2004). El volumen de extracto fenólico purificado fue de 4 mL.

## FENOLES TOTALES

Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron de acuerdo a la metodología propuesta por Makkar (2003). Se construyó una recta de ácido gálico (AG) de 0.02 a 0.150 mg mL<sup>-1</sup> de AG, partiendo de una solución stock a una concentración de 0.200 mg mL<sup>-1</sup>. La mezcla de reacción para cada concentración y muestra consistió en: 250 µL de muestra, 250 µL de Folin-Ciocalteu (FC; Sigma-Aldrich®) y 250 µL de Carbonato de Sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). La mezcla se incubó en baño María a 40°C por 30 minutos. Se agregaron 2 mL de agua destilada y se tomó lectura de absorbancia a 750 nm. Los valores de las muestras se expresaron como mg equivalente a ácido gálico (EAG) mL<sup>-1</sup>, para ello, se estimó el valor de mg EAG mL<sup>-1</sup> de las muestras con base a los promedios de absorbancia de las concentraciones de la recta analizada, esto por medio de los estimadores de la regresión lineal (Freund y Littell, 1991; SAS, 2008) donde β<sub>0</sub> fue igual a 0.00533 (P < 0.001) y β<sub>1</sub> fue de 0.08454 (P<0.001), lo que significó que por cada unidad de absorbancia (nm) se incrementa en 0.08454 mg EAG mL<sup>-1</sup>. Se utilizaron tres repeticiones de muestra y concentración de AG. Las concentraciones de 0.020 a 0.150 mg mL<sup>-1</sup> de AG se almacenaron para las pruebas de actividad antioxidante; DPPH y FRAP.

## FLAVONOIDES TOTALES

La determinación de los flavonoides totales se realizó de acuerdo al método descrito por Liu *et al.* (2002). Se construyó una recta de Quercetina (Q) de 0.050 a 0.600 mg a partir de una solución de 1 mg mL<sup>-1</sup>. 150 µL de cada concentración o muestra se mezcló con 150 µL de nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>; 5%), después se adicionó 150 µL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>; 10%) y 1 mL de hidróxido de sodio (NaOH; 1 M), homogenizada la mezcla se tomó lectura de la absorbancia a 510 nm. Para cada concentración y muestra se utilizaron tres repeticiones. Los valores de las muestras se calcularon a partir de los promedios de absorbancia de las concentraciones de la recta

analizada, esto por medio de los estimadores de la regresión lineal (Freund y Littell, 1991; SAS, 2008); donde  $\beta_0$  fue igual a 0.046 ( $P < 0.001$ ) y  $\beta_1$  fue de 0.813 ( $P < 0.001$ ), lo que significó que por cada unidad de absorbancia (nm) se incrementa en 0.813 mg de Q. Los resultados se expresados en mg equivalentes a Q (EQ)  $\text{mL}^{-1}$ .

### **CAPTACIÓN DE RADICALES DPPH**

La prueba de captación de radicales DPPH se determinó por la metodología descrita por Randhir y Shetty (2007) con modificaciones; 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra y concentración de la recta de AG fueron mezclados con 2.95 mL de solución de DPPH-60 mM (en metanol) y se homogenizó, después de 30 minutos en obscuridad, y se midió la absorbancia a 517 nm. Con los valores de absorbancia se determinó el porcentaje de inhibición por medio de la siguiente ecuación;  $\text{Inhibición (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$  (Marinova y Batchvarov, 2011). Los valores EAG ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) de las muestras se obtuvieron con los promedios de inhibición (%) de la recta por medio de la regresión lineal (Freund y Littell, 1991; SAS, 2008); donde  $\beta_0$  fue igual a 0.012 ( $P < 0.001$ ) y  $\beta_1$  fue de 0.002 ( $P < 0.001$ ); por cada 1% de inhibición se incrementa en 0.012 mg EAG  $\text{mL}^{-1}$ . Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición por mg EAG  $\text{mL}^{-1}$ .

### **CAPTACIÓN DE RADICALES ABTS**

La prueba de captación de radical ABTS se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Re *et al.* (1999); se preparó una solución stock de ABTS (2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid-2 $\text{NH}_4$ ) 7 mM y persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 2,45 mM (2:1 v/v), se reposó por 12 h a temperatura ambiente. Y después se ajustó la solución stock con etanol absoluto hasta alcanzar una absorbancia de  $0.700 \pm 0.002$  nm. Se preparó una recta de Trolox (Ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) de 0.020 a 0.100 mg a partir de una solución stock de

0.200 mg. El proceso para cada concentración de Trolox y muestra fue el siguiente; en la celdilla del espectrofotómetro se colocó 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración de Trolox o muestra y se agregó 950  $\mu\text{L}$  del reactivo ABTS y se midió absorbancia a 734 nm. Con los valores de absorbancia se determinó el porcentaje de inhibición ( $\text{Inhibición (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$ ) (Marinova y Batchvarov, 2011). Los valores de mg equivalentes a trolox (ET)  $\text{mL}^{-1}$  de las muestras se obtuvieron con los promedios de inhibición (%) de la recta por medio de la regresión lineal (Freund y Littell, 1991; SAS, 2008) donde  $\beta_0$  fue igual a 0.006 ( $P < 0.001$ ) y  $\beta_1$  fue de 0.001 ( $P < 0.001$ ); por cada 1% de inhibición se incrementa en 0.006 mg ET. Los resultados fueron expresados en inhibición (%) por mg ET  $\text{mL}^{-1}$ .

### **HABILIDAD REDUCTORA DE HIERRO**

El método de Gow y Hui (1995) fue adaptado para determinar la habilidad reductora de hierro del plasma (FRAP; siglas en ingles) en las muestras. 50  $\mu\text{L}$  de cada concentración de AG y muestra fue mezclado con 120  $\mu\text{L}$  de amortiguador de fosfato (0.1 M, pH 6.9). Después se adicionó 120  $\mu\text{L}$  de ferricianuro de potasio, la mezcla se homogenizó e incubo a 50  $^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Después se adiciono 120  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacetico (10%), seguido de 410  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 100  $\mu\text{L}$  de cloruro férrico. Finalmente la mezcla se homogenizó y la absorbancia fue medida a 700 nm. Se estimó los valores de las muestras EAG ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), con base a los promedios de absorbancia de las concentraciones de la recta de AG analizada (Freund y Littell, 1991; SAS, 2008); donde  $\beta_0$  fue igual a 0.001 ( $P < 0.001$ ) y  $\beta_1$  fue de 0.069 ( $P < 0.001$ ), lo que significó que por cada unidad de absorbancia (nm) se incrementa 0.069 mg EAG. Los resultados fueron expresados como mg EAG  $\text{mL}^{-1}$ .

## LECHE CRUDA DE BOVINOS

La leche cruda (LC) se obtuvo del sector de productos lácteos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH, ubicada en el Kilómetro 9.5 de la carretera Morelia-Zinapécuaro. Michoacán. Para las pruebas bacteriológicas se ocupó un total de 75 mL de leche cruda para formar 15 grupos (1 mL muestra<sup>-1</sup>): 9 grupos a los cuales se les adicionó los extractos (extracto/grupo) (Tabla 1). Los 6 grupos de muestras restantes se ocuparon como testigos: 3 para adición de 200 µL de agua destilada estéril y 3 sin adición de agua o extractos. La adición de extractos metanólicos a leche cruda de bovinos, se realizó con dosis iguales de Fenoles Totales: 50 µg EAG de cada muestra. Para ello y para retirar el metanol, se concentró el volumen de extracto necesario con base en los valores de Fenoles Totales encontrado en cada extracto (Tabla 2), en un evaporador giratorio acoplado a una bomba de vacío hasta obtener una completa sequedad del extracto. El extracto concentrado se disolvió en 200 µL de agua destilada estéril (dosis<sup>-1</sup>), esto de acuerdo a la metodología descrita por Tolosa y Cañizares (2002), este procedimiento se realizó con un volumen para 36 dosis de cada extracto. A cada muestra (1 mL) de leche cruda se le adicionó directamente la dosis de extracto diluido en agua (50 µg en 200 µL de H<sub>2</sub>O). Todas las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente (25°C) por 2 h después de la adición del extracto.

## ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE

El análisis microbiológico de la leche cruda se realizó por microdilución y siembra por expansión, técnicas adaptadas de la metodología descrita por la CLSI (2007) y Boczek *et al.* (2014). Se prepararon 90 cajas de Petri: 45 con agar cuenta estándar para el conteo de bacterias mesófilas aerobias (BMA) y 45 con agar bilis rojo violeta para el conteo de Coliformes totales (CT). La preparación de los medios de cultivo fue de acuerdo a las indicaciones del proveedor y

se dejaron solidificar hasta sequedad 20 min antes del cultivo. Todas las cajas de Petri se dividieron en tres áreas con un marcador por la parte inferior para cultivar una dilución por área (tres diluciones caja<sup>-1</sup>). La microdilución se realizó a partir de muestras homogéneas de 1 mL de leche cruda, diluyendo 100 µL de muestra en 900 µL de agua peptonada en cada dilución, hasta la dilución 10<sup>-5</sup>. Para el cultivo se inoculó 5 µL de cada dilución en el área correspondiente del agar ya solidificado. Para el conteo de BMA, se cultivaron las diluciones 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup> en agar cuenta estándar y para el conteo de CT se cultivaron las diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> en agar bilis rojo violeta. En cada área se rotuló la dilución cultivada. Para lograr la siembra por expansión del inóculo (5 µL) se realizaron 12 movimientos: primero seis de izquierda a derecha y después de girar la caja Petri 90° se repiten seis movimientos de izquierda a derecha, evitando la mezcla entre inóculos de diferente dilución. Después se dejó absorber el inóculo hasta sequedad para invertir las cajas y así incubarlas a 35°C. El conteo de UFC para ambos tipos de bacterias, se realizó de 12 a 15 h de incubación.

Con la información recabada se elaboró una base de datos para su análisis estadístico, previa transformación de los valores a UFC mL<sup>-1</sup> (log<sub>10</sub>), a través de la metodología de los Modelos lineales generalizados (GLM, siglas en inglés) (SAS, 2000) y las diferencias estadísticas entre grupos se obtuvieron mediante el método de medias de mínimos cuadrados (Lsmeans, siglas en inglés). Para ello, se utilizó el paquete estadístico SAS (2000). Las correlaciones de variables cuantitativas y cualitativas se obtuvieron por la metodóloga de correlaciones de Pearson y el estadístico omega cuadrado ( $\omega^2$ ) de Hays, respectivamente (Keppel y Wickens 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de fenoles totales (FT) en los extractos metanólicos de nopal en ambas especies (*O. ficus-indica* y *O. atropes*) se realizó para ajustar todos los extractos a una dosis de 50 µg en 200 µL<sup>-1</sup> de agua destilada, con el fin de evaluar la bioactividad de estos extractos; estableciendo, principalmente, su actividad antioxidante y antimicrobiana (Parsaeimehr *et al.*, 2010). Debido a que las investigaciones han mostrado que los extractos de cladodios de *O. ficus-indica* poseen dicha actividad (Kaur *et al.*, 2012), misma que está determinada por la concentración de compuestos fenólicos. Al respecto, se encontró efecto de grupo ( $P < 0.0001$ ) sobre la concentración (µg µL<sup>-1</sup>) de FT (Tabla 2). De manera general, se ha observado que la cantidad de FT está relacionada con la especie (Verporte y Memelink, 2002), estructura o parte de la planta utilizada (pulpa, cáscara, epidermis o tallo) en la extracción (Parashar *et al.*, 2014, Longo y Vasapollo 2006) y, por el método de extracción utilizado, en cual puede variar en tiempo de extracción y temperatura (Heras *et al.*, 2013).

**Tabla 2.** Fenoles totales de extractos metanólicos de cladodios y epidermis de *O. ficus-indica* y *O. atropes* de acuerdo al grupo.

Grupo	Método	Muestra	Especie y parcela	Fenoles totales <sup>1</sup>
1		Cladodio	OFI/PCP	0.188 <sup>a</sup> ± 0.020
2	Soxhlet	Cladodio	OFI/PSP	0.110 <sup>b</sup> ± 0.024
3		Cladodio	OA/PSP	0.145 <sup>c</sup> ± 0.016
4		Cladodio	OFI/PCP	0.268 <sup>d</sup> ± 0.043
5		Cladodio	OFI/PSP	0.263 <sup>d</sup> ± 0.024
6	Maceración	Cladodio	OA/PSP	0.174 <sup>a</sup> ± 0.048
7		Epidermis	OFI/PCP	0.500 <sup>e</sup> ± 0.040
8		Epidermis	OFI/PSP	0.569 <sup>f</sup> ± 0.030
9		Epidermis	OA/PSP	0.348 <sup>g</sup> ± 0.033

<sup>1</sup>= mg EAG mL<sup>-1</sup> de extractos sin purificar; OFI= *O. ficus-indica*, OA= *O. atropes*, PCP= parcela con prácticas culturales; PSP= parcela sin prácticas culturales.

Literales <sup>a, b, c, d, e, f</sup> indican diferencias ( $P < 0.05$ ) dentro de columna.

De acuerdo con los valores consignado en la Tabla 2, el método de extracción que generó mayor cantidad de FT fue por maceración ( $P < 0.05$ ) y, dentro de este método, la muestra con mayor contenido de FT fue la epidermis ( $P < 0.05$ ) de *O. ficus-indica* cultivada en parcela sin prácticas

culturales ( $0.569 \pm 0.030$  mg EAG mL<sup>-1</sup>), seguido de *O. ficus-indica* cultivada en parcela con prácticas culturales ( $0.500 \pm 0.040$  mg EAG mL<sup>-1</sup>). Respecto a la mayor eficiencia en la obtención de FT por el método de maceración, posiblemente se debió a que en éste la extracción se realiza a temperatura ambiente (Contini *et al.*, 2008), ello en comparación con el método de extracción en equipo Soxhlet, el cual requiere de temperaturas superiores a 64°C para que el metanol se vaporice (Autino *et al.*, 2013). En este sentido, la temperatura juega un papel importante en el grado de obtención de FT, puesto que los compuestos fenólicos se biodegradan o biotransforman a temperaturas altas ( $\geq 60^\circ\text{C}$ ) (Orphanides *et al.*, 2013); hecho que explicaría los resultados de la presente investigación en relación a la menor efectividad del método Soxhlet en la obtención de FT. Mientras que, las mayores concentraciones de FT encontradas en extractos de epidermis de cladodio ( $P < 0.05$ ), ello concuerda con Moussa *et al.* (2014), quienes encontraron mayor cantidad de FT en de cáscara del fruto de *O. ficus-indica* (Tuna) en comparación con las concentraciones obtenidas en la pulpa de esta cactácea. Esta mayor producción de FT obtenida en la cáscara de los frutos o en la epidermis de verduras posiblemente se deba a que estas partes son la primer barrera de defensa contra insectos, microorganismos, predadores y factores ambientales adversos (Aguirre *et al.*, 2013).

Con respecto a las cantidades de FT encontradas en cada grupo analizado (Tabla 2), estas fueron menores a lo reportado por otros investigadores: Moussa *et al.* (2014), observaron que en extractos de cladodios de *O. ficus-indica* la concentración de FT fue entre 9.0 a 11.0 mg EAG mL<sup>-1</sup>; Guevara *et al.* (2010), encontraron en la misma especie de cactácea 17.8 a 19.9 mg EAG mL<sup>-1</sup>. Mientras que Cai *et al.* (2010), determinaron que en extractos de epidermis de cladodio la concentración de FT, bajo el método de soxhlet, fue de 5.550 mg EAG mL<sup>-1</sup>. Posiblemente ello se debió a factores tales como: edad de los cladodios utilizados para la extracción de estos compuestos (Salgado *et al.*, 2008). Guevara *et al.* (2010), analizaron cladodios inmaduros y para

consumo humano (de 8 a 17 cm de longitud). Mientras que los cladodios analizados en esta investigación fueron de la variedad forrajera y su longitud fue de 40 cm en promedio. Al respecto, Pérez *et al.* (2014) encontraron que las concentraciones de FT dependen de la madurez de las plantas con las que se pretende realizar la extracción, siendo las plantas maduras quienes presentan menor concentración de FT y flavonoides en comparación con las inmaduras o más jóvenes. Así mismo, la especie y variedades de las plantas son factores que determinan la cantidad de FT obtenidos de los extractos metanólicos (Nerd *et al.*, 2002).

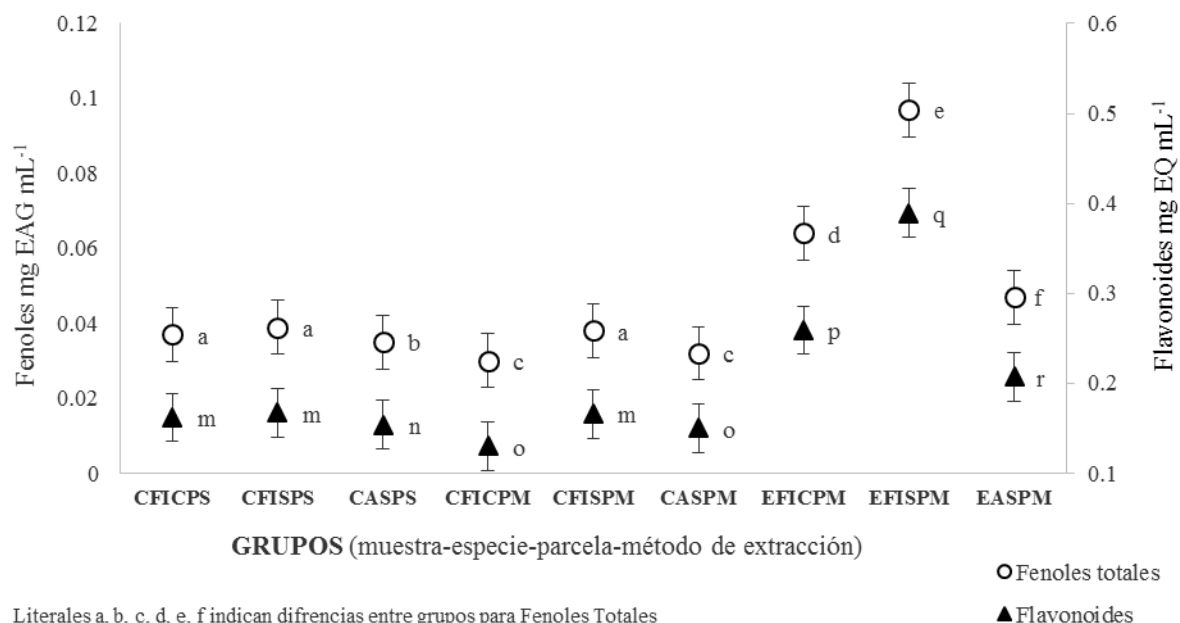
Otros factores que también pueden influir, en la concentración de FT de los extractos metanólicos, son: el origen agroecológico (Hernández *et al.*, 2011; Moussa *et al.*, 2014) y, las características bromatológicas de las plantas (Lozano, 2011). No obstante, un factor que pudiera explicar las diferencias en las concentraciones de FT obtenidas en la presente investigación y las observadas por los investigadores anteriormente citados, es el método de deshidratación de las muestras; puesto que Moussa *et al.* (2014) y Guevara *et al.* (2010) deshidrataron sus muestras por el método de liofilización; proceso que permite reducir la pérdida de componentes volátiles o termo-sensibles si se compara con los métodos de deshidratación en donde se requiere de temperaturas mayores a las del medio ambiente (Ramírez, 2006). En este sentido, el método de deshidratación de las muestras empleadas en esta investigación fue mediante temperaturas de 45°C. Puesto que Toor *et al.* (2006), establecieron que la deshidratación de las muestras a temperaturas menores a 65°C los compuestos fenólicos y flavonoides se conservan. Sin embargo, para Conde *et al.* (2010), la principal causa de la variabilidad en los resultados en torno a las concentraciones de FT en plantas se debe al solvente de extracción y método de cuantificación utilizado en los análisis de estos compuestos. Así por ejemplo, Mousa *et al.* (2014) utilizaron metanol al 70%, mientras que en este trabajo se utilizó metanol al 100%. Con respecto a la cuantificación, los investigadores citados lo realizaron directamente por cromatografía líquida de

alta eficacia (HPLC; siglas en inglés), mientras que en esta investigación fue por espectrofotometría.

Por último, las diferencias en la concentración de FT de acuerdo al grupo analizado (Tabla 2) pudieron deberse a factores relacionados con las características propias de cada especie (Nerd *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2011), puesto que los extractos obtenidos de cladodios de *O. atropes* y *O. ficus-indica* provenían de la misma parcela (PSP); es decir, estaban bajo condiciones agroecológicas iguales. Hecho contrario sucedió con la cantidad de FT obtenidos de los extractos de epidermis de *O. ficus-indica* provenientes de parcelas diferentes:  $0.500 \pm 0.040$  mg EAG mL<sup>-1</sup>, en PCP y  $0.569 \pm 0.030$  mg EAG mL<sup>-1</sup>, en PSP; valores diferentes entre sí ( $P < 0.05$ ) que pueden atribuirse a las condiciones agroecológicas de cada parcela (Jaafar *et al.*, 2012). Heath (2002), observó que la exposición de las plantas a los factores ambientales adversos, como factores abióticos o presencia de patógenos, estimulan la producción y liberación de metabolitos secundarios. Así, por ejemplo, la poda de formación y saneamiento aplicada en las parcelas con prácticas culturales estimula de producción de FT en cladodios de *Opuntia* spp, debido a que la producción y liberación de metabolitos secundarios se inicia por daño mecánico sufrido por la planta (Thatcher *et al.*, 2005; Wiermer *et al.*, 2005).

En el caso de FT y flavonoides obtenidos de extractos metanólicos purificados de los grupos analizados, los extractos de epidermis de cladodios de ambas especies (*O. ficus-indica* y *O. atropes*) mostraron la misma tendencia (Figura 1) que en las concentraciones de FT obtenidos de extractos no purificados (Tabla 2), puesto que estos mostraron mayor concentración de dichos compuestos:  $> 0.047$  mg EAG mL<sup>-1</sup>, para el caso de FT y  $> 0.207$  mg EQ mL<sup>-1</sup>, para flavonoides (Figura 1). Sin embargo, la concentración de flavonoides, en todos los extractos, fue mayor ( $P < 0.05$ ) en comparación a la concentración de FT: 0.130 a 0.389 mg EQ mL<sup>-1</sup> de flavonoides vs 0.030 a 0.097 mg EAG mL<sup>-1</sup> de FT. Respecto a las concentraciones de flavonoides por grupo

analizado, los extractos de *O. ficus-indica* presentaron mayor cantidad de estos compuestos (0.166 a 0.389 mg EQ mL<sup>-1</sup> de flavonoides), respecto a los extractos de *O. atropes*: 0.150 a 0.207 mg EQ mL<sup>-1</sup> de flavonoides (Figura 1).



Literales a, b, c, d, e, f indican diferencias entre grupos para Fenoles Totales

Literales m, n, o, p, q, r indican diferencias entre grupos para Flavonoides

**CFICPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFISPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CASPS**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFICPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **CFISPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **CASPM**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EFICPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **EFISPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EASPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración.

**Figura 1.** Fenoles totales (mg EAG mL<sup>-1</sup>) y flavonoides (mg EQ mL<sup>-1</sup>) obtenidos en extractos metanólicos de acuerdo al grupo.

La variabilidad que muestran los resultados consignados en la Figura 1, concuerdan con lo observado por Guevara *et al.* (2010), quienes establecen que la concentración tanto de FT como de flavonoides en cladodios de *O. ficus-indica* es variable, debido a aspectos relacionados con la especie de la planta; generalmente, los cladodios de variedades comerciales de *O. ficus-indica* tienen mayor concentración de flavonoides en comparación a variedades silvestres (2.5 a 9.9 y

0.5 a 3.9 mg EQ mL<sup>-1</sup> de flavonoides, respectivamente). Sin embargo, dichas diferencias también las encontraron entre las mismas variedades comerciales y entre variedades silvestres. Por ejemplo, las variedades comerciales *blanco* y *manso*, la primera presentó una concentración de 9.9 mg EQ mL<sup>-1</sup> de flavonoides, mientras que en la variedad *manso* se encontraron 5.9 mg EQ mL<sup>-1</sup> de flavonoides (Guevara *et al.*, 2010). Estos resultados y los encontrados en esta investigación sugieren que la concentración de fenoles totales y flavonoides entre variedades y especies dentro del género *Opuntia* es heterogénea.

Para determinar la actividad antioxidante de los extractos purificados se determinó la capacidad de inhibición de radicales DPPH, ABTS y la habilidad de reducción de hierro (FRAP; siglas en inglés) (Tabla 3 y Figura 2, 3, 4, 5). En este sentido se encontró que todos los extractos analizados presentaron inhibición de los radicales DPPH y ABTS. No obstante, los extractos de cladodio obtenidos por el método Soxhlet y maceración mostraron menor capacidad para inhibir DPPH ( $P < 0.05$ ):  $\leq 10.6 \pm 1.0$  % de inhibición por  $0.030 \pm 0.002$  mg EAG mL<sup>-1</sup>.

Mientras que, en la inhibición de ABTS los extractos de cladodios de *O. ficus-indica* provenientes de PCP y *O. atropes* proveniente de PSP, obtenidos por maceración, presentaron menor inhibición ( $P < 0.05$ ) de éste radical ( $71.4 \pm 0.9\%$  con  $0.077 \pm 0.001$  mg ET mL<sup>-1</sup> y  $72.8 \pm 0.6\%$  con  $0.079 \pm 0.001$  mg ET mL<sup>-1</sup>, respectivamente), en comparación con el resto de los grupos analizados (Tabla 3, Figura 3). Por lo que la capacidad de inhibición de radicales DPPH y ABTS fue mayor en los extractos de epidermis de *O. ficus-indica* y *O. atropes* provenientes de PSP, en ese orden (Tabla 3, Figura 2, 3).

En relación a la inhibición de DPPH los resultados de Salem *et al.* (2006) concuerda parcialmente, puesto que en esta investigación el mayor porcentaje de inhibición de éste radical fue de 15% con 0.045 mg EAG mL<sup>-1</sup>, mientras que los investigadores citados observaron una

inhibición del 50% con la misma concentración (0.045 mg EAG mL<sup>-1</sup>) en extractos metanólicos de *O. ficus-indica* var. *Saboten*. Dok-go *et al.* (2003), reportaron inhibición de DPPH del 50% con 0.010 a 0.042 mg EAG mL<sup>-1</sup> de extractos metanólicos de frutos y cladodios de *O. ficus-indica* var. *Saboten*; estableciendo además la identificación de los siguientes flavonoides: Quercentina, dihidroquercetina y quercentina-3-metiléter, en dichos extractos.

**Tabla 3.** Inhibición de radical DPPH, ABTS y poder reductor de Hierro de extractos metanólicos purificados de acuerdo a grupo.

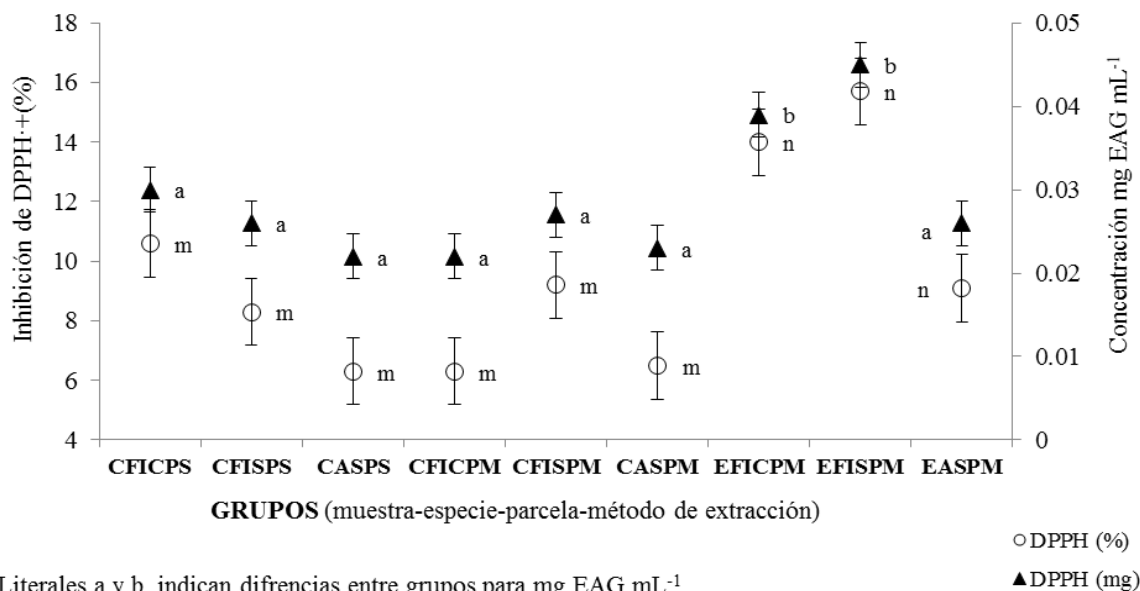
Grupo	Abreviación	Capacidad antioxidante (%) por mg EAG o ET				
		DPPH (%)	DPPH (mg)	ABTS (%)	ABTS (mg)	FRAP (mg)
1	CFICPS	10.6 <sup>a</sup> ± 1.0	0.030 <sup>a</sup> ± 0.002	86.1 <sup>a</sup> ± 1.0	0.094 <sup>a</sup> ± 0.002	0.025 <sup>a</sup> ± 0.001
2	CFISPS	8.3 <sup>a</sup> ± 1.5	0.026 <sup>a</sup> ± 0.003	84.2 <sup>b</sup> ± 1.6	0.092 <sup>b</sup> ± 0.002	0.025 <sup>a</sup> ± 0.001
3	CASPS	6.3 <sup>a</sup> ± 0.6	0.022 <sup>a</sup> ± 0.001	75.9 <sup>c</sup> ± 0.9	0.082 <sup>c</sup> ± 0.001	0.023 <sup>a</sup> ± 0.002
4	CFICPM	6.3 <sup>a</sup> ± 1.1	0.022 <sup>a</sup> ± 0.002	71.4 <sup>d</sup> ± 0.9	0.077 <sup>d</sup> ± 0.001	0.021 <sup>a</sup> ± 0.001
5	CFISPM	9.2 <sup>a</sup> ± 0.2	0.027 <sup>a</sup> ± 0.001	79.4 <sup>e</sup> ± 1.5	0.086 <sup>c</sup> ± 0.002	0.028 <sup>b</sup> ± 0.007
6	CASPM	6.5 <sup>a</sup> ± 1.2	0.023 <sup>a</sup> ± 0.002	72.8 <sup>d</sup> ± 0.6	0.079 <sup>d</sup> ± 0.001	0.021 <sup>a</sup> ± 0.001
7	EFICPM	14.0 <sup>b</sup> ± 5.1	0.039 <sup>b</sup> ± 0.015	89.0 <sup>f</sup> ± 1.2	0.097 <sup>f</sup> ± 0.002	0.034 <sup>c</sup> ± 0.003
8	EFISPM	15.7 <sup>b</sup> ± 6.7	0.045 <sup>b</sup> ± 0.001	93.9 <sup>g</sup> ± 0.4	0.103 <sup>g</sup> ± 0.001	0.050 <sup>d</sup> ± 0.004
9	EASPM	9.1 <sup>a</sup> ± 0.8	0.026 <sup>a</sup> ± 0.001	83.2 <sup>b</sup> ± 0.5	0.090 <sup>b</sup> ± 0.001	0.029 <sup>b</sup> ± 0.001

DPPH (%) = porcentaje de inhibición; DPPH (mg)= mg EAG mL<sup>-1</sup>; ABTS (%)= porcentaje de inhibición, ABTS (mg)= mg ET mL<sup>-1</sup>, FRAP (mg)= mg EAG mL<sup>-1</sup>; **CFICPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFISPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CASPS**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFICPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **CFISPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **CASPM**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EFICPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **EFISPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EASPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración.

Literales <sup>a, b, c, d, e, f, g</sup> indican diferencias (P < 0.05) dentro de columna.

Respecto a la inhibición del radical ABTS, Moussa *et al.* (2014) determinaron en extractos etanólicos de cladodios de *O. ficus-indica* 0.022 y 0.024 mg ET mL<sup>-1</sup>; concentraciones menores a los resultados obtenidos en esta investigación: > 0.077 ± 0.001 mg ET mL<sup>-1</sup> (Figura 3). No obstante, Moussa *et al.* (2014) encontraron que la actividad antioxidante fue proporcional a los valores de fenoles totales observados en los extractos etanólicos de *O. ficus-indica*. Aspecto que concuerda con los resultados del presente trabajo, puesto que las correlaciones entre los compuestos fenólicos (FT y flavonoides) y la actividad antioxidante fueron altas y positivas

(Tabla 4): FT-DPPH ( $r = -0.70$ ;  $P < 0.001$ ), flavonoide-DPPH ( $r = 0.71$ ;  $P < 0.001$ ) FT-ABTS ( $r = 0.81$ ;  $P < 0.0001$ ), flavonoides-ABTS ( $r = 0.81$ ;  $P < 0.0001$ ) y FT-FRAP ( $r = 0.95$ ;  $P < 0.0001$ ), flavonoides-FRAP ( $r = 0.94$ ;  $P < 0.0001$ ). Correlaciones que indican que a mayor concentración de FT o flavonoides en los extractos, mayor capacidad antioxidante presentan.



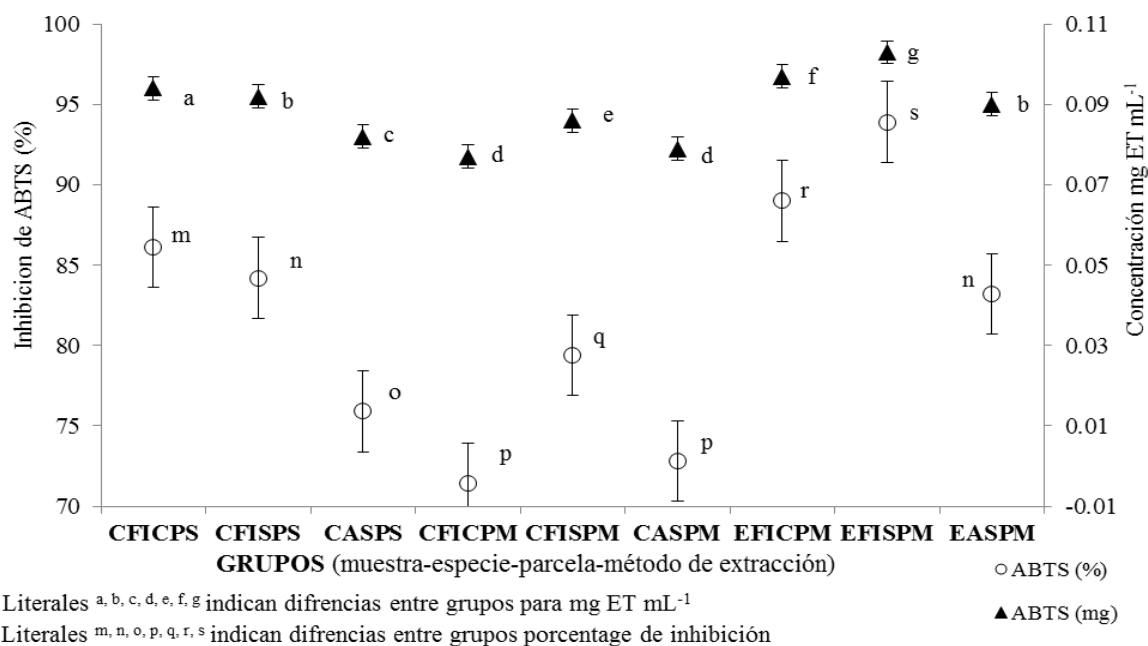
Literales a y b, indican diferencias entre grupos para mg EAG mL<sup>-1</sup>  
 Literales m y n indican diferencias entre grupos para porcentaje de inhibición

**CFICPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFISPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CASPS**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFICPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **CFISPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **CASPM**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EFICPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **EFISPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EASPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración.

**Figura 2.** Inhibición (%) del radical DPPH por concentración EAG (mg mL<sup>-1</sup>) obtenidos en extractos metanólicos de acuerdo al grupo.

El índice de capacidad antioxidante (FRAP) en extractos de epidermis de *O. ficus-indica* de parcela SP mostró también una mayor ( $P < 0.05$ ) eficacia ( $0.050 \pm 0.004$  mg EAG mL<sup>-1</sup>) en comparación con los extractos obtenidos de cladodios por maceración o Soxhlet:  $< 0.028 \pm 0.007$  mg EAG mL<sup>-1</sup>. Chahdoura *et al.* (2014), determinaron que el poder reductor de hierro de

extractos metanólicos de cladodios de *Opuntia macrorrhiza*, fue del 50% con 0.060 mg ET mL<sup>-1</sup>. No obstante, en esta investigación no se determinó el poder reductor de hierro (FRAP %) de los extractos analizados; pero, las concentraciones observadas (Figura 4) fueron menores a las reportadas por los investigadores citados. Aunque si bien, las concentraciones de FRAP en extractos de epidermis de *O. ficus-indica* proveniente de PSP fueron las que mostraron un mejor comportamiento con respecto al resto de los grupos analizados (Figura 4).

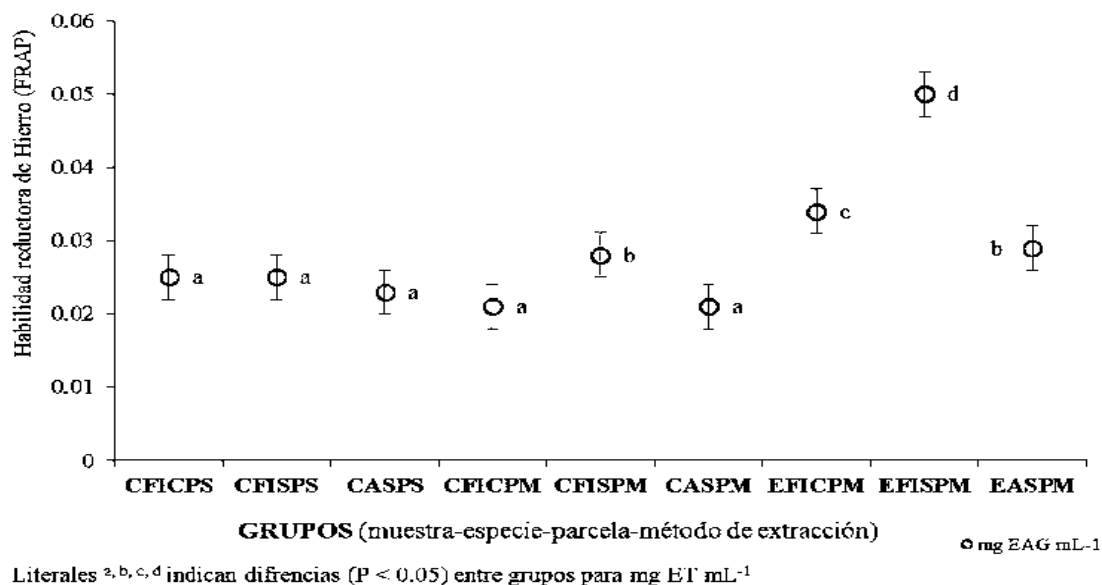


**CFICPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFISPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CASPS**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFICPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **CFISPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **CASPM**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EFICPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **EFISPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EASPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración.

**Figura 3.** Inhibición (%) del radical ABTS por concentración ET (mg mL<sup>-1</sup>) de extractos metanólicos de acuerdo al grupo

La menor actividad antioxidante de los extractos obtenidos por Soxhlet ( $P < 0.05$ ) respecto a los extractos de epidermis, en las tres pruebas de capacidad antioxidante a las cuales se sometieron

(ABTS, DPPH y FRAP), pudo deberse a: 1) la concentración de fenoles fue menor en todos los grupos analizados en comparación con lo reportado por otros investigadores citados en este trabajo; 2) la menor concentración en estos extractos puede asociarse a la biodegradación de los compuestos fenólicos por causa de la exposición a temperaturas  $>50^{\circ}\text{C}$  durante la deshidratación de las muestras; 3) al método de extracción, en este caso la extracción en equipo Soxhlet implica una temperatura superior a  $64^{\circ}\text{C}$  (Orphanides *et al.*, 2013) y, en menor medida, a la composición bromatológica de las especies analizadas.



**CFICPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFISPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CASPS**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFICPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **CFISPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **CASPM**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EFICPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **EFISPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EASPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración.

**Figura 4.** Poder reductor de hierro de extractos metanólicos de acuerdo al grupo.

Kaur *et al.* (2012) indican que la actividad antioxidante es determinada por la concentración de fenoles totales. Medina *et al.* (2011), observaron que cuando los cladodios son deshidratados a

temperaturas superiores a 60°C la concentración de compuestos fenólicos es menor en comparación a cuando los cladodios son deshidratados a 45°C; sin embargo, aun con esta temperatura existe perdida de compuestos fenólicos. En contraposición, Aguirre *et al.* (2013) encontraron que a mayor temperatura de extracción se incrementan las concentraciones de fenoles; pero, disminuye la actividad antioxidante de los extractos. Al respecto, los resultados obtenidos en esta investigación no concuerdan, puesto que las temperaturas utilizadas en ambos métodos de extracción oscilaron entre 45°C (deshidratación de la muestra) y 64°C (extracción con equipo soxhlet) y bajo estas circunstancias la cantidad de FT no supero a las concentraciones de estos compuestos obtenidos por el método de maceración (Tabla 2) donde la temperatura utilizada fue la del ambiente.

Santos *et al.* (2011) y Kaur *et al.* (2012), indican que la actividad antioxidante de extractos etanólicos de *O. ficus-indica* depende de las concentraciones de los compuestos fenólicos presentes en el extracto. Al respecto, el análisis de las correlaciones de Pearson (Tabla 4) concuerdan con lo anterior.

**Tabla 4.** Correlaciones de Pearson y omega cuadrado ( $\omega^2$ ) entre tratamiento (Grupo), fenoles totales, flavonoides, inhibición de DPPH, inhibición de ABTS y habilidad reductora de Hierro.

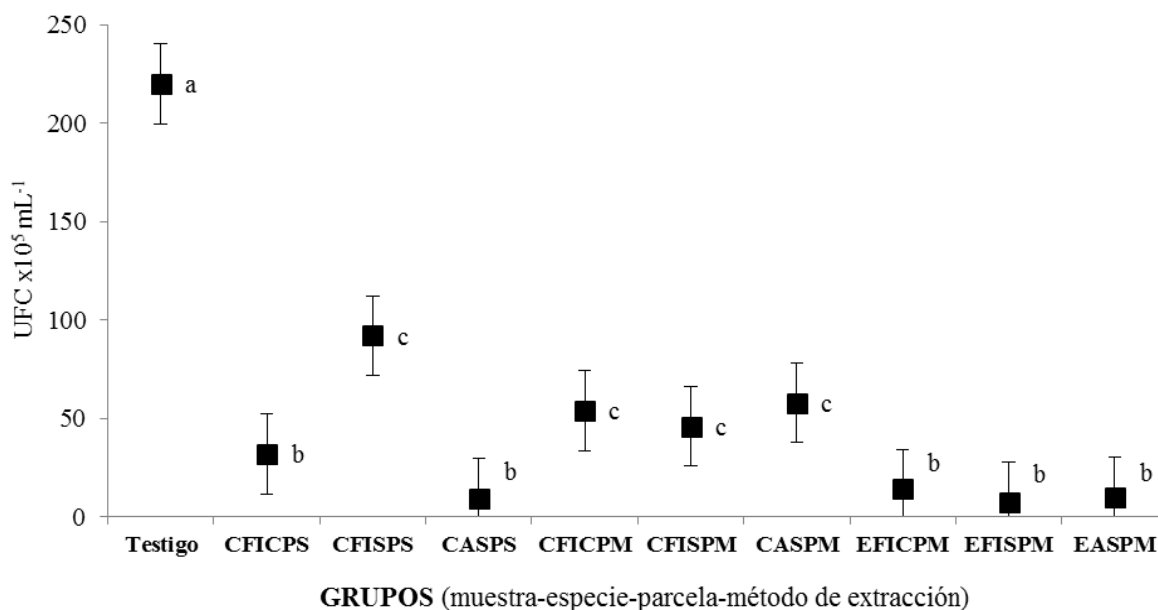
Variable	Tratamiento	Fenoles totales	Flavonoides	DPPH <sub>(%)</sub>	ABTS <sub>(%)</sub>
	$\omega^2$	r	R	r	R
Fenoles totales	0.99**	--			
Flavonoides	0.99**	0.99**	--		
Inhibición de DPPH (%)	0.94**	0.70**	0.71**	--	
Inhibición de ABTS (%)	0.98**	0.81**	0.81**	0.72**	--
Habilidad reductora de Hierro	0.88**	0.95**	0.94**	0.64**	0.79**

$\omega^2$ = estadístico omega cuadrado; r= correlación de Pearson; DPPH= inhibición de 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS= inhibición de 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid-2NH<sub>4</sub>.

\*\*= altamente significativo (P < 0.0001).

Romano *et al.* (2009), determinaron que el efecto antioxidante o antimicrobiano encontrado en extractos metanólicos de plantas no se debe únicamente a la concentración de fenoles, también se debe a la combinación entre dichos compuestos; puesto que al probar los mismos compuestos por

separado, su efecto es menor que cuando están en combinación. Esto sugiere que las diferentes mezclas de compuestos fenólicos, en los extractos evaluados, pudieron ser las causantes de variabilidad en la actividad antioxidante y no tanto a las concentraciones obtenidas de FT y flavonoides en los extracto analizados en esta investigación.



Literales <sup>a, b, c</sup> indican diferencias entre grupos

**CFICPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFISPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CASPS**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFICPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **CFISPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **CASPM**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EFICPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **EFISPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EASPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración.

**Figura 5.** Medias de mínimos cuadrados para mesófilas Aerobias (UFC mL<sup>-1</sup>) en leche cruda post-adición de los extractos metanólicos.

Finalmente, los resultados microbiológicos de la leche cruda adicionada con los extractos metanólicos analizados, mostraron reducción de cuentas bacterianas (UFC mL<sup>-1</sup>) en leche cruda; tanto para BMA como para CT, 2 h post adición del extracto (Figura 5). Al respecto, los extractos de epidermis de cladodio (obtenidos por maceración) e independientemente de la especie (*O.*

*ficus-indica* y *O. atropes*) presentaron mayor reducción de UFC mL<sup>-1</sup> de BMA (P < 0.05): 72x10<sup>5</sup> a 140x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, resultados estadísticamente iguales (P < 0.05) entre especies y parcela de procedencia (Figura 5). No obstante, todos los grupos de extractos analizados redujeron las cuentas bacterianas de leche cruda 2 h post adición (P < 0.05) del extracto en comparación con las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA en leche cruda sin adición de extractos metanólicos (Testigo).

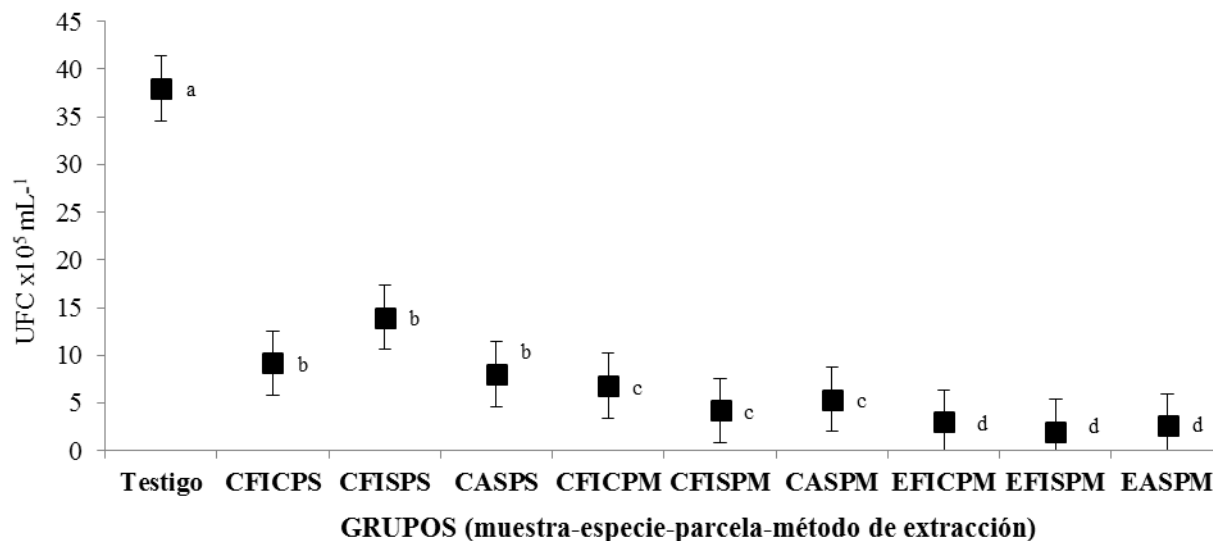
A pesar que, todos los extractos aplicados disminuyeron el promedio de UFC mL<sup>-1</sup> de BMA de leche cruda en comparación al testigo (2200x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>), únicamente tres extractos disminuyeron las UFC a los estándares (120x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de BMA) que marca la NOM para el consumo de leche (NMX-F-700-COFOCALEC, 2004). Los extractos referidos fueron los extraídos por el método Soxhlet de cladodio, específicamente el extracto de *O. atropes* (92x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) y, por maceración los extracto de epidermis de *O. ficus-indica* proveniente de PSP y *O. atropes*: 72x10<sup>5</sup> y 100x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> de BMA, respectivamente. Resultados similares obtuvieron Ortiz *et al.* (2013) al adicionar directamente epidermis de cladodios y fragmentos de cladodios de *O. ficus-indica*, en base fresca. Estos investigadores observaron que, las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA se redujeron (P < 0.05) y lograron los valores establecidos por la NOM. Umar *et al.* (2013), reportaron efecto antimicrobiano de extractos metanólicos de *O. dilleni* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, mientras que Sánchez *et al.* (2010), también encontraron efecto antimicrobiano de extractos etanólicos y metanólicos de cladodios de *O. ficus-indica* sobre *Vibrio cholerae*.

En relación a CT en leche cruda post-adición de extractos metanólicos, se encontró efecto (P < 0.0001) de grupo (de los extractos analizados) sobre UFC mL<sup>-1</sup> de CT en leche cruda 2 h post adición del extracto. De acuerdo con la Figura 6, la adición de extractos de epidermis a la leche cruda redujo en mayor medida (P < 0.05) las UFC mL<sup>-1</sup> de CT (2.0x10<sup>5</sup> a 3.0x10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) con respecto al resto de los grupos analizados. A pesar de que, todos los extractos probados, en esta

investigación, disminuyeron las UFC mL<sup>-1</sup> de CT de LC en comparación al testigo ( $38.0 \times 10^5$ ) no logran la reducción mínima que requiere la leche para considerarse como apta para el consumo humano, ello de acuerdo con los estándares de calidad ( $1 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> de CT) que marca la norma (NMX-F-700-COFOCALEC 2004) para que la leche se considera apta para su consumo.

Investigaciones recientes establecen que los frutos, cladodios y flores de *O. ficus-indica* contienen compuestos químicos como los fenoles (Abdel *et al.*, 2014; Boutakiout, *et al.*, 2015), los cuales actúan como antimicrobianos (Segul *et al.*, 2009). Pero dicha actividad biológica está determinada por la concentración de fenoles totales y flavonoides presentes en los extractos de plantas (Silva *et al.*, 2006). En contraste, Cambral *et al.* (2012), indican que la actividad antimicrobiana no siempre es determinada por la concentración de fenoles y flavonoides, puesto que en ocasiones dicha actividad antimicrobiana no se correlaciona con la concentración de fenoles totales. En este sentido, Romano *et al.* (2009), sugieren que el efecto antioxidante o antimicrobiano se debe al sinergismo entre los compuestos fenólicos presentes en el extracto. Por lo que el efecto de los extractos de epidermis sobre BMA y CT, pudo deberse a una mayor combinación de los fenoles en estos extractos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, tanto BMA como CT en leche cruda se redujeron 2 h post-adición de los extractos metanólico a dosis de 50 µg de FT. Sin embargo, se observaron diferencias entre grupos; lo cual indica, que no es la dosis de FT existente en el extracto lo que afecta las UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias en leche cruda, sino más bien el tipo de fenoles y el sinergismo entre estos lo que provoca una mayor o menor eficiencia al momento de reducir las cuentas bacterianas en la leche.



Literales <sup>a, b, c, d</sup> indican diferencias entre grupos

**CFICPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFISPS**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CASPS**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por Soxhlet; **CFICPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **CFISPM**= Extracto de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **CASPM**= Extracto de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EFICPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela con prácticas culturales obtenido por maceración; **EFISPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración; **EASPM**= Extracto de epidermis de cladodio de *O. atropes* proveniente de parcela sin prácticas culturales obtenido por maceración.

**Figura 6.** Medias de mínimos cuadrados para coliformes Totales (UFC mL<sup>-1</sup>) en leche cruda post-adición de los extractos metanólicos.

Los extractos metanólico de plantas dañan la membrana celular de las bacterias, provocando tanto la disminución del pH citoplasmático como la producción de ATP (Sánchez *et al.*, 2010). Esta acción posiblemente este determinada por el anillo aromático; principalmente el grupo hidroxilo (-OH), con el que cuentan los fenoles (a veces con más de uno); puesto que, el -OH presente en los fenoles pueden actuar como acarreadores de cationes monovalentes del citoplasma al espacio extracelular y, al llegar un fenol al citoplasma intercambia su protón hidrogeno (H<sup>+</sup>) por un ion potasio (K<sup>+</sup>) u otro catión (Ultee *et al.*, 2002). Este intercambio de iones despolariza la membrana celular (Whiteaker *et al.*, 2001) y la despolarización o polarización de la membrana celular es considerado como daño en la misma (Yuroff *et al.*, 2003;

Bot y Prodan, 2009), afectando la homeostasis y finalmente provocando la muerte celular (Ultee et al., 2002).

## CONCLUSIÓN

Dentro de los diferentes extractos metanólicos evaluados, el método de extracción que produce mayor cantidad de fenoles totales es el de maceración y, dentro de este método, el extracto de epidermis de cladodios de *O. ficus-indica* procedentes de la parcela sin prácticas culturales es el que genera mayor concentración de compuestos fenólicos, ello si se compara con las concentraciones de fenoles totales de los extractos de cladodios de la misma especie y de *O. atropes*, independientemente del método de extracción utilizado (Soxhlet o maceración). No obstante, las cantidades de fenoles totales obtenidas en los extractos de epidermis o cladodios completos de dichas especies son menores ( $< 1 \text{ mg EAG mL}^{-1}$ ) a lo observado en otras investigaciones ( $\geq 4 \text{ mg EAG mL}^{-1}$ ). Posiblemente, esta menor cantidad de fenoles totales presentes en los extractos de *O. ficus-indica* y *O. atropes* este determinado por la edad de los cladodios de estas cetáceas y al método de deshidratación utilizado. Por lo que es necesario investigar el efecto de varios métodos de deshidratación de las muestras para la generación de extractos metanólicos derivados de *Opuntia* spp.

Los extractos de cladodio obtenidos por el método Soxhlet y maceración tienen menos capacidad para inhibir DPPH y ABTS. Mientras que los extractos de epidermis de cladodios de *O. ficus-indica* muestran mayor capacidad para inhibir a este tipo de radicales. Sin embargo, los extractos de epidermis de cladodio (obtenidos por maceración) e independientemente de la especie (*O. ficus-indica* y *O. atropes*) muestran mayor eficacia para disminuir las UFC  $\text{mL}^{-1}$  de mesófilas aerobias y coliformes totales en leche cruda, ello dos horas después de la adición de estos extractos a la leche cruda. Esto sugiere que, la implementación de extractos metanólicos de

epidermis de *O. ficus-indica* u *O. atropes* y su posterior adición (50 µg de fenoles totales: 1 mL de leche cruda) es una alternativa viable para incrementar la calidad bacteriológica de la leche procedente de sistemas de producción a escala familiar; pues estos, además de producirla, la consumen, venden o procesan para elaborar quesos o yogurt artesanal.

### LITERATURA CITADA

- Abdel-Hameed, E. S. S., Nagaty, M. A., Salman, M. S. y Bazaid, S. A. 2014. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. Food chemistry, 160, 31-38.
- Aguirre, J.J., De La Garza, T.H., Zugasti, C.A., Belmares, C.R., y Aguilar, C.N. 2013. The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 3(6), 436-442.
- Ahmed, M.S., Tanbouly, N.D.E., Islam, W.T.; Sleem, A.A., Senousy, A.S.E. 2005. Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt. Phytother. Res., 19, 807-809.
- Ammar, I., Ennouri, M., Khemakhem, B., Yangui, T., y Attia, H. 2012. Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. Industrial Crops and Products. 37(1), 34-40.
- Arriaga, J.C., Heredia, N.D., Martínez, G.C. y Rayas, A.A. 2013. Importancia de los Sistemas de Producción de Leche a Pequeña Escala en México. 1er Congreso Nacional de Producción, Calidad, Transformación, Comercialización y Nutrición de la Leche y sus Derivados. Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto de Ciencias Agropecuario y rural (ICAR).
- Autino, J. C., Romanelli, G. P., y Ruiz, D. M. 2013. Introducción a la Química Orgánica. 185-188.
- Boczek, L.A., Rice, E.W. y Johnson, C.H. 2014. Total viable counts. Spread plate technique in Batt, C.A. (ed.) Encyclopedia of Food Microbiology (2<sup>da</sup> Ed.), 636-637.
- Bot, C., y Prodan, C. 2009. Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy. Eur. Biophys. J. 38:1049-1059.
- Boutakiout, A., Elothmani, D.D., Mahrouz, M., Hmid, I., Hanine, H. 2015. Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different cladodes juice of cactacea cultivars from different areas in Morocco. International journal of technology enhancements and emerging engineering research. 3(01), 56-66.
- Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Alencar, S.M.D., Rosalen, P.L. y Ikegaki, M. 2012. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two

- varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 557-564.
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A., y Marin-Iniesta, F. 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J. FoodProt.* 70, 2757-2763.
- Chahdoura, H., Barreira, J.C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C., y Achour, L. 2014. Phytochemical characterization and antioxidant activity of the cladodes of *Opuntia macrorhiza* (Engelm.) and *Opuntia microdasys* (Lehm.). *Food & function*, 5(9), 2129-2136.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2007. *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. 7th ed. M11-A7. Wayne PA.
- Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., y Rizvi, S.S.H. 2010. Extraction of natural antioxidants from plant foods. Separation, extraction and concentration processes in the food, beverage and nutraceutical industries. 506-594.
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., y Anelli, G. 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*, 110(3), 659-669.
- De Leo, M., Abreu, M.B.D., Pawlowska, A.M., Cioni, P.L., Braca, A. 2010. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC-PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochem. Lett.* 3, 48-52.
- Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D. y Zhao, Y. 2014. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*. 38, 184-191.
- Mostafa, K.E., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., y Cherkaoui-Malki, M. 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*. 19(9), 14879-14901.
- Freund, R.J., Littell, R.C. 1991. *SAS system for regression*. Second Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Fuentes, C.G., Ruiz, R.R.A., Sánchez, G.J.I., Ávila, R.D.N., y Escutia, S.J. 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 10(4), 419-432.
- Garcés, R., Brito, C., Cabello, M., Orellana, A., Brandl, E. y López, J.L. 2005. Determinación de la calidad microbiológica de la leche cruda y del queso artesanal elaborado en una cooperativa de campesinas en una zona del centro-sur de Chile. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos* 366, 62-69.
- Gow, C., y Hui, Y., C. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 27-32.

- Guevara, F.T., Jiménez, I.H., Reyes, E.M.L., Mortensen, A.G., Laursen, B.B., Li, W.L., De León, R.A., Fomsgaard, S. y Barba, R.A.P. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of food composition and analysis* 23(6), 525-532.
- Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
- Heath, M.C. y Boller, T. 2002. Biotic interactions levels of complexity in plant interactions with herbivores, pathogens and mutualists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 277-278.
- Heras, I., Alvis, A., y Arrazola, G. 2013. Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). *Información tecnológica*, 24(5), 93-102.
- Hernández, U.M.I., Pérez, T.E., y Rodríguez, G.M.E. 2011. Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus-indica*) at varied ages in an organic harvest. *International journal of environmental research and public health*. 8(5), 1287-1295.
- INEGI: instituto nacional de estadística geografía e información. 2010. Anuario estadístico del estado de Michoacán. 127-142
- Jaafar, H.Z., Ibrahim, M.H., y Mohamad F.N.F. 2012. Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), malondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila Benth*). *Molecules*. 17(6), 7305-7322.
- Kaur, M., Kaur, A. y Sharma, R. 2012. Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2(1518), 13.
- Keppel G, Wickens TD. 2004. Design and Analysis: A researcher's handbook. 4th. NJ: Prentice Hall.
- Khadem, S. y Marles, R.J. 2010. Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*. 15, 7985-8005.
- Lee, S.H., Tanaka, T., Nonaka, G. y Nishioka I. 2004. Structure and biogenesis of jolkinin, a highly ellagitannin from *Euphorbia jolkinii*. *Journal of Natural Products*. 67, 1018-1022.
- Liu, C.L., Wang, J.M., Chu, C.Y., Cheng, M.T., y Tseng, T.H. 2002. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 40(5), 635-641.
- Longo, L. y G. Vasapollo, 2006. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. *Food Chemistry*. 94, 226-231.
- López, A.S., y Belloso, O.M. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*. 18(4), 329-343.

- Lozano, L. 2011. Ecofisiología de la tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). Horticultura Argentina. Universidad Nacional de Salta. 30(72), 37-52.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., y Del Nobile, M. A. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*. 3, 287.
- Makkar, H.P. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage: a laboratory manual for the fao/iaea co-ordinated research project on use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assay for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on the tanniniferous tree foliage. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, Austria. 1-29.
- Medina, T.L., Vernon, C.E. J., Gallegos, I.J. A., Rocha, G.N. E., Herrera, V.E. E., Calderas, F., y Jiménez, A.R. 2011. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(6), 1001-1005.
- Moreno, G.A., Herrera, A.G., Carrión, G.M., Álvarez, B.D, Pérez, S.R. y Ortiz, R.R. 2012. Caracterización y modelación esquemática de un sistema familiar de bovinos productores de leche en la Ciénega de Chapala, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 20(3-4), 85-94. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México.
- Moussa, A.T.E., El-Hady, E.S.A.A., Omran, H.T., El-Samahy, Kroh, L.W.S.K., y Rohn, S. 2014. Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. *Food Research International* 64: 864-872.
- Muehlhoff, E., Bennett, A. y McMahon, D. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 243-263.
- Nerd, A., Sitrit, Y., Kaushik, R. A., y Mizrahi, Y. 2002. High summer temperatures inhibit flowering in vine pitaya crops (*Hylocereus spp.*). *Scientia Horticulturae*, 96(1), 343-350.
- NMX-F-700-COFOCALEC-2004. Counting of somatic cells by flowcy to metry. Disponible en internet: [www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php](http://www.cofocalec.org.mx/internaproductos.php).
- Orphanides, A., Goulas, V., y Gekas, V. 2013. Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech J. Food Sci*. 31(5), 509-513.
- Ortiz, R.R., Valdez, A.J.J., Garcidueñas, P.R., Chávez, M.M.P., Val, A.D., Hernandez, V.E.F. y Pérez, S.R.E. 2013. Effect of added nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) on microbial content in raw milk. *African Journal of Microbiology Research*. 12 Julio, 2013. 7(28), 3675-3680.
- Parashar, S., Sharma, H., y Garg, M. 2014. Antimicrobial and Antioxidant activities of fruits and vegetable peels: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(1), 160-164.

- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E. y Javidnia, K. 2010. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of Ephedra. *Molecules*, 15(3), 1668-1678.
- Pérez, E. P., Ettiene, G., Marín, M., Padron, A. C., Silva, N., Raga, J., y Medina, D. 2014. Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 31(1), 60-77.
- Raaman, N. 2006. *Phytochemical Techniques*. New India Publishing Agency, New Delhi, India. 10, 25-28.
- Ramírez, N.J.S. 2006. Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA*. 19-21.
- Randhir, R. y Shetty, K. 2007. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8, 197-204.
- Randhir, R. y Shetty, K. 2007. Mung beans processed by solid-state bioconversion improves phenolic content and functionality relevant for diabetes and ulcer management. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8, 197-204.
- Reyes, A.J.A., Aguirre, R.J.R. y Flores, F.J.L. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia*. 30, 476-484.
- Reyes, J. A., y Aguirre, J. R. 2011. Agrobiodiversity of cactus pear (*Opuntia*, Cactaceae) in the meridional highlands plateau of México. *Journal of Natural Resources and Development*. 1(1). 1-9.
- Rojas, R.M.R., Lammoglia, V.M.A., Daniel, R.A.I.C., Cabrera, N. y Cruz, B.E. 2014. Presencia de microorganismos en leche cruda de vaca durante la ordeña en clima tropical. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán, México del 2 al 4 de Julio de 2014. 487-491.
- Romano, C. S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A. A. y Moreno, S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food chemistry*. 115(2), 456-461.
- Salgado, P. R., Favarin, J. L., Leandro, R. A., y Lima Filho, O. F. D. 2008. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Scientia Agricola*. 65(4), 354-359.
- Santos, M.V.F., Lira, M.A. y Burity, H.A. 1990. Número, dimensões e composição química de artículos de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) cv. gigante, de diferentes ordens. *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*. 7 (especial), 69-79.
- Santos, Z.L., Gutiérrez, U.J.A. y Serna, S.S.O. 2011. Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59(13), 7054-7061.

- 
- SAS/STAT 2000. Guide for personal computers. Version 9.1. Statistical Analysis System (SAS) Institute in Company. Version electronica disponible en CD.
- SAS/STAT. 2008. The REG Procedure. Chapter 34; In; SAS Institute Inc. 2008. 9.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc. 5428-5434.
- Sauceda, E. N. R. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai. 7(1), 153-170.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). 2011. Base de datos estadísticos con relación a la producción pecuaria. Disponible en internet: <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/>.
- Silva, J.F.M., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R., Vidal, V.N. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. Food Chem. 99(1), 431-435.
- Thatcher, L.F., Anderson, J.P. y Singh, K.B. 2005. Plant defence responses: what have we learnt from Arabidopsis? Functional Plant Biology. 32(1), 1-19.
- Tolosa, L., y Cañizares, E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. 43(1-2), 37-55.
- Toor, R.K. y Savage, G.P. 2006. Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. Food Chemistry. 94(1), 90-97.
- Umar, M. I., Javeed, A., Ashraf, M., Riaz, A., Mukhtar, M. M., Afzal, S., y Altaf, R. 2013. Polarity-based solvents extraction of *Opuntia dillenii* and *Zingiber officinale* for in vitro antimicrobial activities. International Journal of Food Properties. 16(1), 114-124.
- Vera, A.H., Hernández, A.L., Espinoza, G.J., Ortega, R.L., Díaz, A.E., Román, P.H., Núñez, H.G., Medina, C.M. y Ruiz, L.F. (Eds.) 2009. Producción de leche de bovino en el sistema familiar. INIFAP. CIRGOC. Libro técnico Núm. 24. Veracruz, México. 384.
- Wadhwa, M., y Bakshi, M. P. S. 2013. Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. RAP Publication. 4, 39-40.
- Whiteaker, K.L., Gopalakrishnan, S.M., Groebe, D., Shieh, C.C., Warrior, U., Burns, D.J., Coghlan, M.J., Scott, V.E., y Gopalakrishnan, M. 2001. Validation of FLIPR membrane potential dye for high throughput screening of potassium channel modulators. J. Biomol. Screen. 6, 305-312.
- Wiermer, M., Feys, B.J. y Parker, J.E. 2005. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. Current Opinion in Plant Biology. 8(4), 383-389.
- Yuroff, A.S., Sbat, G. y Hickey, W.J. 2003. Transporter-mediated uptake of 2-chloro and 2-hydroxibenzoato by *Pseudomonas huttiensis* strain D1. Appl. Environ. Microbiol. 69,7401-7408.

## DISCUSION

En la actualidad, es urgente incorporar tecnologías a los sistemas de producción familiar (SPF), debido a que generan el 80% de los alimentos del mundo (Salcedo y Guzmán, 2014). En México, los SPF representan el 70% de la totalidad de los sistemas de producción animal (Salcedo y Guzmán, 2014). Ello obliga a incentivar la investigación, la inversión económica y el desarrollo social, para: garantizar la alimentación en las zonas rurales del país, cuidar y proteger el entorno natural y, aminorar la pobreza (Galluzzi *et al.*, 2011). Pero, dichas inversiones deben canalizarse sin anteponer la diversidad y complejidad que caracteriza a los SPF (Salcedo y Guzmán, 2014). Además, en el país, la producción de leche de bovinos se encuentra entre los 12 millones de litros año<sup>-1</sup>; de esta cantidad, la ganadería a escala familiar o los SPF aportan el 9.4% (3.000 kg cabeza<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) de la producción nacional (Vera *et al.* 2009; SIAP, 2011) y abastece el 50% de las queserías de tipo artesanal (Garcés *et al.*, 2005). No obstante, la producción de leche y elaboración de productos lácteos, en este tipo de sistemas (familiar), se realiza y comercializa bajo escasa tecnificación y prácticas de higiene (Moreno *et al.*, 2012; Arriaga *et al.*, 2013). Aspectos que representan el principal riesgo hacia la salud del consumidor (Rojas *et al.*, 2014). Aunado a ello, a los pequeños productores (familiar) les resulta inviable la inversión de un tanque enfriador o cubrir los costos que genera enfriar y/o hervir la leche (Muehlhoff *et al.*, 2013) y, tal vez por ello, en las zonas rurales y marginales del país es común utilizar la leche cruda sin refrigeración o pasteurización para el consumo o la elaboración de subproductos lácteos (Rojas *et al.*, 2014).

Los SPF al poseer una escasa infraestructura tecnológica (Gliessman *et al.*, 2007), los hace vulnerables en dos aspectos fundamentales para supervivencia de los mismos: a) la adquisición o suministro de las fuente de insumos para la alimentación animal (Molina *et al.*, 2008; López *et al.*, 2007) y b) los productos que ofertan, principalmente leche, queso fresco y yogur natural son

y se perciben como un riesgo para la salud pública, aspectos que limitan la comercialización de dichos productos o los obliga a conformar un mercado local e informal (Godar *et al.*, 2010). Puesto que, las Normas Oficiales Mexicanas establecen especificaciones sanitarias y nutrimentales que debe cumplir la leche y sus subproductos para que se consideren aptos para el consumo humano (Fuentes *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a la idiosincrasia, economía y escasa tecnología presentes en las zonas rurales del país, la producción de leche y elaboración de subproductos lácteos se comercializan sin tener en cuenta dichas normas y los riesgos de salud pública que puedan generar (Moreno *et al.*, 2012). Por lo que, una primera acción podría ser la disminución de la variabilidad en la calidad bacteriológica de la leche cruda y sus subproductos; sin afectar los costos de producción.

El nopal (*Opuntia spp.*) no solo es una alternativa nutricional, al utilizarse como parte de los insumos de la alimentación del ganado de los SPF (Cervantes, 2005; De Andrade *et al.*, 2011; Ortiz *et al.*, 2013; Sakly *et al.*, 2014) sino además posee propiedades que incrementan la calidad de la leche. Ortiz *et al.* (2012<sup>b</sup>), encontraron que el consumo de dietas complementadas con nopal (*O. ficus-indica*) reducen ( $P < 0.05$ ) las unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) de BMA y CT en leche cruda. Además, la adición directa de nopal molido a leche cruda también produce el mismo efecto sobre BMA y CT (Ortiz *et al.*, 2013). Ortiz *et al.* (2013) al evaluar el efecto de la adición directa de nopal molido, mucilago, y epidermis de nopal (en porcentajes de 0.5, 1.0 y 2% con base a 100 mL de leche) a la leche cruda, sobre las unidades formadoras de colonias (UFC mL<sup>-1</sup>) de BMA y CT, encontraron una reducción significativa ( $P < 0.05$ ) de dichas bacterias dos horas después de la adición de nopal (*O. ficus-indica*) a la leche cruda, ello en comparación con el testigo (leche cruda sin adición de nopal). Ortiz *et al.* (2013), reportan que la adición de nopal fresco y en harina a leche cruda para elaborar yogurt artesanal mejora la calidad bacteriológica de este producto; es decir, reduce las UFC de CT. Resultados importantes dentro de la seguridad

alimentaria y la problemática de salud pública, puesto que el contenido nutricional de la leche hace de este alimento un medio para el crecimiento de microorganismos patógenos (Muehlhoff *et al.*, 2013).

La disminución de la carga BMA y CT en leche cruda debido a la adición directa de nopal molido, mucilago y epidermis de nopal (Ortiz *et al.*, 2013), posiblemente se deba a que los cladodios, como todas las partes de la planta de nopal (*O. ficus-indica*), son ricos en compuestos fenólicos, principalmente en flavonoides y ácidos fenólicos (Ahmed *et al.*, 2005; De Leo *et al.*, 2010; Ammar *et al.*, 2012), mismos que han demostrado que tienen funciones biológicas tales como: actividad antioxidantes, antiviral y antibacteriana (bactericida y bacteriostático) (Kahdem y Marles, 2010). En relación a los fenoles, estos poseen un potencial antioxidante, mismo que está relacionado con procesos anti-inflamatorios, hipoglucémicos, anti-microbianos y neuro-protectores (Mostafa *et al.*, 2014). En general, es conocida la correlación entre el contenido de fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y actividad antibacteriana (Leyva *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014).

Actualmente, existe un interés creciente por el estudio e implementación de fuentes naturales (compuestos químicos) como alternativas de sustitución de los métodos térmicos utilizados en la conservación de alimentos (López y Belloso, 2008), debido a sus propiedades acidificantes, antioxidantes y antimicrobianas (Lucera *et al.*, 2012). En general, los extractos de plantas pueden ser utilizados como aditivos antimicrobianos para prolongar la vida de anaquel de los alimentos (Gyawali y Ibrahim, 2014), puesto que, las investigaciones han demostrado actividad antimicrobiana de diferentes compuestos naturales contra una amplia gama de microorganismos patógenos de humanos que crecen en alimentos (Gyawali y Ibrahim 2014) y, la adición directa de este tipo de compuestos (en forma líquida o en polvo) a leche, productos lácteos y otros alimentos es el método con mayor eficacia, hasta ahora probado (Cava *et al.*, 2007 citado por;

---

Lucera *et al.*, 2012; Gyawali y Ibrahim 2014). Al respecto Pérez *et al.* (2015) evaluaron el efecto de compuestos fenólicos de nopal sobre BMA y CT en leche cruda y se encontró que, las UFC mL<sup>-1</sup> de BMA y CT se redujeron ( $P < 0.05$ ) en comparación con el testigo.

En esta investigación, se pudo determinar que tanto *O. ficus-indica* como *O. atropes* poseen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano cuando se adicionan en forma de extractos metanólicos a la leche cruda. No obstante, dicha acción bacteriológica fue mayor con extractos de epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* que con extractos de cladodios de la misma especie y también presentó mayor actividad bacteriostática que los extractos metanólicos de epidermis o cladodios de *O. atropes*, puesto que la epidermis de cladodio de *O. ficus-indica* mostró mayor contenido de FT ( $P < 0.05$ ). Aspecto que concuerda con Verporte y Memelink (2002), quienes determinaron que de manera general, se observa que la cantidad de FT está relacionada con la especie, estructura o parte de la planta utilizada (pulpa, cascara, epidermis o tallo) en la extracción (Parashar *et al.*, 2014, Longo y Vasapollo 2006). Además, se ha observado que, la mayor producción de FT obtenida en extractos de cascara de los frutos o de la epidermis de verduras posiblemente se deba a que estas partes son la primer barrera de defensa contra insectos, microorganismos, predadores y factores ambientales adversos (Aguirre *et al.*, 2013).

De acuerdo con el párrafo anterior y con el análisis de las concentraciones de FT encontradas en los grupos analizados (muestra-especie-procedencia-método de extracción) se encontró que, el método de extracción que genera mayor cantidad de FT es el método por maceración ( $P < 0.05$ ). Ello, posiblemente se debió a que con éste método de extracción se utilizan temperaturas menores (temperatura ambiente) que en el método por Soxhlet:  $\geq 64$  °C (Contini *et al.*, 2008) para que el metanol se vaporice (Autino *et al.*, 2013). En este sentido, la temperatura juega un papel importante en el grado de obtención de FT, puesto que los compuestos fenólicos se biodegradan o biotransforman conforme se alcanzan temperaturas altas ( $\geq 60$ °C) (Orphanides *et al.*, 2013);

hecho que explicaría los resultados de la presente investigación en relación a la menor efectividad del método Soxhlet en la obtención de FT.

Otros factores que también pueden influir, en la concentración de FT de los extractos metanólicos y, que deben ser tomados en cuenta en sucesivas investigaciones son: edad del cladodio utilizado para la obtención del extracto metanólico. Al respecto, Pérez *et al.* (2014) encontraron que las concentraciones de FT dependen de la madurez de las plantas con las que se pretende realizar la extracción, siendo las plantas maduras quienes presentan menor concentración de FT y flavonoides en comparación con las inmaduras o más jóvenes. Así mismo, el origen agroecológico (Hernández *et al.*, 2011; Moussa *et al.*, 2014) y, las características bromatológicas de las plantas (Lozano, 2011). Pero más importante aún es el método de deshidratación de las muestras. Puesto que la revisión bibliográfica, con fines de contrastación de los resultados de la presente investigación revelaron que, la deshidratación de las muestras por el método de liofilización -proceso que permite reducir la pérdida de componentes volátiles o termo-sensibles (Ramírez, 2006)- produce mayor cantidad de FT, ello si se comparan los resultados de Moussa *et al.* (2014) y Guevara *et al.* (2010) -quienes utilizaron este método de deshidratación-, con el método utilizado en esta investigación: el método de deshidratación de las muestras fue por desecación a temperaturas de  $\geq 45$  °C.

Con respecto a las tres pruebas de capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) a las cuales se sometieron los extractos metanólicos analizados, estas determinaron que dichos extractos produjeron menor actividad antioxidantes, si se compara con los resultados obtenidos por otros investigadores en diferentes especies de *Opuntia* (Dok-go *et al.*, 2003; Sengul *et al.*, 2009; Chahdoura *et al.*, 2014; Moussa *et al.*, 2014). Ello, pudo deberse a que la concentración de FT fue menor en todos los grupos analizados en comparación con lo reportado por otros investigadores citados en este trabajo; menores cantidades de dichos compuestos posiblemente

asociados a la biodegradación de los compuestos fenólicos por causa de la exposición a temperaturas  $>50^{\circ}\text{C}$  durante la deshidratación de las muestras y al método de extracción, en este caso la extracción en equipo Soxhlet implica una temperatura superior a  $64^{\circ}\text{C}$  (Orphanides *et al.*, 2013). Medina *et al.* (2011), determinaron que cuando los cladodios son deshidratados a temperaturas superiores a  $60^{\circ}\text{C}$  la concentración de compuestos fenólicos es menor en comparación a cuando los cladodios son deshidratados a  $45^{\circ}\text{C}$ ; sin embargo, aun con esta temperatura existe pérdida de compuestos fenólicos.

Romano *et al.* (2009), determinaron que el efecto antioxidante o antimicrobiano encontrado en extractos metanólicos de plantas no se debe únicamente a la concentración de fenoles, también se debe a la combinación entre dichos compuestos; puesto que al probar los mismos compuestos por separado, su efecto es menor que cuando están en combinación. Esto sugiere que las diferentes mezclas de compuestos fenólicos, en los extractos de epidermis principalmente, pudieron ser las causantes de variabilidad en la actividad antioxidante y no tanto a las concentraciones obtenidas de FT y flavonoides en los extractos analizados en esta investigación. Por lo que, el efecto de los extractos de epidermis de cladodio de sobre BMA y CT en leche cruda 2 h post-adición del extracto, pudo deberse a una mayor combinación de los fenoles en dichos extractos de *O. ficus-indica* u *O. atropes* más que a la dosis ( $50\ \mu\text{g}$  de FT: 1 ml de leche cruda), puesto que todos los grupos (extractos metanólicos) se adicionaron a las muestras de leche cruda en la misma dosis. Lo cual sugiere que no es la dosis de FT existente en el extracto lo que afecta las UFC  $\text{mL}^{-1}$  de bacterias en leche cruda, sino más bien el tipo de fenoles y el sinergismo entre estos lo que provoca una mayor o menor eficiencia al momento de reducir las cuentas bacterianas en la leche.

Por último, los extractos de epidermis de cladodio (obtenidos por maceración) independientemente de la especie (*O. ficus-indica* y *O. atropes*) mostraron eficacia para disminuir las UFC  $\text{mL}^{-1}$  de mesófilas aerobias y coliformes totales en leche cruda, ello dos horas

después de la adición de estos extractos a la leche cruda. Esto sugiere que, la implementación de extractos metanólicos de epidermis de *O. ficus-indica* u *O. atropes* y su posterior adición (50 µg de fenoles totales: 1 mL de leche cruda) es una alternativa viable para incrementar la calidad bacteriológica de la leche procedente de sistemas de producción a escala familiar; pues estos, además de producirla, la consumen, venden o procesan para elaborar quesos o yogurt artesanal.

### LITERATURA CITADA

- Aguirre, J.J., De La Garza, T.H., Zugasti, C.A., Belmares, C.R., y Aguilar, C.N. 2013. The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 3(6), 436-442.
- Ahmed, M.S., Tanbouly, N.D.E., Islam, W.T., Sleem, A.A. y Senousy, A.S.E. 2005. Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt. 2005. *Phytother. Res.* 19, 807-809.
- Ammar, I., Ennouri, M., Khemakhem, B., Yangui, T., y Attia, H. 2012. Variation in chemical composition and biological activities of two species of *Opuntia* flowers at four stages of flowering. *Industrial Crops and Products*. 37(1), 34-40.
- Andrade, F.M., Bispo, S.V., Rocha, F.R.R., Urbano, S.A., y Costa, C.T.F. 2012. The use of cactus as forage for dairy cows in semi-arid regions of Brazil. *Organic Farming and Food Production*. 169-189.
- Arriaga, J.C., Heredia, N.D., Martínez, G.C. y Rayas, A.A. 2013. Importancia de los Sistemas de Producción de Leche a Pequeña Escala en México. 1er Congreso Nacional de Producción, Calidad, Transformación, Comercialización y Nutrición de la Leche y sus Derivados. Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto de Ciencias Agropecuario y rural (ICAR).
- Autino, J.C., Romanelli, G.P., y Ruiz, D. M. 2013. Introducción a la Química Orgánica. 185-188.
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A., y Marin-Iniesta, F. 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *J. FoodProt.* 70, 2757-2763.
- Cervantes, R.C. 2005. Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. *Anais do X Encontro de Geógrafos da América Latina -20 a 26 de março de 2005- Universidade de São Paulo*. 3388-3403.

- Chahdoura, H., Barreira, J.C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C., y Achour, L. 2014. Phytochemical characterization and antioxidant activity of the cladodes of *Opuntia macrorhiza* (Engelm.) and *Opuntia microdasys* (Lehm.). *Food & function*. 5(9), 2129-2136.
- Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., y Anelli, G. 2008. Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature. *Food Chemistry*. 110(3), 659-669.
- De Leo, M., Abreu, M.B.D., Pawlowska, A.M., Cioni, P.L., Braca, A. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. 2010. *Phytochem. Lett.* 3, 48-52.
- Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D. y Zhao, Y. 2014. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*. 38, 184-191.
- Dok-Go, H., Lee, K.H., Kim, H.J., Lee, E.H., Lee, J., Song, Y.S. y Cho, J. 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin,(+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Brain research*. 965(1), 130-136.
- Fuentes, C.G., Ruiz, R.R.A., Sánchez, G.J.I., Ávila, R.D.N., y Escutia, S.J. 2013. Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. 10(4), 419-432.
- Galluzzi, G., Van Duijvendijk, C., Collette, L., Azzu, N., y Hodgkin, T. 2011. Biodiversity for Food and Agriculture. Contributing to food security and sustainability in a changing world. PAR platform, FAO, Rome. 49-51.
- Garcés, R., Brito, C., Cabello, M., Orellana, A., Brandl, E. y López, J.L. 2005. Determinación de la calidad microbiológica de la leche cruda y del quesillo artesanal elaborado en una cooperativa de campesinas en una zona del centro-sur de Chile. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*. 366, 62-69.
- Gliessman, S. R., Rosado-May, F. J., Guadarrama-Zugasti, C., Jedlicka, J., Cohn, A., Méndez, V. E. y Jaffe, R. 2007. Agroecología: promoviendo una transición hacia la sostenibilidad. *Revista Ecosistemas*. 16(1), 13-23.
- Godar, P.B., Hoch, J., Johnson, L., de Koning, J., Medina, J., Steinbrenner, G. y Weigelt, V. 2010. La producción familiar como alternativa de un desarrollo sostenible para la Amazonía: Lecciones aprendidas de iniciativas de uso forestal por productores familiares en la Amazonía boliviana, brasilera, ecuatoriana y peruana. CIFOR. 104-106.

- Gyawali, R., y Ibrahim, S. A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. 46, 412-429.
- Hernández, U.M.I., Pérez, T.E., y Rodríguez, G.M.E. 2011. Chemical analysis of nutritional content of prickly pads (*Opuntia ficus-indica*) at varied ages in an organic harvest. *International journal of environmental research and public health*. 8(5), 1287-1295.
- Khadem, S. y Marles, R.J. 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules* 15, 7985-8005.
- Leyva, J.M., Pérez, C.J.J., González, A.G.A., Esqueda, M., y Ayala, Z.J.F. 2013. Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*. *Revista mexicana de micología*. 37, 11-17.
- Longo, L. y G. Vasapollo, 2006. Extraction and identification of anthocyanins from *Smilax aspera* L. berries. *Food Chemistry*. 94, 226-231.
- López, A.S. y Belloso, O.M. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*. 18(4), 329-343.
- López, G.J.J., Fuentes, R.J.M., Rodríguez, G.A. 2007. Producción y uso de *Opuntia* como forraje en el centro-norte de México. Departamento de agricultura. Depósito de documentos de la FAO. p. 36-45
- Lozano, L. 2011. Ecofisiología de la tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). *Horticultura Argentina*. Universidad Nacional de Salta. 30(72), 37-52.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., y Del Nobile, M. A. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*. 3, 287.
- Medina, T.L., Vernon, C.E.J., Gallegos, I.J.A., Rocha, G.N. E., Herrera, V.E.E., Calderas, F. y Jiménez, A.R. 2011. Study of the antioxidant properties of extracts obtained from nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes after convective drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91(6), 1001-1005.
- Moreno, G.A., Herrera, A.G., Carrión, G.M., Álvarez, B.D, Pérez, S.R. y Ortiz, R.R. 2012. Caracterización y modelación esquemática de un sistema familiar de bovinos productores de leche en la Ciénega de Chapala, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 20 (3-4), 85-94. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional. Jiquilpan, Michoacán, México.
- Mostafa, E.K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M. y Cherkaoui-Malki, M. 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of

- bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules*. 19(9), 14879-14901.
- Moussa, A.T.E., El-Hady, E.S.A.A., Omran, H.T., El-Samahy, Kroh, L.W.S.K. y Rohn, S. 2014. Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. *Food Research International*. 64, 864-872.
- Muehlhoff, E., Bennett, A., y McMahon, D. 2013. Milk and dairy products in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 243-263.
- Orphanides, A., GOulAs, V. y GekAs, V. 2013. Effect of drying method on the phenolic content and antioxidant capacity of spearmint. *Czech J. Food Sci*. 31(5), 509-513.
- Ortiz, R.R., García, G.R.A., Valdez, A.J.J., Lara, C.Ma.B.N. y Perez, S.R.E. 2012. Estudio exploratorio del efecto de la adición de nopal (*Opuntia ficus-indica*) a la leche cruda sobre cuentas bacterianas: Mesófilas aerobias y Coliformes. XXII Encuentro de investigación veterinaria y producción animal. 21-26.
- Ortiz, R.R., Valdez, A.J.J., Garcidueñas, P.R., Chávez, M.M.P., Val, A.D., Hernandez, V.E.F. y Pérez, S.R.E. 2013. Effect of added nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) on microbial content in raw milk. *African Journal of Microbiology Research*. 12 July, 2013. 7(28), 3675-3680.
- Parashar, S., Sharma, H., y Garg, M. 2014. Antimicrobial and Antioxidant activities of fruits and vegetable peels: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(1), 160-164.
- Pérez, S.R.E., Delgado, S.L.A., García, S.P.A. y Ortiz, R.R. 2015. .Efecto de la adición de extractos metanólicos de cladodios de nopal (*Opuntia ficus-indica* y *Opuntia atropes*) a leche cruda bovina sobre mesófilas aerobias y coliformes totales. p. 2-4. Producción y Aprovechamiento del Nopal y Maguey XIV Symposium-Taller Nacional. Monterrey, Nuevo León. México.
- Rojas, R.M.R., Lammoglia, V.M.A., Daniel, R.A.I.C., Cabrera, N. y Cruz, B.E. 2014. Presencia de microorganismos en leche cruda de vaca durante la ordeña en clima tropical. XLI Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria A.C. (AMPA) y VII Reunión Nacional de Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán, México del 2 al 4 de Julio de 2014. 487-491.
- Romano, C.S., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A.A. y Moreno, S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. *Food chemistry*. 115(2), 456-461.
- Sakly, C., Rekik, M., Ben Salem, I., Lassoued, N., Gonzalez, A.B., Ben Salem, H. 2014. Reproductive response of fat-tailed Barbarine ewes subjected to short-term nutritional

- treatments including spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) cladodes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 98, 43-49.
- Salcedo, S., y Guzmán, L. 2014. Agricultura familiar en América Latina y el Caribe: recomendaciones de política. Santiago: FAO. 317-325.
- Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., y Ercisli, S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak J Pharm Sci*. 22(1), 102-106.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). 2011. Base de datos estadísticos con relación a la producción pecuaria. Disponible en internet: <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/>.
- Vera, A.H., Hernández, A.L., Espinoza, G.J., Ortega, R.L., Díaz, A.E., Román, P.H., Núñez, H.G., Medina, C.M. y Ruiz, L.F. (Eds.) 2009. Producción de leche de bovino en el sistema familiar. p. 384. INIFAP. CIRGOC. Libro técnico Núm. 24. Veracruz, México.
- Verpoorte, R., y Memelink, J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants. *Current opinion in biotechnology*. 13(2), 181-187.