

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE FRUCTANOS DE MAGUEY (*AGAVE SALMIANA*
OTTO EX SALM-DICK)**

PRESENTA:

BRENDA PAMELA FRANCO ARTEAGA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. BERTHA IRENE JUÁREZ FLORES

ASESORES:

DR. JUAN ROGELIO AGUIRRE RIVERA

DR. HUGO MAGDALENO RAMÍREZ TOBIAS

FECHA

14 de Diciembre del 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE FRUCTANOS DE MAGUEY (*AGAVE SALMIANA*
OTTO EX SALM-DICK)**

PRESENTA:

Ing. Ambiental Brenda Pamela Franco Arteaga

COMITÉ TUTELAR:

DIRECTOR: Dra. Bertha Irene Juárez

ASESOR: Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera

ASESOR: Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobias

SINODALES:

PRESIDENTE: Dra. Bertha Irene Juárez

SECRETARIO: Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera

VOCAL: Dra. Erika García Chávez

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

PROYECTO REALIZADO EN:

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE ZONAS DESÉRTICAS

CON FINANCIAMIENTO DE:

FUNDACION PRODUCE

A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:

**METDODOS DE EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y USOS DE FRUCTANOS DE
Agave salmiana EN SAN LUIS POTOSI**

AGRADEZCO A CONACyT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS

Becario No. 371313

**AGRADEZCO AL CENTRO DE RECURSOS NATURALES Y DESARROLLO (CNRD) POR
FINANCIAR MI ESTANCIA EN LA UNIVERSIDAD DE COLONIA DE CIENCIAS
APLICADAS (CUAS)**

**LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO ATRAVÉS
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

Agradecimientos:

A Dios, por bendecirme en cada paso de mi vida.

A mis padres, que siempre me han apoyado incondicionalmente, gracias.

A mis hermanos, que son un ejemplo a seguir tanto a nivel profesional como personal.

A la Dra. Bertha, Dr. Aguirre y el Dr. Hugo, que dirigieron este proyecto para lograr la mejor versión del mismo.

A todos los compañeros de la maestría, que se convirtieron en amigos durante este breve momento que compartimos; ojala nos sigamos encontrando en nuestros caminos.

Al personal del IIZD y PMPCA que ofrecieron su apoyo y guía en los trámites que implicaba la maestría.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	1
INDICE DE CUADROS	3
INDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN.....	5
1. Introducción.....	6
1.1. Fructanos.....	6
1.1.1. Estructura.....	7
1.1.2. Clasificación.....	7
1.1.3. Principales fuentes.	8
1.1.4. Fructanos comerciales.	9
1.1.5. Propiedades fisicoquímicas y aplicaciones	10
1.2. Generalidades sobre <i>Agave salmiana</i>	12
1.2.1. Usos del maguey	13
1.2.2. Metabolismo del maguey.	15
1.2.3. Carbohidratos.....	16
2. Materiales y métodos.....	18
2.1. Material vegetal.....	18
2.2. Método 1	19
2.3. Método 2	20
2.4. Método 3	20
2.5. Método 4.....	20
2.6. Pureza.....	21
3. Resultados y Discusión	22
3.1 Rendimiento	22
3.2 Pureza.....	26
3.2.1. Azúcares reductores por Fehling-Soxhlet.....	26
3.2.2. Cromatografía en capa fina (CCF)	27

4. Conclusiones	29
5. Bibliografía	30
6. Anexos	36

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Usos antiguos y actuales del maguey	14
Cuadro 2. Presencia de azúcares reductores (g/100g) en los extractos obtenidos por cada método.	26
Cuadro 3. Valores de Rf X100 de los compuestos obtenidos con los diferentes métodos y procesados en CCF (distancia 10 cm).....	27

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Rendimiento medio de fructanos extraídos con los diferentes métodos. (Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes; n=8-10).	23
Fig. 2. Perfil por cromatografía en capa fina de los estándares (Sigma-Aldrich): a) fructosa, b) glucosa, c) isomaltotriosa, d) maltoheptosa, e) maltopentosa, f) cestosa, g) nistosa, h) inulina de achicoria (Sigma-Aldrich) y i) fructanos de <i>A. angustifolia</i> ssp. <i>tequilana</i> (Delicias Mexicanas) ..	36
Fig. 3. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 1: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.....	37
Fig. 4. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 2: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.....	38
Fig. 5. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 3 Precipitado: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10	39
Fig. 6. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 3 Sobrenadante: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10	40
Fig. 7. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 4 Precipitado: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10	41
Fig. 8. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 4 Sobrenadante: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10	42

RESUMEN

Los fructanos son oligómeros o polímeros de fructosa unidos por enlaces glucosídicos (fructosa, glucosa y sacarosa), que se producen como los hidratos de carbono de reserva en varias especies de familias de plantas, principalmente en Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Solanaceae, Asteraceae y Agavaceae. En la actualidad, se profundiza en estudios de carbohidratos en esta última familia, por la gran importancia económica que tiene en México. Maguey, es el nombre común aplicado a las especies del género *Agave*. Este género comprende alrededor de 200 especies de las cuales la mayor parte se encuentra en México, territorio considerado como su centro de origen y domesticación. *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick crece de manera silvestre en el altiplano potosino-zacatecano y es recolectada principalmente para la elaboración de mezcal. El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes métodos usados para extracción de polisacáridos, y de esta manera proponer el o los más métodos indicados para fructanos de *A. salmiana*, tomando como base el rendimiento y la pureza del producto obtenido. La técnica analítica utilizada fue cromatografía en capa fina, para identificar la pureza de las extracciones realizadas por cada metodología, el método de Fehling–Soxhlet para la detección de azúcares reductores debido a hidrólisis accidental y la cuantificación del rendimiento relativo. Con base al análisis estadístico ($\alpha=0.05$), se encontraron diferencias significativas en el rendimiento medio obtenido con los diferentes métodos utilizados; el Método 4 produjo significativamente mayor rendimiento que el registrado en los otros métodos de extracción (17.58%). De acuerdo con el análisis cromatográfico, y con base a los valores de Rf (relación de frentes o factor de retardo) de los extractos obtenidos con los diferentes métodos evaluados, se puede afirmar que con todos los métodos se obtuvieron fructanos con un grado de polimerización similar a los fructanos comerciales de *A. angustifolia* ssp. *tequilana*, además de otros fructooligosacáridos de menor peso molecular, cuya presencia es normal durante su proceso de síntesis.

Palabras claves: fructanos, hidratos de carbono de reserva, *A. salmiana*.

1. Introducción

1.1. Fructanos

Aproximadamente un 45% del total de especies de plantas superiores agrupadas en 10 familias, presentan fructanos como su reserva principal de carbohidratos, los cuales normalmente son almacenados en hojas, tallos o raíces, particularmente si estos órganos están especializados en almacenamiento como ocurre en bulbos, tubérculos y rizomas (Hendry, 1993). Los fructanos también son producidos por algas, bacterias y hongos.

Debido a que los fructanos son el equivalente metabólico del almidón, se ha tratado de establecer su función fisiológica. En muchas especies, particularmente asteráceas y liliáceas, los fructanos son la principal reserva de carbohidratos. En otras familias, como las poáceas y boragináceas, es el carbohidrato principal presente durante las etapas tempranas de crecimiento.

La diferencia más evidente entre el almidón y los fructanos es su solubilidad. Los fructanos se encuentran en las vacuolas y son solubles, mientras que el almidón está en los plastidios y es insoluble. La función natural de los fructanos, además de carbohidrato de reserva, está vinculada con la regulación de la absorción y retención de agua, y con el crecimiento al generar mayor tolerancia a bajas temperaturas (Hendry, 1993).

En las plantas, la síntesis de fructanos involucra al menos dos enzimas. La primera cataliza la producción de glucosa-fructosa-fructosa, trisacárido al que se le pueden añadir más residuos de fructosa mediante una o más enzimas adicionales. Las vacuolas son los únicos compartimentos celulares donde las plantas realizan la síntesis de fructanos, ya que sólo en ellas se encuentran las enzimas necesarias.

Tanto el organismo (plantas, hongos o bacterias) como la forma de producción tienen gran influencia sobre la estructura, el grado de polimerización (GP) y la pureza del fructano final.

1.1.1. Estructura. Los fructanos son fructosil polímeros consistentes en cadenas lineales de D-fructosas (aunque se pueden observar diferentes grados de ramificación según su complejidad), unidas por un enlace β -(2 \rightarrow 1), y usualmente tienen una molécula de D-glucosa terminal, unida a una fructosa por un enlace α -(2 \rightarrow 1) (Delaquis y Mazza, 1998; Hogarth *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2001).

La definición anterior no está limitada únicamente por el peso molecular, ya que incluye moléculas con grado de polimerización menor que 10 monómeros, como el dímero inolubiosa (Suzuki y Chatterton, 1996; ANZFA, 1995). Generalmente en la naturaleza el grado de polimerización varía entre 2 y 70 unidades, pero la cifra más común de polimerización es 10 unidades (Perrin *et al.*, 2001). Las moléculas de fructanos también pueden presentar monómeros de glucosa en su estructura; en estos casos, pueden ser considerados los complejos resultantes de la combinación y polimerización de tres azúcares: 1-cetosa (1-cetotriosa), nitosa (1,1-cetotetrosa), y la 1- β -fructofuranosilnitosa (Wang y Park, 1997; Hogarth *et al.*, 2000; Otero, 2003). Existe también una cuarta estructura, un pentafructano, aún sin caracterizarse (Wang y Park, 1997). La estructura química de los fructanos es tal que los hace solubles en agua, lo cual tiene importantes implicaciones en la dinámica celular de las plantas, así como en la industria alimentaria.

1.1.2. Clasificación. Los fructanos se clasifican de acuerdo con las unidades estructurales que conforman su molécula, en los tipos siguientes:

Inulina: son oligo/polímeros de D-fructosas unidas por enlaces β (2 \rightarrow 1), con una molécula de D-glucosa terminal. La inulina se encuentra presente en especies de la familia Asteraceae, particularmente en *Chichorium intybus* (Kolida y Gibson, 2007). Franck y De Leenheer (2005) describen la inulina como una mezcla de oligómeros y polímeros, cuyo GP puede alcanzar hasta

70 unidades de fructosa más una glucosa terminal. La inulina en las plantas por lo general contiene hasta 10% de mono y disacáridos (principalmente fructosa y sacarosa), además de una serie de oligosacáridos, entre los cuales los fructooligosacáridos (FOS) constituyen hasta el 30% (Niness, 1999).

Levanos: son producidos por monocotiledóneas, su estructura es lineal, presentan uniones de glucosa y fructosa β (2 \rightarrow 6) o incluso β (2 \rightarrow 1). Estos fructanos generalmente son de cadena relativamente corta. Se encuentran en algunos zacates como *Dactylis glomerata* (Suzuki y Chatterton, 1996).

Graminanos: presentan enlaces tanto β (2 \rightarrow 1) como β (2 \rightarrow 6) fructofuranosil y una molécula de glucosa terminal; son sintetizados por algunos cereales como *Hordeum vulgare* y *Triticum aestivum*.

Inulina neoserie: son cadenas lineales de fructosas unidas mediante enlaces β (2 \rightarrow 1) en los carbonos 1 y 6 de la glucosa de una molécula de sacarosa; se encuentran principalmente en *Allium cepa* (Alliaceae) y *Asparagus officinalis* (Liliaceae) (Suzuki y Chatterton, 1996; Mancilla y López, 2006).

Levano neoserie: son polímeros con enlaces tipo β (2 \rightarrow 6) unidos a la glucosa de una molécula de sacarosa; fueron aislados de *Avena sativa*.

Agavinas: presentan enlaces tanto β (2 \rightarrow 1) como β (2 \rightarrow 6) fructofuranosil y una molécula de glucosa interna; son sintetizados por varias especies de *Agave* (Vijn y Smeekens, 1999; Van Laere y Van den Ende, 2002; López *et al.*, 2003).

1.1.3. Principales fuentes. Hasta 36,000 especies diferentes de plantas contienen entre sus carbohidratos de reserva a diversos tipos de oligofructanos (Niness, 1999), pero sólo en unas pocas de ellas el contenido de fructanos puede llegar a constituir hasta el 24% de la masa cruda (Utha State University, 2003).

Los fructanos se encuentran presentes en cantidad significativa en algunos alimentos como: ajo (*Allium sativum* L.), cebolla (*Allium cepa* L.) (Niness, 1999; Deis, 2001), cebada (*Hordeum distichum*, *H. tetrastichum*, y *H. hexastichum*), cacahuete (*Arachis hypogaea* L.), jitomate

(*Lycopersicon esculentum* Mill), espárrago (*Asparagus officinalis* L.), puerro (*Allium porrum* L.) (Flickinger y Fahey, 2002), y hasta en las bananas (*Musa* sp.) (Anónimo, 1994; ANZFA, 2001; Pujato, 2002). En estos alimentos los fructanos aportan valores energéticos entre 1 y 1.5 kcal/g (Anónimo, 1994).

Las principales familias de plantas con fructanos en su composición son Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Solanaceae, Asteraceae (Marquina y Santos, 2003) y Agavaceae. Sin embargo, son muy pocas las especies de las que de manera industrial rentable se pueden producir y extraer fructanos comerciales.

No obstante, si de cantidades se trata, las principales fuentes de oligofructanos más conocidas son la achicoria (*Cichorium intybus*), alcachofa (*Cynara scolymus*), pataca, aguaturma o tupinambo (*Helianthus tuberosus*), alcachofa globo (*Cynara cardunculus*), yacón (*Smallanthus sonchifolius*) y dalia (*Dahlia pinnata* Cav.) (Fletcher, 1999; Hellwege *et al.*, 2000; Flickinger y Fahey, 2002; Deis, 2001; López *et al.*, 2005).

1.1.4. Fructanos comerciales. Los fructanos más ampliamente estudiados y de mayor uso industrial son la inulina, la oligofructosa y los fructooligosacáridos (Biedrzycka y Bielecka, 2004), caracterizados por sus enlaces de tipo β -(2→1) entre las unidades de fructosa, con grado de polimerización entre 2 y 60 unidades (Biedrzycka y Bielecka, 2004), y considerados como carbohidratos de cadena corta (Englyst y Hudson, 1996), o de bajo nivel de polimerización (Roberfroid, 2000).

La inulina proveniente de la achicoria destaca hasta el momento como la mejor opción en cuanto a cantidad y calidad (Coussement, 1999; Ninness, 1999). Generalmente en la achicoria sus fructanos son de muy bajo peso molecular y bajo grado de polimerización (Hellwege *et al.*, 2000).

1.1.5. Propiedades fisicoquímicas y aplicaciones. El peso molecular de los fructanos es muy variable, pues depende principalmente de la fuente, pero en términos generales oscila entre 1,000 y 4,500 Da (Losso y Hakai, 1997).

Los enlaces β (2 \rightarrow 1) característicos de los fructanos son los responsables de que sean indigestibles, como sí lo sería cualquier carbohidrato típico; por ello tienen bajo valor calórico y función nutricional equivalente a fibra alimentaria (Niness, 1999). Así, la naturaleza de estos enlaces tiene importantes implicaciones bioquímicas asociadas con su marcada resistencia a la digestión, cuando son consumidos por seres humanos (Perrin *et al.*, 2001).

A diferencia del almidón mayoritariamente insoluble, los fructanos son totalmente solubles; en estado sólido puro suelen presentar formas cristalinas (Suzuki y Chatterton, 1996), son higroscópicos y difíciles de mantener en forma liofilizada, a no ser que se empleen atmósferas modificadas (Deis, 2001; Yun, 2003). Estos cristales pueden tener puntos de fusión entre 199°C y 200°C cuando se trata de fructanos de bajo grado de polimerización (Yun, 2003). Son muy solubles en etanol al 80%, especialmente con temperaturas alrededor de 80°C (Hellwege *et al.*, 2000). Su capacidad de ser hidrosolubles otorga a los fructanos propiedades humectantes cuando se emplean como aditivos en la industria de alimentos, así como la capacidad de formar geles cremosos cuando se calientan en medios acuosos (Pujato, 2002).

La viscosidad de las disoluciones de fructanos es generalmente más alta que la de los demás carbohidratos a la misma concentración, y suelen ser de mayor estabilidad térmica (Yun, 2003).

Los fructanos poseen un sabor neutral y ligeramente dulce. Así, por ejemplo, los fructanos de más bajo peso molecular pueden tener una dulzura del 10% de la sacarosa, así como rotaciones ópticas específicas de +28.5 (Yun, 2003). Como cualquier polisacárido, los fructanos son fácilmente hidrolizados por la acción térmica, o de ácidos, o enzimas; así, la oligofructosa comercial comúnmente se obtiene por medio de una hidrólisis parcial de la inulina cruda (Pujato, 2002).

Los fructanos suelen ser muy estables en los valores de pH encontrados en la mayoría de los alimentos (cuatro a siete), así como bajo refrigeración (Yun, 2003). Los oligofructanos son incoloros e inodoros y son estables hasta temperaturas cercanas a los 140 °C (Suzuki y Chatterton, 1996). Algunas fracciones de oligofructanos pueden tener capacidades reductoras (De Gennaro *et al.*, 2000).

En dependencia de su origen (vegetal o microbiano), los fructanos pueden ser lineales, ramificados o cíclicos, y suelen agruparse de acuerdo con su grado de polimerización promedio (GPprom) y grado de polimerización máxima (GPmáx). En los de origen vegetal el GPmáx no excede de 200, y en los de origen bacteriano puede ser tan alto como 100,000 (Roberfroid, 2004). La inulina, la oligofruktuosa y los FOS presentan una estructura polimérica predominantemente lineal. Los fructanos poseen un valor calórico bajo y funcionalidad nutricional como fibra alimentaria, debido a sus enlaces químicos.

Dentro de la industria alimentaria los fructanos son utilizados como aditivos en panificación, heladería e industria láctea, ya que proveen un moderado sabor dulce, textura y sabor similar al de las grasas, pero con la ventaja de contener entre una sexta y una novena parte de las calorías de éstas.

La propiedad más ampliamente estudiada de los fructanos es su acción prebiótica (Roberfroid, 2007), esto es, su capacidad selectiva de estimular el predominio de un grupo de bacterias en el colon (bifidobacterias y lactobacilos), con la consecuente disminución de otras especies que pueden ser perjudiciales (*E. coli* y *Clostridium* spp.) (Gibson, 1999; Rendón *et al.*, 2011).

En la actualidad, la presencia de ciertas cantidades de inulina o sus derivados en la formulación de un producto alimentario es suficiente para que dicho producto pueda ser considerado como “alimento funcional” (Roberfroid, 2007). Un alimento funcional es aquel que contiene un componente con actividad selectiva favorable o un efecto fisiológico adicional a su valor

nutricional (Silveira *et al.*, 2003). El efecto positivo en la salud se refiere a una mejoría de las funciones del organismo o la disminución del riesgo de una enfermedad (Aswell, 2004).

Otras propiedades benéficas para la salud atribuidas a los fructanos son: promoción de la flora intestinal deseable, refuerzo de las funciones inmunológicas (ante cáncer o tumores), aumento de la biodisponibilidad de minerales (como el calcio), prevención de enfermedades cardiovasculares y diabetes, y mejora del metabolismo de las grasas y de la reacción glicémica (Franck, 2006; Dávila, 2012).

1.2. Generalidades sobre *Agave salmiana*

Magüey es el nombre común aplicado a las especies del género *Agave* (familia Agavaceae, endémica de América). El género comprende alrededor de 200 especies, de las cuales la mayor parte se encuentra en México, territorio considerado como su centro de origen y domesticación (Gentry, 1982; García-Mendoza, 1998; García M., 2007; Eguiarte y Souza, 2007). Las especies mexicanas de magüey pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta los 3,400 m de altitud, y son especialmente abundantes en las comunidades vegetales xerofíticas (García M., 2007).

Vestigios arqueológicos de más que 10,000 años muestran que la primera forma de aprovechamiento del magüey fue como alimento (agua y azúcares); y seguramente se inició por primera vez al observar que atraía a los animales en la vegetación donde sobresalían los quiotes durante la floración, comenzando a cortarlos y consumirlos chupados por su jugo sin saponinas, para luego descubrir que los quiotes asados resultaban ser más dulces (García-Mendoza, 1998; Aguirre *et al.*, 2001; Aguirre R., 2009). Posiblemente después se cocieron las cabezas de magüey (tallos y bases de penca), eliminando con ello la escasez estacional de alimento. El siguiente paso en la utilización del magüey fue posiblemente extraer el jugo azucarado de las cabezas cocidas (mezcal) macerándolas o exprimiéndolas, el cual al fermentarse espontáneamente dio lugar a la bebida alcohólica fermentada que indistintamente se le llamó mezcal (Aguirre *et al.*, 2001; Aguirre R., 2009). Pero no fue sino hasta la introducción

clandestina del alambique filipino por marineros del Nao de China en el siglo XVII, que se inició la destilación del vino de mezcal, obteniéndose los distintos aguardientes de maguey, entre los que se encuentran el mezcal, tequila y bacanora, productos elaborados con materias primas y procesos distintos que le confieren propiedades organolépticas y características propias de la especie y su proceso de elaboración (García-Mendoza, 1998; García M., 2007; Vázquez-García *et al.*, 2007; Aguirre R., 2009).

Las especies principales utilizadas actualmente para la elaboración de mezcal son *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. marmorata* y *A. karwinskii* para Oaxaca; *A. cupreata* y *A. angustifolia* para Guerrero; *A. duranguensis* para Durango; *A. salmiana* para Zacatecas y San Luis Potosí; *A. angustifolia ssp. tequilana* para tequila y *A. angustifolia* para bacanora (Aguirre *et al.*, 2001; Carrillo, 2007).

A diferencia de otras especies de maguey, *A. salmiana* crece de manera silvestre en el altiplano potosino-zacatecano y es recolectado principalmente para la elaboración de mezcal (Tello-Balderas, 1985; Aguirre *et al.*, 2001). El ambiente del maguey mezcalero potosino-zacatecano presenta tres estaciones funcionales: la primera de marzo a junio (seca), la segunda de julio a octubre (lluvias) y la tercera de noviembre a febrero (fría), las cuales repercuten en el rendimiento y productividad del mezcal (Aguirre *et al.*, 2001).

La región donde se fabrica el mezcal potosino en el altiplano y las áreas donde se recolecta el maguey, son ejidales. Estas son tierras que se encuentran en los alrededores del poblado y que forma parte de la economía de las comunidades rurales del altiplano.

1.2.1. Usos del maguey. Los usos del maguey se remontan a la época precolombina, cuando los pueblos indígenas encontraron en esta planta una fuente abastecedora de materia prima para elaborar cientos de productos, como los indicados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Usos antiguos y actuales del maguey

Parte del maguey	Usos antiguos y actuales
Fibras duras foliares	Tejer costales, tapetes, morrales, ceñidores, redes de pesca y cordeles
Pencas secas enteras	Para techar las casas a modo de tejado
Quiotes secos (escapo floral que llega a alcanzar más de 3m)	Servían como vigas y como cercas para delimitar terrenos
Púas o espinas	Se utilizaban como clavos y como agujas
Raíces	Cepillos, escobas y canastas
Jugo del maguey (aguamiel)	“Miel” de maguey
Bebidas alcohólicas	Pulque y mezcal
Artesanías con la fibra del maguey para uso suntuario y accesorios varios.	Bolsas, macetas y cuadros (Teotihuacan, Estado de México; Ixmiquilpan, Hidalgo).
Artesanías con las semillas y la flor del maguey	Aretes de espinas de maguey (Valle del Mezquital, Hidalgo).
Derivados culinarios	Uso de pencas, para la preparación de: barbacoa, mexiotes y gusanos. Uso de pulque natural o curado, para la preparación de “salsas borrachas”, carnitas de puerco o barbacoa, riñones, jamón “empulcado”, ayocotes en tlachicotón, algunos licores y postres (como nieves de pulque curado)

Fuente: Ramírez R., 2007

A pesar de esta diversidad de usos, sólo unos cuantos de ellos han prevalecido y se han transformado a lo largo de la historia.

1.2.2. Metabolismo del maguey. El maguey mezcalero potosino (*Agave salmiana*) presenta metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), adaptación bioquímica y fisiológica que permite la fijación de CO₂ de una forma que la economía hídrica de la planta es más eficaz.

A diferencia de las plantas C3 y C4, las plantas CAM asimilan CO₂ atmosférico en ácidos de cuatro carbonos, predominantemente de noche, y subsecuentemente lo fijan durante el día siguiente por la vía del ciclo de Calvin. Los estomas de las plantas CAM permanecen abiertos durante la noche y cerrados durante la mayor parte del día; de esta manera ocurre una pérdida mínima de agua y la fotorrespiración es reducida (Herppich y Peckmann, 2000). Por tanto, las plantas CAM son cinco a diez veces más eficientes en el uso del agua que las plantas C4, y presentan una considerable ventaja competitiva en ambientes donde el agua es el factor limitante, como sucede en los desiertos o en los ambientes de las epífitas (Cushman, 2001). Las plantas CAM acumulan ácidos orgánicos en la vacuola durante la fase nocturna, predominantemente en forma de ácido málico, y sufren una recíproca acumulación de carbohidratos de reserva, como almidón, glucanos o hexosas solubles, durante la fase diurna.

Los grandes cambios diurnos en la cantidad de ácidos de cuatro carbonos y carbohidratos de las plantas CAM son compensados con la síntesis de grandes cantidades de fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), enzima encargada de la fijación nocturna de CO₂; además, estas plantas poseen sistemas de enzimas decarboxilasas activas para poder volver a fijar CO₂ durante el día mediante el ciclo de Calvin. La PEPC es activada de noche por fosforilación y es inactivada de día por defosforilación, un patrón opuesto al encontrado en plantas C3 o C4.

Además de estas características bioquímicas únicas, las plantas CAM presentan un sinnúmero de adaptaciones morfológicas y anatómicas, dentro de las cuales destacan un mesófilo de células con paredes celulares delgadas y vacuolas prominentes, succulencia en hojas o tallos, estomas pequeños generalmente encriptados, cutículas gruesas, y baja frecuencia de estomas, todo lo cual limita la pérdida de agua (Sharkey, 1993).

Las plantas CAM usualmente poseen mesófilo no clorenquimatoso denominado hidrénquima, el cual está especializado para la acumulación de agua que permite la supervivencia durante largos períodos de sequía. También, el sistema radical de las plantas CAM presenta pequeñas proporciones raíz/vástago que limitan la pérdida de agua hacia el suelo, con lo cual conservan la capacidad para tomar rápidamente el agua cuando está inusualmente disponible (Gibson y Nobel, 1986).

1.2.3. Carbohidratos. Los carbohidratos solubles, la reserva metabólica principal en las plantas, son derivados del dióxido de carbono fijado durante la reacción oscura de la fotosíntesis; además de compuestos energéticos, son precursores de numerosos compuestos necesarios para mantener la salud de la planta, e incluso forman parte de las moléculas de señalización del estrés inducido por la reacción fuente-sumidero (Roitsch, 1999).

Los carbohidratos solubles juegan un papel sustancial en el desarrollo de la planta. Cambios en su cantidad y forma se asocian a menudo con estrés en la planta. Estos cambios pueden ser debidos al aumento o disminución de la biosíntesis de azúcar, conversión del almidón u otras formas de almacenamiento de azúcares solubles, desglose de polisacáridos de la pared celular o cambios en la velocidad de transporte del azúcar. Algunas plantas transgénicas acumulan polioles o polialcoholes que aumentan el potencial osmótico y celular, con lo cual se incrementa su tolerancia al estrés (Abebe *et al.*, 2003).

Los azúcares solubles son un componente universal de la mayoría de los organismos vivos y constituyen las unidades básicas fundamentales en los procesos biosintéticos. No es de extrañar que sus cambios cualitativos y cuantitativos se relacionen a menudo con las reacciones de estrés en la planta. En dependencia de la velocidad de aparición del estrés, los tejidos de la planta pueden presentar cambios rápidos y muy específicos en la reserva de hidratos de carbono solubles y en la acumulación de tejidos. Por ello, la estabilización de su nivel es necesaria para que los resultados analíticos sean verdaderamente una estimación del contenido de azúcar en el instante de la recolección (Maness, 2010).

A fin de validar y documentar la interacción del contenido de azúcares solubles con el estado de estrés, los tejidos de la planta deben ser primero estabilizados de manera que los cambios en la cantidad de azúcar o su identidad no sean modificados durante el muestreo de los tejidos. Los azúcares debe ser extraídos del tejido de la planta y ser estabilizados, en concentración lo suficientemente alta para aplicar un procedimiento analítico. La identidad del azúcar y su cantidad pueden ser determinadas por diversas técnicas analíticas (Maness, 2010).

Como los carbohidratos solubles lo son así en el ambiente acuoso de la célula, pueden ser analizados directamente a partir de líquidos obtenidos de plantas, o pueden requerir su extracción de la matriz de la planta. Durante la extracción y antes del análisis, se deben tomar medidas para evitar cambios en la forma o la cantidad de azúcares por conversión endógena de la actividad de las enzimas, o por contaminación en el crecimiento microbiano. Existen diversos procedimientos para el análisis de azúcares solubles; la elección de la metodología analítica más apropiada, es finalmente dictada por la profundidad de la información requerida (Maness, 2010).

La estructura química de los fructanos, descrita por primera vez en 1804 por Rose en *Inula helenium* (Susuki, 1993), les permite ser solubles en agua, lo cual tiene importantes implicaciones en la dinámica celular de las plantas. Además, al ser almacenados preferentemente en las vacuolas, están disponibles inmediatamente para participar en diferentes funciones de la planta, como la tolerancia al frío y a las sequías.

En estudios previos se ha demostrado que el 50% de los fructanos de maguey se encuentran en los tallos y 22% en la base de las hojas (pencas); así, el tallo es el órgano más importante para el almacenamiento de carbohidratos de reserva del maguey (Aguirre *et al.*, 2001; Michel-Cuello *et al.*, 2008; Jiménez, 2011).

La agavina consiste en una mezcla compleja de fructanos que contienen principalmente enlaces $\beta(2-1)$ y algunos $\beta(2-6)$ y son altamente ramificados; también, se le han encontrado diferencias estructurales atribuidas a condiciones ambientales distintas (Mancilla y López, 2006). Esta heterogeneidad estructural registrada podría atribuirse a los mecanismos de adaptación de las plantas a condiciones fluctuantes, pero también a diferencias fisiológicas asociadas a la madurez.

Actualmente *A. salmiana* se usa principalmente para la elaboración de mezcal, aunque las especies de la familia Agavaceae constituyen una de las fuentes de fructanos más antiguas que se conoce, ya que la presencia de este tipo de carbohidratos fue registrada en algunas especies de maguey desde 1888 (Susuki, 1993). Desde entonces, no se han realizado muchos estudios sobre los fructanos de los magueyes, ni existe un método de extracción de estos polisacáridos adecuado para esta materia prima.

Con base en lo expuesto, el propósito de esta investigación fue probar cuatro métodos para la extracción de un material deshidratado con alto contenido de FOS, a partir del maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm Dick), y evaluarlos con base en su rendimiento relativo y grado de pureza del producto generado.

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Se recolectaron 10 piñas de maguey mezcalero potosino (*A. salmiana*), de tamaño medio (± 60 kg) y en estado de madurez quiotillo o con reproducción incipiente, esto es, con acumulación máxima de reservas (Aguirre *et al.*, 2001). La recolección se hizo en parajes ejidales de donde se abastece la empresa mezcalera “Laguna Seca”, ubicada en el municipio de Charcas, San Luis Potosí (23° 17' 44" Latitud Norte 100° 55' 49" Latitud Oeste y 1962 msnm), durante abril y mayo de 2012.

De cada cabeza o piña se eliminaron la base de las pencas, pues únicamente se utilizó el tallo, el cual se pesó y dividió en cuatro partes iguales, una de ellas para procesarse con cada método, con el propósito de eliminar la variación debida a las piñas individuales.

La aplicación de los métodos 1, 2 y 3 implicó extraer los jugos del trozo del tallo, para lo cual se utilizó un extractor centrífugo para frutas International Serie 18/6/02 Modelo EXS Volt y mediante una prensa hidráulica (15 t) se logró la extracción del jugo remanente del bagazo. Las soluciones obtenidas con los cuatro métodos se deshidrataron, exponiéndolas en bandejas amplias de silicón a temperatura entre 45 °C y 55 °C, el tiempo requerido, en un horno de aire forzado (FELISA Modelo FE 137).

2.2. Método 1

Este método fue desarrollado por López *et al.* (2003) para cabezas de maguey tequilero, y se aplicó sin cambios al material experimental descrito.

El pH del jugo se ajustó a 7 con una solución saturada de hidróxido de sodio para evitar el riesgo de hidrólisis ácida de los fructanos. Posteriormente, se adicionó una mezcla de etanol-agua (80-20) y se colocó en placa calefactora con agitación constante a una temperatura de 55°C durante 60 minutos. El extracto etanólico-acuoso se mezcló con un volumen igual de cloroformo, con el fin de eliminar lípidos; esta mezcla se reposó durante 48 horas, y luego se recolectó la fase acuosa. El extracto etanólico-acuoso conteniendo los fructanos se filtró para eliminar los residuos fibrosos restantes. Posteriormente, se adicionó un volumen igual de alcohol absoluto para favorecer la precipitación de los polisacáridos, para finalmente secarlos.

2.3. Método 2

Este método está basado en la supuesta alta solubilidad de los fructanos y en que el extracto obtenido será totalmente natural (AOAC, 1994).

Al jugo obtenido de la muestra correspondiente se le adicionó un volumen igual de agua a 55°C; luego se colocó en una placa calefactora con agitación continua durante 60 min. Posteriormente, el líquido se filtró y se sometió a secado.

2.4. Método 3

A los jugos obtenidos se les adicionó un volumen igual de agua calentada a 55°C, y luego se colocaron en una placa con agitación constante durante 60 minutos; enseguida se filtraron y centrifugaron (Centra CL3R Thernopiec Modelo 120) a 3200 RPM durante 30 minutos, para separar la fracción soluble con los fructanos. Dicho sobrenadante se pasó a través de una columna de resina de intercambio iónica, consistente en proporciones iguales de Amberlite Cg 120 (Na⁺ forma) y Cg 400 (Cl⁻ forma) (Pollock y Jones, 1979), para luego desecarlo. El precipitado obtenido de la centrifugación fue pasado directamente al proceso de secado. La diferencia de este método con respecto al Método 2 es la centrifugación y la depuración con resina, lo cual podría mejorar la pureza del extracto.

2.5. Método 4

Para este método la muestra de tallo fue seccionada finamente y se le adicionó etanol al 80% hasta cubrirla (Pollock y Jones, 1979); posteriormente se redujo más el tamaño de sus fracciones con en una licuadora (Osterizer Pulse Matic Modelo L-88). Luego, la muestra se colocó en una congelador horizontal (Torrey Modelo CHTC25) a -18°C durante 48 horas.

Para la extracción, las muestras fueron descongeladas, homogenizadas, filtradas y centrifugadas a 5200 rpm por 30 minutos a 20°C en una centrífuga (Centra CL3R Thernopiec Modelo 120). El sobrenadante se decantó y el precipitado fue sometido a una segunda extracción con etanol al 80% a partes iguales; para ello esta mezcla se colocó en baño María a 55°C durante 15 minutos (Pollock y Jones, 1979).

Finalmente el sobrenadante y el precipitado fueron desecados por separado. Con este método se buscó maximizar el contacto del disolvente con los fructanos presentes en los tejidos del tallo mediante la etapa de congelación, así como agotar los remanentes en los tejidos residuales.

La eficiencia de los métodos probados se evaluó a través del peso del extracto pulverizado expresado como porcentaje del peso fresco de la muestra de tallo; esto es, en la forma como la materia prima se adquiere y procesa, y como el producto se comercializa y utiliza.

2.6. Pureza

Para comprobar el grado de pureza de los fructanos obtenidos por los diferentes métodos, se cuantificaron sus azúcares reductores con el método de Fehling-Soxhlet; esta prueba permitió verificar si los fructanos se hidrolizaron durante el proceso de desecación.

Además, se realizó un análisis cromatográfico con la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), el sistema de disolventes usado para ello fue una mezcla de n-butanol–metanol–agua–ácido acético en proporciones de 50:25:20:1 respectivamente. Este sistema permitió que los carbohidratos solubles pudieran emigrar sobre la placa (TLC Silicagel 60 F₂₅₄ folios de aluminio 10 x 20 cm, Merck), y por consiguiente lograr su identificación a través de la comparación de los R_f de los estándares con el de la muestra. El agente revelador empleado fue una mezcla de etanol–ácido sulfúrico–anizaldehído en proporciones de 18:1:1, respectivamente.

Los estándares utilizados fueron: fructosa (Sigma-Aldrich), glucosa (Sigma-Aldrich), isomaltotriosa DP3 (Sigma-Aldrich), maltoheptosa DP7 (Sigma-Aldrich), maltopenstosa DP5 (Sigma-Aldrich), cestosa (Sigma-Aldrich), nistosa (Sigma-Aldrich), inulina de achicoria (Sigma-Aldrich) y fructanos de *Agave angustifolia* ssp. *tequilana* (Delicias Mexicanas). Todas las muestras fueron disueltas en agua destilada y depositadas en las placas cromatográficas.

La comparación directa de los Rf (relación de frentes) de los estándares y los de las muestras permitió verificar si los fructanos y los fructooligosacáridos estaban presentes en las muestras obtenidas.

Los datos de rendimiento (porcentajes) fueron convertidos con la transformación seno inverso para cumplir el supuesto de normalidad. Los datos transformados se analizaron con la técnica de análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey con alfa = 0.05.

3. Resultados y Discusión

3.1 Rendimiento

Con base en el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas en el rendimiento medio obtenido con los diferentes métodos utilizados. En la Figura 1 se muestran estos resultados.

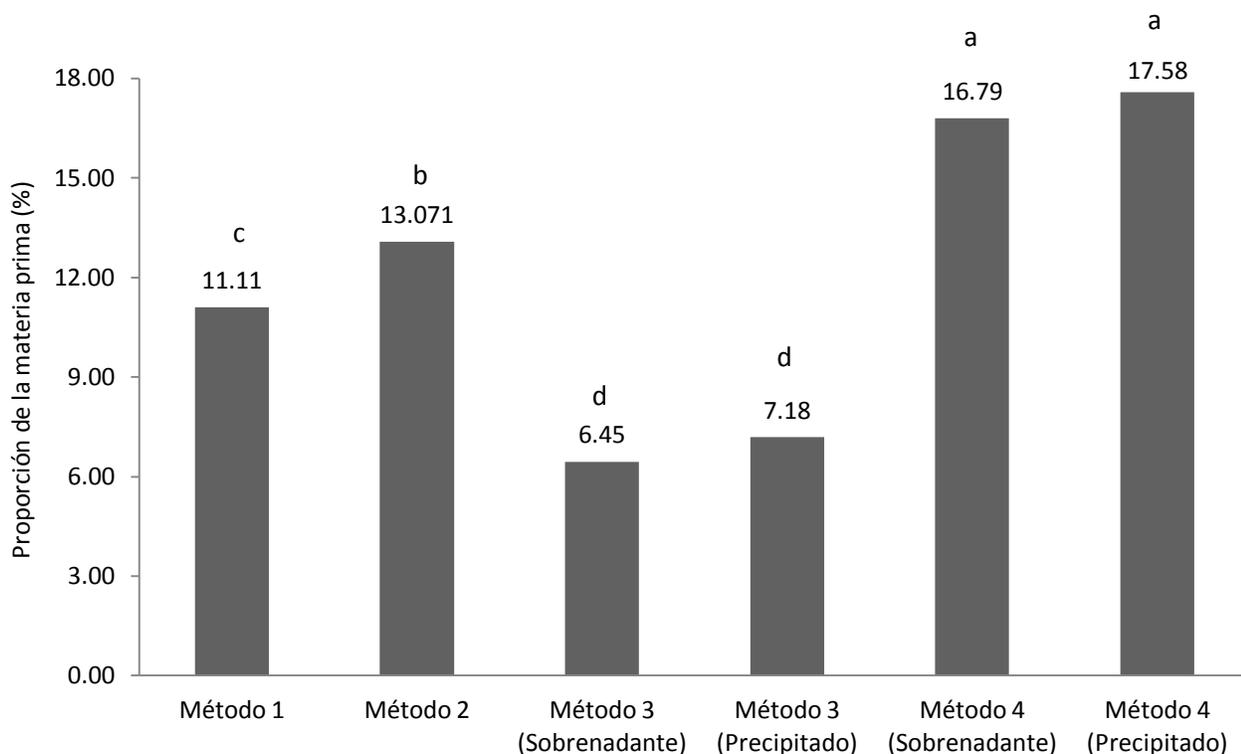


Fig. 1. Rendimiento medio de fructanos extraídos con los diferentes métodos. (Medias con distinta literal son estadísticamente diferentes; n=8-10).

El Método 1 (López *et al.*, 2003), desarrollado de origen para utilizar como materia prima la cabeza completa de maguey tequilero (tallo y pencas), extrae, además de los fructanos, diversos componentes indeseables como ceras, clorofila y taninos, entre otros. Luego, estos compuestos deben ser eliminados mediante el uso de sustancias químicas como cloroformo, por lo que el proceso se encarece y el producto pierde su carácter orgánico. Con este método se obtuvo un rendimiento intermedio bajo con respecto a los otros métodos (11.1%) ($\alpha=0.05$), pero el tiempo de secado promedio fue el mayor (27 días).

Como ya se mencionó, por las características de la materia prima para la cual se desarrolló este método, se involucran varios reactivos, por lo que es necesario también considerar su costo y la disposición correcta de los residuos al finalizar la extracción de los fructanos. En una evaluación general, se logró recuperar el 83.43% del cloroformo usado para la extracción, pero el alcohol absoluto utilizado no pudo ser recuperado, ya que en su mayor parte se pierde durante la etapa de secado. Además de las sustancias químicas mencionadas anteriormente, también se genera

materia orgánica (bagazo húmedo), misma que al secarse puede ser usada como combustible, abono, etc. Los principales inconvenientes de este método como proceso industrial son el incremento en el costo de la extracción por los reactivos que se utilizan, los residuos peligrosos que se generan y el prolongado tiempo de secado en horno convencional.

El Método 2 parte de la idea de extraer los fructanos sin recurrir a sustancias químicas y con equipo mínimo, con el propósito de simplificarlo, abaratarlo y obtener un producto orgánico, con posibilidades de comercialización a mayor precio en un mercado selectivo, menos competitivo y con cierto crecimiento potencial. Este método está basado en la técnica propuesta por la AOAC (Official Methods of Analysis) para la extracción de fibra alimentaria total, soluble e insoluble, en alimentos. Algunas modificaciones menores a la técnica original permitieron usar solamente agua destilada para la extracción. El rendimiento fue significativamente mayor con respecto al Método 1 ($\alpha=0.05$), y el tiempo de secado fue menos largo (22.5 días). Los residuos que se generan es únicamente el bagazo, ya que el agua que se usa como disolvente se evapora durante el proceso de secado.

En el Método 3 la extracción de los fructanos involucra un proceso de centrifugación, por lo que se obtuvieron dos productos, el principal o sobrenadante y el complementario o precipitado; ambos fueron secados en las mismas condiciones. Este método aun con la incorporación del precipitado (Método 3 bis) presentó el rendimiento de fructanos estadísticamente más bajo de todos. La incorporación de los fructanos del precipitado tampoco mejoró significativamente el rendimiento. El uso de resinas iónicas además de disminuir significativamente el rendimiento es necesario darle un tratamiento especial para poder disponer los residuos de forma correcta, sin olvidar el incremento en los costos de producción.

El Método 4 también genera dos productos, está basado en la solubilidad de los fructanos en soluciones etanólicas que al disminuir su temperatura provocan que los polisacáridos precipiten. El rendimiento con este método, con o sin la incorporación de los fructanos del precipitado, fue significativamente mayor que el registrado en los otros métodos de extracción

(17.58%), pero el incremento debido a la incorporación de los fructanos del precipitado tampoco fue estadísticamente significativo, por lo que esta adición parece inconveniente. Debido al uso de alcohol como disolvente, el tiempo de secado fuera significativamente menor comparado con los anteriores y no se generan residuos químicos, solamente la materia orgánica proveniente de la materia prima, la cual como se mencionó anteriormente puede ser aprovechada.

En general, el rendimiento obtenido con el Métodos 2 y el Método 4 son similares a los encontrados por Sánchez Marroquín y Hope (1953) en ocho especies de maguey, cuyo el contenido de fructanos vario de 14.3 a 24.1%. Mancilla y López (2006) mencionan rendimientos de 36% a 64% pero referidos a peso seco, en especies de *Agave* y *Dasyllirion*; estos valores son superiores a los registrados en la materia prima seca de dalia (35%) o achicoria (24%) (Van Loo *et al.*, 1995).

Otro factor a considerar dentro del rendimiento de fructanos es el uso de sustancias químicas para su extracción. El Método 1 requirió mayor cantidad de ellas, y en el otro extremo el Método 2 sólo requirió agua destilada. Estos requerimientos deben ser considerados para la factibilidad económica del proceso en nivel industrial, ya que además de los costos de extracción es necesario considerar la disposición correcta de los residuos después del proceso de extracción de los fructanos. Así, con el Método 1, los disolventes residuales se tuvieron que recuperar mediante un rotaevaporador para su aprovechamiento posterior en procesos alternos.

3.2 Pureza

3.2.1. Azúcares reductores por Fehling-Soxhlet. La presencia de azúcares reductores (glucosa y fructosa) en los compuestos extraídos es indeseable y puede resultar principalmente de la hidrólisis térmica de los fructanos durante el proceso de secado de las soluciones respectivas. Para detectar la presencia de estos azúcares en los concentrados obtenidos se les aplicó la prueba de Fehling-Soxhlet. Así, como se muestra en el Cuadro 2, algunas muestras resultaron positivas para la presencia de azúcares reductores. Estas muestras fueron descartadas y excluidas del análisis estadístico, ya que el producto carecía de la pureza requerida.

Cuadro 2. Presencia de azúcares reductores (g/100g) en los extractos obtenidos por cada método.

	Método 1	Método 2	Método 3 (s)	Método 4 (s)
R1	0	0	6.88	0
R2	0	0	0	0
R3	0	0	0	4.78
R4	0	0	0	0
R5	0	0	0	0
R6	0	0	0	0
R7	0	0	0	6.04
R8	0	26.19	0	0
R9	0	0	0	0
R10	0	0	0	0

3.2.2. Cromatografía en capa fina (CCF). Esta prueba también se realizó para verificar el grado de pureza del producto obtenido, así como para contar con su identificación preliminar. En el Cuadro No. 3 se presentan los Rf (relación de frentes o factor de retardo) de los estándares usados, así como los correspondientes a cada uno de los productos obtenidos con los diferentes métodos de extracción utilizados.

Cuadro 3. Valores de Rf X100 de los compuestos obtenidos con los diferentes métodos y procesados en CCF (distancia 10 cm).

Compuesto	St.	M1	M2	M3 (p)	M3 (s)	M4 (p)	M4 (s)
Fructosa	57						
Glucosa	51						
Maltoheptosa	13	11					
Maltopentosa	20						
Isomaltotriosa	22			25	23		24
Cestosa	34		29				
Nistosa	0.0						
Inulina de achicoria	0.0						
Fructanos de <i>A. angustifolia ssp tequilana</i>	52	53	55		53	54	
Compuestos desconocidos				73			66
Compuestos desconocidos				88			

St.: estándares (p): precipitado (s): sobrenadante

Con base en los valores de Rf de los extractos obtenidos con los diferentes métodos evaluados, se puede afirmar que con todos los métodos se obtuvieron fructanos con un grado de polimerización similar a los fructanos comerciales de *A. angustifolia ssp. tequilana*, además de otros fructooligosacáridos de menor peso molecular, cuya presencia es normal durante el proceso de síntesis de fructanos, como la presencia de cestosa que proviene de la unión del grupo fructosil con la sacarosa. Este hallazgo concuerda con lo publicado por Sánchez

Marroquín y Hope (1953), quienes refieren que Hope y Novoa (en datos no publicados), encontraron cestososa en tallos de plantas de 8 a 9 años de edad de ocho diferentes especies de maguey, que usualmente se usaban para producir tequila. Posteriormente, Sánchez Marroquín (1979) consiguió confirmar por cromatografía en capa fina la presencia de maltoheptosa, isomaltotriosa, cestososa y fructanos en *A. angustifolia* ssp. *tequilana*.

Por otra parte, en las muestras donde la reacción de Fehling-Soxhlet fue positiva, con la cromatografía se pudo reconocer la presencia de glucosa y fructosa.

Con base en lo antes expuesto, el contar con un método de extracción de fructanos sin requerimiento de sustancias químicas y con la generación de residuos mínima, aumenta las posibilidades de uso del maguey. Narváez y Sánchez (2009) resumen las patentes para algunos productos del maguey, entre las que destacan: uso de fructanos como materia prima para la elaboración de un jarabe prebiótico concentrado con concentración de fructanos mayor que 30% en peso, obtención de un edulcorante bajo en calorías, producción de fructanos de cadena larga para su uso en productos alimentarios y cosméticos, y fracciones de fructanos que sean más solubles en agua y miscibles a temperatura ambiente. Pero también los fructanos hidrolizados pueden ser el punto de partida para elaborar bebidas alcohólicas y biocombustible.

4. Conclusiones

- El Método 4 presentó el mayor rendimiento relativo de fructanos.
- De los seis procedimientos de extracción probados, el Método 2 es el más simple y barato, y su rendimiento superó significativamente al del Método 1 y del Método 3.
- El Método 3 presentó el rendimiento de fructanos estadísticamente más bajo.
- La adición de los fructanos del precipitado en el Método 3 y en el Método 4 no mejoró significativamente el rendimiento total.

5. Bibliografía

- AACC. 2000. Measurement of Total Fructan in Foods by an Enzymatic/Spectrophotometric Method 32 – 32. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. American Association of Cereal Chemists Press, St. Paul, MN.
- AOAC. 1994. Métodos oficiales de análisis de los alimentos. 985.29 Total Dietary Fiber in Foods. A. Madrid Vicente.
- Abebe, W.; W. F. Maddux; G. S. Schuster; J. B. Lewis 2003. Vascular responsiveness to dimethylaminoethyl methacrylate and its degradation products. *Journal of Biomedical Science. Mater. Res.*, 66A: 155–161.
- Aguirre R., J. R.; H. Charcas S.; J. L. Flores F. 2001. El maguey mezcalero potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. San Luis Potosí, S. L. P. México. 78 p.
- Aguirre R., J. R. 2009. Mezcal potosino un tesoro escondido. *Nuestro mezcal. Por Amor al Arte.* 50: 8-9.
- Anónimo. 1994. Inulin and oligofructoses: natural fructans of vegetable origin with unique nutritional and technical characteristics. *Nordisk Mejer information.* 21(11-12): 282-283
- ANZFA. 1995. Full assessment report and regulatory impact assessment A277 - Inulin and fructooligosaccharides as dietary fibre. Australia New Zealand Food Authority.
- ANZFA. 2001. Inulin and fructooligosaccharides as dietary fibre. Australian New Zealand Food Authority.
- Aswell, M. 2004. *Conceptos sobre Alimentos Funcionales.* International Life Science Institute Press 48.
- Biedrzycka, E.; M. Bielecka. 2004. Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends in Food Science & Technology* 15: 170-175.
- Carrillo, T. L. A. 2007. Los destilados de agave en México y su denominación de origen. *Ciencias* 87: 40-49.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2006. Red Mundial de Información sobre Biodiversidad. <<http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remibnodosdb.html>>. Fecha de consulta: 14 de Septiembre de 2011. Fecha última modificación: 28/02/2002.

- Coussement, P. A. 1999. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *Journal of nutrition* 129: 1412S-1417S.
- Crittenden, R.; M. Playne. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology* 7: 353-361.
- Cushman, J. 2001. Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant Physiology* 127: 1439-1448.
- Dávila C., A. 2012. Efecto quimiopreventivo de los fructanos de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick sobre el cáncer de colon. S.L.P. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P. Mexico. 60 p.
- De Gennaro, S.; Birch G. G.; Parke S. A.; Stancher B. 2000. Studies on the physicochemical properties of inulin and inulin oligomers. *Food-Chemistry* 68(2): 179-183.
- Deis, R. 2001. Dietary Fiber: a new beginning? (en línea). Consultado 24 jun. 2011. Disponible en: <http://www.foodproductdesing.com/archive/2001/1201ap.html>
- Delaquis, P.; G. Mazza. 1998. Functional Vegetable Products. In: Mazza, G. ed. *Functional Foods: biochemical and processing aspects*. Technomic Publishing Co. Pennsylvania, EE.UU. 460 p.
- Eguiarte, L. E.; V. Souza. 2007. Historia natural del *Agave* y sus parientes: evolución y ecología. In: *En lo Ancestral hay Futuro: del Tequila, los Mezcales y otros Agaves*. Colunga-García Marín, P., A. Larqué S., L. E. Eguiarte, y D. Zizumbo-Villareal. (Eds.). CICY, CONACYT, CONABIO, SEMARNAT, INE. Mérida, Yucatán. 402 p.
- Englyst, H.; G. Hudson. 1996. The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chemistry* 57: 15-21.
- Fletcher, R. 1999. Yacon. *The Australian new crops newsletter* 12: sp
- Flickinger, E. A.; G. C. Fahey. 2002. Pet food applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *British Journal of Nutrition* 87(2): 297-300.
- Franck, A.; L. De Leenheer. 2005. Inulin. *Biopolymers Online*.
- Franck A., 2006. Oligofructose-enriched inulin stimulates calcium absorption and bone mineralization. *Nutrition Bulletin* 31: 341-345.

- García-Mendoza, A. 1998. Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico. Instituto de Biología, Jardín Botánico, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- García-Mendoza, A. 2002. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico. *Cactus and Succulent Journal US* 74: 177-187.
- García-Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.
- García, Y.; M. López; R. Bocourt. 2010. Identificación de fructanos en *Agave fourcroydes* (henequén) como fuente de aditivo en la producción animal en Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 44: 55-57.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. University of Arizona, Tucson Arizona. 670 p.
- Gibson, A. C.; P. S Nobel. 1986. *The Cactus Primer*. Harvard University Press. England
- Gibson, G. R. 1999. Dietary Modulation of the Human Gut Microflora Using the Prebiotics Oligofructose and Inulin. *Journal of Nutrition* 129: 1438S–1441S.
- Hellwege, E.; S. Czapia; A. Jahnke; L. Willmitzer; A. Heyer. 2000. Transgenic potato tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke. *Plant Biology* 97(15): 8699-8704.
- Hendry, G. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans a climatological biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123: 3–14.
- Herppich, W.; K. Peckmann. 2000. Influence of Drought on Mitochondrial Activity, Photosynthesis, Nocturnal Acid Accumulation and Water Relations in the CAM Plants *Prekia sladeniana* (me-type) and *Crassula lycopodioides* (pepck-type). *Ann Bot.* 86: 611-620.
- Hogarth, A. J.; D. E. Hunter; W. A. Jacobs; K. A. Garleb; B. W. Wolf. 2000. Ion chromatographic determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(11): 5326-5330.
- Jiménez, O. 2011. Una nueva concepción en alimentos: Los fructanos del maguey cenizo. *Hypatia - Revista de Divulgación Científico - Tecnológica del Estado de Morelos*.

- Kolida, S.; G. R. Gibson. 2007. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. *The Journal of Nutrition* 137(11): 2503S-2506S.
- López, V. S.; G. M. González; A. Marcos. 2002. Functional foods and the immune system: a review. *European Journal of Clinical Nutrition* 56.3: S29-S33.
- López, M., N. Mancilla; G. Mendoza. 2003. Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 7835–7840.
- López, D.; M. D. Navarro; F. Rojas Melgarejo; A. N. P. Hiner; S. Chazarra; J. N. Rodríguez. 2005. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry* 66(12): 1476-1484.
- Losso, J. W.; S. Hakai. 1997. Molecular size of garlic FOS by matrix assisted desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(11): 4342-4346.
- Mancilla, M. N.; M. López. 2006. Water soluble carbohydrates and fructan structure patterns from agave and dasyliirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 7832-7840.
- Maness, N. 2010. Extraction and Analysis of Soluble Carbohydrates. *Methods in Molecular Biology* 1(639). *Plant Stress Tolerance* 4: 341-370 p.
- Marquina, D.; A. Santos. 2003. Probióticos, prebióticos y salud. *Revista Actualidad* 32: 24-27.
- Michel, C.; B. I. Juárez F.; J. R. Aguirre R.; J. M. Pinos R. 2008. Quantitative Characterization of Nonstructural Carbohydrates of Mezcal Agave (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(14): 5753–5757
- Narváez Z., J. A.; L. F. Sánchez T. 2009. Agaves as a Raw Material: Recent Technologies and Applications. *Recent Patents on Biotechnology* 3: 185-191
- Niness, K. 1999. Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose. *Cereal Foods World* 44(2): 79-81.
- Otero, R. 2003. Oligosacáridos como ingredientes funcionales (en línea). Consultado 24 jun. 2011. Disponible <http://www.icofina.es/vocalias/alimentacion/oligosacaridos1.htm>
- Perrin, S.; M. Warchol; J. P. Grill; F. Schneider. 2001. Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi synthetic medium. *Journal of Applied Microbiology* 90(6): 859-865.

- Pollock, C.; T. Jones. 1979. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytologist* 83: 9-15.
- Pujato, D. 2002. Los alimentos prebióticos (en línea). Consultado 24 jun. 2011. Disponible en <http://www.gineconet.com/articulos/1361.htm>
- Ramírez, R. 2007. La representación popular del maguey y el pulque en las artes. *Cuicuilco*, 14: 115-149.
- Rendón, J.; B. I. Juárez F.; J. M. Pinos R.; J. R. Aguirre R.; R. Delgado. 2011. Effects of different kind of fructans on in vitro growth of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*. *African Journal of Microbiology Research* 5(18): 2706-2710.
- Roberfroid, M. 2000. Non digestible oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40: 461-480.
- Roberfroid, M. 2004. *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. Boca Raton, USA: CRC Press; 1 edition.
- Roberfroid, M. 2007. *Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients*. American Society for Nutrition. *Journal of Nutrition* 137: 2493S-2502S.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr. Opin. Journal of Plant Biology* 2: 198–206.
- Sanchez M., A.; P. H. Hope. 1953. Agave juice: Fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1: 246-249.
- Sánchez M., A. 1979. *Los agaves de México en la industria alimentaria*. México. CEESTEM, Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. 526 p.
- Sharkey, T. 1993. *Fotosíntesis*. Azcon-Bieto J, Talon YM. *Fisiología y bioquímica vegetal*. España: Editorial Mcgraw-Hill. p. 81-85.
- Silveira, M.; S. Monereo; B. Molina. 2003. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? *Revista Española de Salud Pública* 77: 317-331.
- Suzuki, M.; N. J. Chatterton. 1993. *Science and technology of fructanos*. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.
- Suzuki, M.; N. J. Chatterton. 1996. *Science and technology of fructans*. CRC Press. Boca Raton. Florida. USA.

- Tello-Balderas, J. J.; M. García E. 1985. The Mezcal Industry in the Altiplano Potosino-Zacatecano of North-Central Mexico. Centro Regional para Estudios de Zonas Áridas y Semiáridas del Colegio de Postgraduados, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México. 81-87 p.
- Utha State University. 2003. Talks USA (en línea). Consultado 24 jun. 2011. Disponible en: <http://www.usu.edu/~forage/frucabs.htm>
- Van Laere, A.; W. Van Den Ende. 2002. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell & Environment* (25): 803–813.
- Van Loo, J.; P. Coussement; L. De Leenheera; H. Hoebregsa; G. Smitsa. 1995. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35(6): 525-552
- Vázquez-García, J. A.; M. J. Cházaro; V. Hernández; B. Flores; Y. L. Vargas-Rodríguez. 2007. *Agaves del Occidente de México*. UDG, CRT, CIATEJ, LUS, CONAFOR. México. 221 p.
- Vijn, I.; S. Smeekens. 1999. Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology* 120: 351–359.
- Wang, N.; S. Park. 1997. Phloem transport of fructans in the crassulace acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology*. 116(2): 709-714.
- Yun, J. W. 2003. Fructooligosaccharides: occurrence, preparation and applications (en línea). Consultado 24 jun. 2011. Disponible en: <http://biho.tae.ac.kr/~jwyun/yun15.htm>

6. Anexos

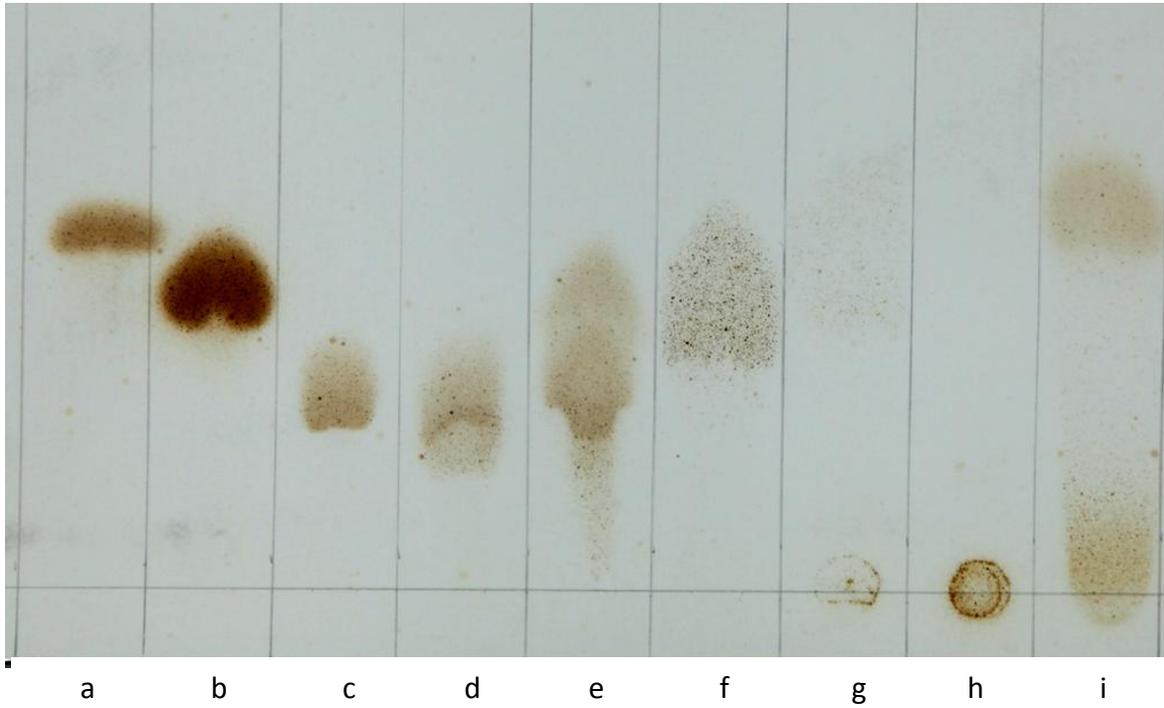


Fig. 2. Perfil por cromatografía en capa fina de los estándares (Sigma-Aldrich): a) fructosa, b) glucosa, c) isomaltotriosa, d) maltoheptosa, e) maltopentosa, f) cestosa, g) nistosa, h) inulina de achicoria y i) fructanos de *A. angustifolia* ssp. *tequilana* (Delicias Mexicanas).

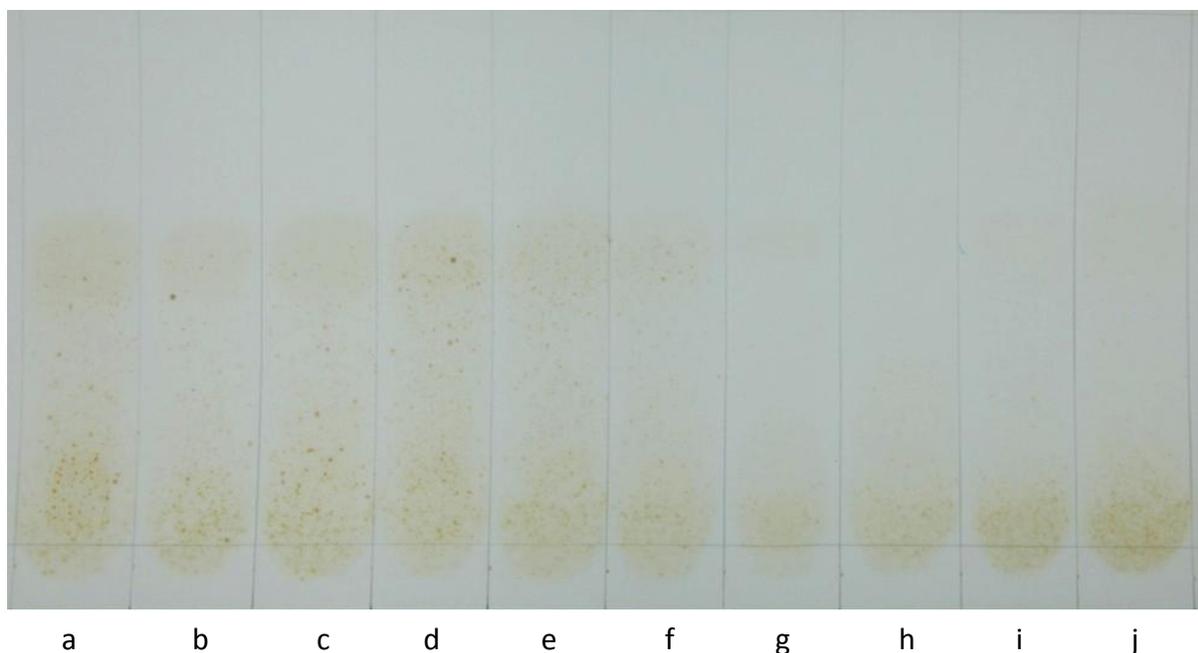


Fig. 3. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 1: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.

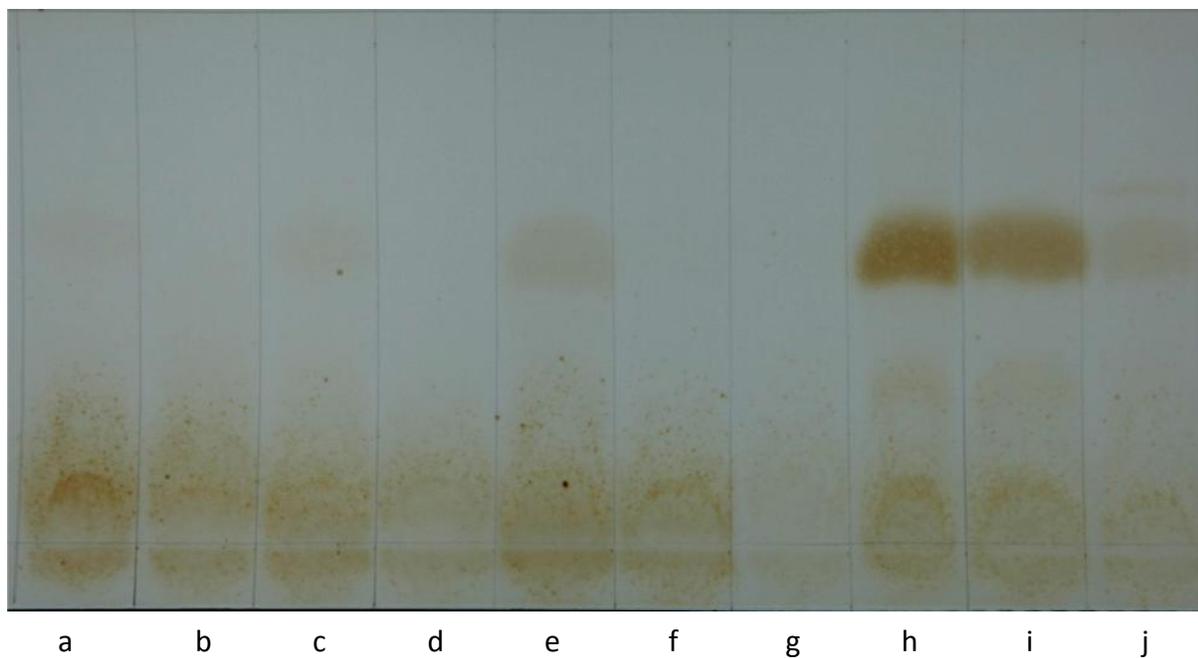


Fig. 4. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 2: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.

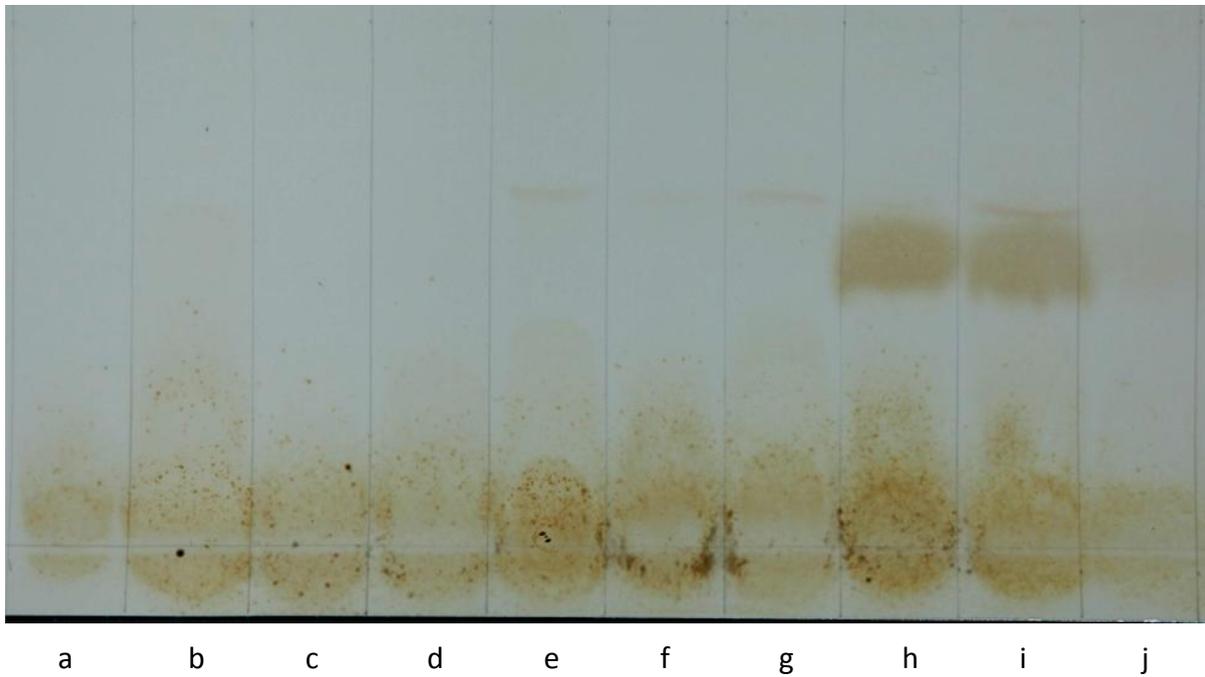


Fig. 5. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 3 Precipitado: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.

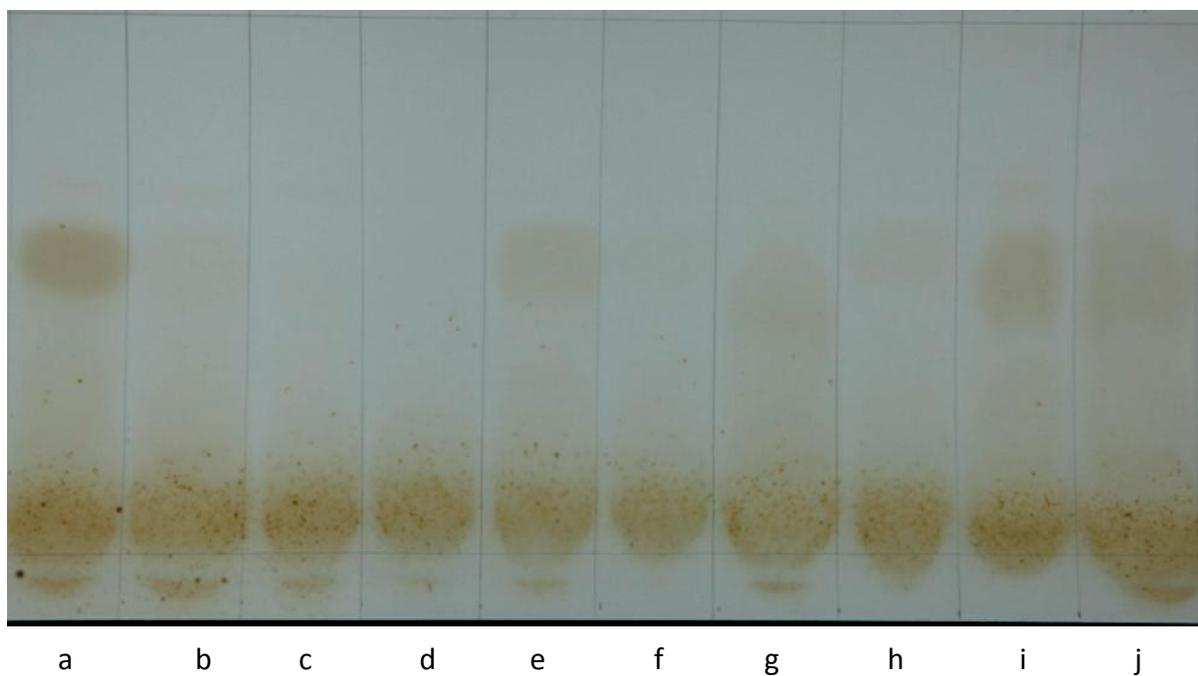


Fig. 6. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 3 Sobrenadante: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.

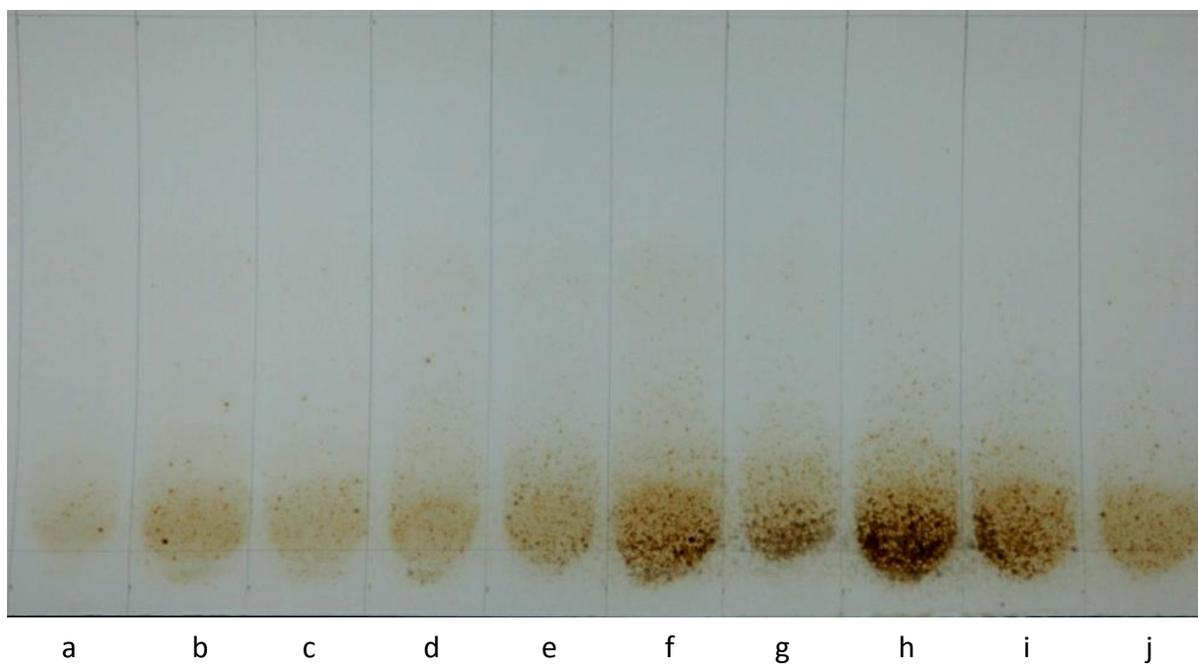


Fig. 7. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 4 Precipitado: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.

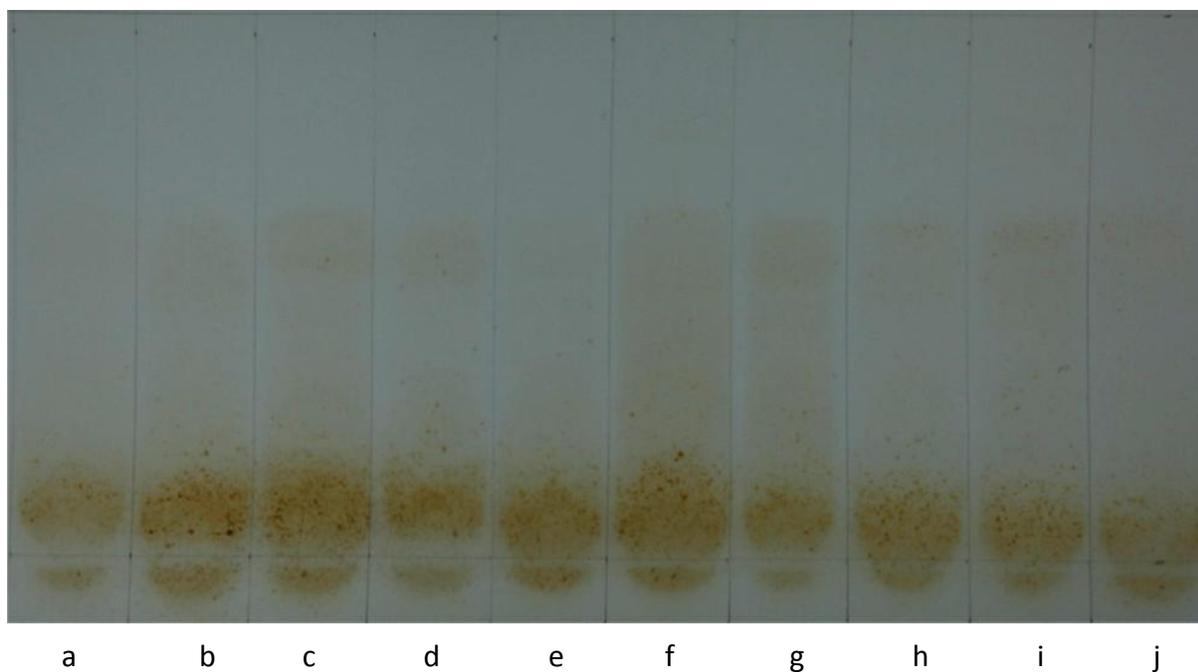


Fig. 8. Perfil por cromatografía en capa fina del Método 4 Sobrenadante: a) repetición 1, b) repetición 2, c) repetición 3, d) repetición 4, e) repetición 5, f) repetición 6, g) repetición 7, h) repetición 8, i) repetición 9 y j) repetición 10.