

Thermal and microstructural properties of cuticle hydrophobic compounds from four species of *Opuntia*

Propiedades térmicas y microestructurales de compuestos hidrofóbicos presentes en la cutícula de cuatro especies de *Opuntia*

Karla P. López-Avila¹; Juan A. Rendón-Huerta¹;
Jaime D. Pérez-Martínez²; Juan A. Morales-Rueda^{1*}

¹Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación Académica Región Altiplano Oeste. Carretera Salinas-Santo Domingo 200. C. P. 78600. Salinas, S.L.P. México.

²Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Ciencias Químicas.

Dr. Manuel Nava núm. 6, Zona Universitaria. C. P. 78210. S.L.P. México.

*Corresponding author: angel.morales@uaslp.mx

Abstract

The vegetable waxes are widely used in the agri-food, cosmetic and pharmaceutical industries. Epicuticular wax of *Opuntia* spp could be a new alternative able to satisfy industrial needs. The objective of this research is to characterize the thermal and structural properties of cuticle hydrophobic compounds from four species of *Opuntia* [*O. robusta* Wendl, *O. leucotricha* DC., *O. streptacantha* Lem. and *O. ficus-indica* (L.) Mill]. The content of hydrophobic compounds was determined by Soxhlet. The melting and crystallization profiles of the extracts were obtained by differential scanning calorimetry (DSC). The microstructure of the cuticle surface was observed by Scanning Electron Microscopy and the crystalline characteristics of the extracts were observed using Polarized Light Microscopy. Results showed that *O. streptacantha* contains both the highest concentration of hydrophobic compounds (3.97 %) and the melting temperature (78.25 °C). In addition, *O. Streptacantha* showed the highest quantity of hydrophobic compounds on the surface of the cladode with small crystals of colloidal dimensions and irregular plate-like form. Therefore, the four involved *Opuntia* species, especially *O. streptacantha*, contain hydrophobic compounds with thermal characteristics like high value-added vegetable waxes.

Keywords: Epicuticular waxes, Scanning Electron Microscopy, Differential Scanning Calorimetry, melting temperature.

Resumen

Las ceras vegetales son ampliamente usadas en las industrias agroalimentaria, cosmética y farmacéutica. La cera de la cutícula de nopal podría representar una alternativa nueva capaz de satisfacer sus necesidades. El objetivo de la investigación es caracterizar las propiedades térmicas y estructurales de compuestos hidrofóbicos de la cutícula de cuatro especies del género *Opuntia* [*O. robusta* Wendl, *O. leucotricha* DC., *O. streptacantha* Lem. y *O. ficus-indica* (L.) Mill.]. Las variables determinadas fueron, contenido de compuestos hidrofóbicos por Soxhlet y perfiles de fusión y cristalización de los extractos mediante calorimetría diferencial de barrido. Se observaron microestructuras en la superficie cuticular por medio de microscopía electrónica de barrido, mientras que las características cristalinas de los extractos se observaron a través de microscopía de luz polarizada. Los resultados mostraron que a *O. streptacantha* se asocian la mayor concentración de compuestos hidrofóbicos (3.97 %) y la temperatura de fusión mayor (78.25 °C). Además, esta especie tiene la mayor cantidad de depósitos de compuestos hidrofóbicos en la superficie del cladodio; los cristales son pequeños de dimensiones coloidales en forma de placas irregulares. Las especies de *Opuntia* estudiadas, en especial *O. streptacantha*, contienen compuestos hidrofóbicos con características térmicas similares a las ceras vegetales con valor agregado grande.

Palabras clave: Cera epicuticular, Microscopía Electrónica de Barrido, Calorimetría de Barrido Diferencial, temperatura de fusión



Introduction

Currently, vegetable waxes are widely used in products in the agri-food, cosmetic and pharmaceutical industries (Co & Marangoni, 2012, Rojas, Saucedo, De León, Jasso & Aguilar, 2011, Rojas-Molina, De León-Zapata, Saucedo-Pompa, Aguilar-González & Aguilar, 2013). These waxes are used in the manufacture of candies, lipsticks, make-up, creams and coating of fruits and vegetables, among other uses (Cabello, Sáenz, Barajas, Pérez, Ávila, & Valdés, 2013). According to Blake, Co, and Marangoni (2012), vegetable waxes are agriculture by-products that are converted into commercially available and economically profitable materials.

Wax functionality depends on hydrophobic characteristics, solidity at room temperature, high melting temperatures (50-80 °C) and chemical composition (Jana & Martini, 2016). Moreover, Blake, Toro-Vazquez, and Hwang (2018) indicated that crystallization (T_{Cr}) and melting temperatures (T_M) of vegetable waxes depend on the variation of the chemical composition. The most studied vegetable waxes are rice bran wax ($T_M = 78-82$ °C), carnauba wax ($T_M = 80-85$ °C), sunflower wax ($T_M = 74-77$ °C), and candelilla wax ($T_M = 60-73$ °C) (Co & Marangoni, 2012, Blake, A. I., Co, E., & Marangoni, A. G. 2014).

On the other hand, *Opuntia* plants (commonly known in Mexico as *nopales*) are adapted to arid and semi-arid desert climates (Rzedowski, 2006, Arreola-Nava, Cuevas-Guzmán, Guzmán-Hernández, & González-Durán, 2017). Cervantes (2002) and Rykaczewski et al. (2016) mention that *Opuntia* spp have particular physiological characteristics (polymeric structures) that allow them to store and conserve water in their tissues, in order to survive water shortages and temperature variations. Ben Salem-Fnayou, Zemni, Nefzaoui, & Ghorbel (2013) conducted studies of the ultrastructural characteristics of the cladodial surface of spiny and unarmed cultivars of *O. ficus-indica*; seeing that spiny cultivars have epicuticular wax deposits covering the cladodial surface; while less abundant waxy plates were observed in cultivars without spines. Specimens of *O. engelmannii* var. *Lindheimeri* and *O. basilaris* have polymeric structures with hydrophobic characteristics capable of interact with water depending on the maturity stage of the cladodes (Rykaczewski et al., 2016). Wilkinson and Mayeux (1990) also determined the chemical composition and amount of wax per surface area ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$) of cladodes of *O. engelmannii*. However, the melting temperatures of the waxes of the cladodes of these *Opuntia* species have not been determined. Regarding the above, this research aimed to evaluate yield (%) and melting temperatures of hydrophobic compounds of the cladodes of four *Opuntia* species.

Introducción

Actualmente, las ceras vegetales son muy utilizadas en productos de las industrias de alimentos, cosméticos y farmacéuticos (Co & Marangoni, 2012, Rojas, Saucedo, De León, Jasso & Aguilar, 2011, Rojas-Molina, De León-Zapata, Saucedo-Pompa, Aguilar-González & Aguilar, 2013). Estas ceras se emplean en la elaboración de dulces, labiales, maquillajes, cremas y recubrimiento de frutas y vegetales, entre otros usos (Cabello, Sáenz, Barajas, Pérez, Ávila, & Valdés, 2013). De acuerdo con Blake, Co, y Marangoni (2012), las ceras vegetales son subproductos agrícolas que se convierten en materiales comercialmente disponibles y económicamente rentables.

La funcionalidad de las ceras depende de sus características hidrófobas, solidez a temperatura ambiente, temperaturas altas de fusión (50-80 °C) y a su composición química (Jana & Martini, 2016). Además, Blake, Toro-Vazquez, y Hwang (2018), indicaron que las temperaturas de cristalización (T_{Cr}) y de fusión (T_F) de las ceras vegetales dependen de la variación de su composición química. Las ceras vegetales más estudiadas son la cera de salvado de arroz ($T_F = 78-82$ °C), la cera de carnauba ($T_F = 80-85$ °C), la cera de girasol ($T_F = 74-77$ °C) y la cera de candelilla ($T_F = 60-73$ °C) (Co & Marangoni, 2012, Blake, A. I., Co, E., & Marangoni, A. G. 2014).

Por otro lado, las plantas del género *Opuntia* (comúnmente llamadas *nopales*) están adaptadas a climas áridos y semiáridos del desierto (Rzedowski, 2006, Arreola-Nava, Cuevas-Guzmán, Guzmán-Hernández, & González-Durán, 2017). Cervantes (2002) y Rykaczewski et al. (2016) mencionan que los *nopales* tienen características fisiológicas particulares (estructuras poliméricas) que les permiten almacenar y conservar agua en sus tejidos, para sobrevivir a la escasez de agua y a las variaciones de temperatura. Ben Salem-Fnayou, Zemni, Nefzaoui, & Ghorbel (2013) realizaron estudios de las características ultraestructurales de la superficie de cladodios de cultivares espinosos e inermes de *O. ficus-indica*; observando que los cultivares espinosos cuentan con depósitos de cera epicuticular que cubre la superficie del cladodio; mientras que placas cerosas menos abundantes se observaron en cultivares sin espinas. Los especímenes de *O. engelmannii* var. *Lindheimeri* y *O. basilaris* poseen estructuras poliméricas con características hidrofóbicas capaces de interactuar con el agua dependiendo del estado de maduración de los cladodios (Rykaczewski et al., 2016). Asimismo, Wilkinson y Mayeux (1990) determinaron la composición química y la cantidad de cera por área superficial ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2$) de cladodios de *O. engelmannii*. Sin embargo, las temperaturas de fusión de las ceras de los cladodios de esas especies

Materials and methods

Samples of cladodes of four *Opuntia* species (*Opuntia robusta* Wendl, *O. leucotricha* DC., *O. streptacantha* Lem. and *O. ficus-indica* (L.) Mill) were collected from plots in the municipality of Salinas, San Luis Potosí, Mexico, during April and May 2017. At least three complete and mature cladodes of three individuals of each species were obtained; the selected cladodes were placed in airtight boxes and refrigerated at 5°C for conservation until the corresponding analyses were carried out.

Hydrophobic compound extraction

Hydrophobic compounds were extracted from the four species using the Soxhlet technique, according to the official method 963.15 of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). Subsequently, 15 g of dehydrated sample were refluxed using 140 mL of analytical grade hexane (Jalmek Científica SA de CV, NL, Mexico). Two independent determinations (n=2) were performed on each species.

Scanning Electron Microscopy

Dehydrated samples of the four *Opuntia* species were cut in 0.5 x 0.5 cm fractions. These samples were placed on circular copper slides of 3 cm in diameter. Then, the samples were introduced into a vacuum chamber (PLASMA CURRENT SPI Supplies SP1 Supplies Division of STRUCTURE PROBE, Inc. with two modules SPI-MODULE- Control and SPI-MODULE Sputter Coater) to generate a controlled negative atmosphere of 10^{-2} Torr using argon as an inert gas. The samples were coated with a conductive metal (gold) for 4 min. Then, the samples were placed in the scanning electron microscope (SEM; JEOL JSM-6390LV) and the images of the micromorphological diversity on the surface of *Opuntia* cladodes were obtained at different magnifications in different areas by means of the Control User Interface software (Version 8.25 Copyright 2005, 2007 JEOL TECHNICS LTD).

Thermal characterization by Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Samples of 4 mg of extract from each sample were placed in hermetic aluminum pans. These were then introduced into the differential scanning calorimetry equipment (DSC, Model 2920; TA Instruments, New Castle, DE, USA) and had their thermal memory erased from room temperature (25°C) to 130°C without increment control. To determine the crystallization and melting profile, the samples were cooled from 130°C to 0°C with decreases of 10°C per min, followed by a second heating from 0°C to 130°C with increments of 5°C per min. Two independent determinations (n = 2) were performed on each species.

de nopal no se han determinado. Considerando lo anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el rendimiento (%) y las temperaturas de fusión de los compuestos hidrofóbicos de los cladodios de cuatro especies de *Opuntia*.

Materiales y métodos

Muestras de cladodios de cuatro especies de nopal (*Opuntia robusta* Wendl, *O. leucotricha* DC., *O. streptacantha* Lem. y *O. ficus-indica* (L.) Mill) se recolectaron en solares del municipio de Salinas, San Luis Potosí, México, durante los meses de abril y mayo de 2017. Al menos tres cladodios completos y maduros de tres individuos de cada especie fueron obtenidos; los cladodios seleccionados se colocaron en cajas herméticas y se refrigeraron a 5 °C para su conservación hasta la realización de los análisis correspondientes.

Extracción de compuestos hidrofóbicos

La extracción de los compuestos hidrofóbicos de las cuatro especies se realizó por medio de la técnica Soxhlet, de acuerdo con el método oficial 963.15 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995). Posteriormente, se sometieron a reflujo 15 g de muestra deshidratada utilizando 140 mL de hexanos grado analítico (Jalmek Científica SA de CV, NL, México). Dos determinaciones independientes (n = 2) fueron realizadas en cada especie.

Microscopía Electrónica de Barrido

Muestras deshidratadas de las cuatro especies de nopal se cortaron en fracciones de 0.5 x 0.5 cm. Esas muestras se colocaron sobre portaobjetos circulares de cobre de 3 cm de diámetro. Después, las muestras se introdujeron en una cámara de vacío (PLASMA CURRENT SPI Supplies SP1 Supplies División of STRUCTURE PROBE, Inc. con dos módulos SPI-MODULE- Control y SPI-MODULE Sputter Coater) para generar una atmósfera negativa controlada de 10^{-2} torr utilizando argón como gas inerte. Las muestras se recubrieron con un metal conductor (oro) durante 4 min. Luego, las muestras se colocaron en el microscopio electrónico de barrido (SEM; JEOL JSM-6390LV) y se procedió a la obtención de las imágenes de la diversidad micromorfológica en la superficie de los cladodios de nopal a diferentes magnificaciones en diferentes áreas por medio del software Control User Interface (Versión 8.25 Copyright 2005, 2007 JEOL TECHNICS LTD).

Caracterización térmica por Calorimetría Diferencial De Barrido (DSC)

Cantidades de 4 mg de extracto de cada muestra se colocaron en charolas de aluminio hermético. Posteriormente, estas se introdujeron en el equipo

Microstructure by Polarized Light Microscopy

The identification of the microstructure of the extracts of the four *Opuntia* species was done with a polarized light microscope (Olympus BX51; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). A molten drop (approximately 4 mg) of the extracts was placed on a slide and immediately afterwards a smear was taken with a coverslip. The observation of the microstructure was performed with the software of the equipment (Linksys 32, Linkam Scientific Instruments LTD, UK) and the microphotographs were obtained at different magnitudes (e.g. 10X and 20X). Two independent determinations ($n = 2$) were performed on each species.

Experimental design

The results of the variables, hydrophobic compound content (%), crystallization temperature (T_{Cr}) and melting temperature (T_M) of the *Opuntia* species were subjected to an analysis of variance when considering a completely random experimental design. In addition, a Tukey mean test was performed considering a significance level $\alpha=0.05$ with R-Studio Desktop version 1.2.5033 (2017)

Results and discussion

Hydrophobic compound content

Data on hydrophobic compound content are shown in Table 1. *Opuntia streptacantha* had a statistically large hydrophobic compound content with 3.97%, while *O. ficus-indica*, *O. robusta* and *O. leucotricha* had values lower than 0.7%, although statistical differences among them were not significant.

The yield associated to *O. streptacantha* was similar to candelilla wax and carnauba wax yields, which can

de calorimetría diferencial de barrido (DSC, Modelo 2920; TA Instruments, New Castle, DE, USA) y se les realizó un borrado de memoria térmica, desde temperatura ambiente (25 °C) hasta 130 °C sin control del incremento. Para la determinación del perfil de cristalización y fusión, las muestras se enfriaron desde los 130 °C hasta 0 °C con decrementos de 10 °C por min, seguido por un segundo calentamiento desde los 0 °C hasta 130 °C con incrementos de 5 °C por min. Dos determinaciones independientes ($n = 2$) fueron realizadas a cada especie.

Microestructura por Microscopía de Luz Polarizada

La determinación de la microestructura de los extractos de las cuatro especies de nopal se hizo con un microscopio de luz polarizada (Olympus BX51; Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Una gota (aproximadamente 4 mg) fundida de los extractos se colocó en un portaobjetos e inmediatamente después un frotis se realizó con un cubreobjetos. La observación de la microestructura se realizó con el software del equipo (Linksys 32, Linkam Scientific Instruments LTD, UK) y se obtuvieron las microfotografías a diferentes magnitudes (e.g. 10X y 20X). Dos determinaciones independientes ($n = 2$) fueron realizadas a cada especie.

Diseño experimental

Los resultados de las variables, contenido de compuestos hidrofóbicos (%), temperatura de cristalización (T_{Cr}) y temperatura de fusión (T_f) de las especies de nopal, se sometieron a un análisis de varianza al considerar un diseño experimental completamente al azar. Además, una prueba de medias de Tukey se realizó considerando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ con el paquete estadístico R-Studio Desktop versión 1.2.5033 (2017)

Table 1. Hydrophobic compound content (%) in four *Opuntia* species.

Cuadro 1. Contenido de compuestos hidrofóbicos (%) en cuatro especies de *Opuntia*.

<i>Opuntia</i> species/ Especies de <i>Opuntia</i>	Hydrophobic compound (% p/p)/ Compuestos hidrofóbicos (% p/p)
<i>Opuntia robusta</i>	0.68 ^b (±0.06)
<i>Opuntia leucotricha</i>	0.39 ^b (±0.09)
<i>Opuntia streptacantha</i>	3.97 ^a (±0.35)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	0.47 ^b (±0.03)
P Value	***
SEM	0.66

Values with the same letter in each column are statistically not different, according to Tukey's test ($P \leq 0.005$).

*** Significance level ($P < 0.0001$).

SEM, Standard Error of the Mean.

Valores con la misma letra en cada columna son estadísticamente no diferentes, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.005$).

*** Nivel de significancia ($P < 0.0001$).

EEM, Error Estándar de la Media.

be up to 5% (Rojas-Molina, R., De León-Zapata, M. A., Saucedo-Pompa, S., Aguilar-González, M. A., & Aguilar, C. N. 2013, de Freitas, C. A. S, de Sousa, P. H. M., Soares, D. J., da Silva, J. Y. G., Benjamin, S. R. & Guedes, M. I. F. 2019). According to Shepherd and Griffiths (2006) these yields are associated to a higher exposure of the plant to the environment (radiation, dust and temperature), small water requirements, and the need to develop better defense mechanisms to survive in arid and semi-arid areas. In this regard, Rojas-Molina et al. (2013) point out that candelilla wax production increases as a protection mechanism in conditions of low humidity available to the plant and low temperature seasons.

Scanning Electron Microscopy

Microphotographs of the cuticle of the four *Opuntia* species were obtained (Figure 1). The surface cell structures of *O. robusta*, *O. streptacantha* and *O. ficus-indica* are flat (Figure 1 A, C and D), while the surface cell structures of *O. leucotricha* are long conical microcapillaries (Figure 1 B), similar to those appreciated by Rykaczewski et al. (2016) in *O. engelmannii* var. *Lindheimeri* and *O. basilaris*. *O. robusta*, *O. streptacantha*, and *O. ficus-indica* also shows fissures in the cuticle. According to Ben Salem-Fnayou, A., Zemni, H., Nefzaoui, A. & Ghorbel A. (2013), fissures correspond to a layer of epicuticular wax, covering the epidermal cells in varieties of *O. ficus-indica*. However,

Resultados y discusión

Contenido de compuestos hidrofóbicos

Los datos del contenido de compuestos hidrofóbicos se muestran en el Cuadro 1. *Opuntia streptacantha* presentó un contenido estadísticamente grande de compuestos hidrofóbicos con 3.97 %, mientras que *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. leucotricha* obtuvieron valores menores a 0.7 %, aunque las diferencias estadísticas entre ellas fueron no significativas.

El rendimiento asociado a *O. streptacantha* resultó similar a los rendimientos de cera de candelilla y cera de carnauba, los cuales pueden ser de hasta 5 % (Rojas-Molina, R., De León-Zapata, M. A., Saucedo-Pompa, S., Aguilar-González, M. A., & Aguilar, C. N. 2013, de Freitas, C. A. S, de Sousa, P. H. M., Soares, D. J., da Silva, J. Y. G., Benjamin, S. R. & Guedes, M. I. F. 2019). De acuerdo con Shepherd y Griffiths (2006), estos rendimientos se asocian a una exposición mayor de la planta al ambiente (radiación, polvo y temperatura), requerimientos hídricos pequeños, y a la necesidad de desarrollar mecanismos mejores de defensa para sobrevivir en las zonas áridas y semi áridas. Al respecto, Rojas-Molina et al. (2013) señalan que la producción de cera de candelilla aumenta como mecanismo de protección en condiciones de poca humedad disponible para la planta y épocas frías.

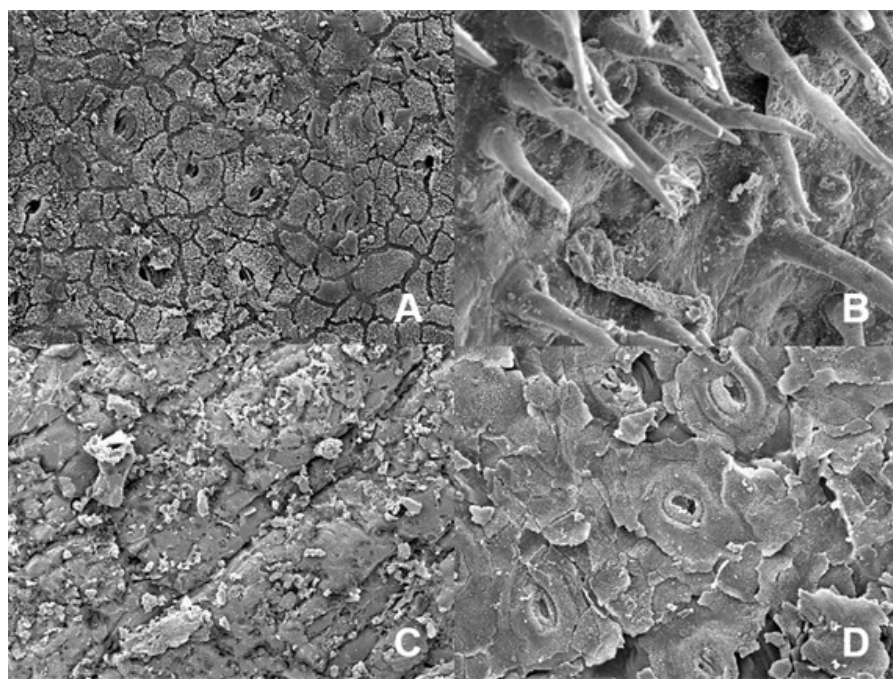


Figure 1. Sample microstructures: A) *Opuntia robusta*, B) *Opuntia leucotricha*, C) *Opuntia streptacantha* and D) *Opuntia ficus-indica*. 250x Magnification.

Figura 1. Microestructuras de las muestras: A) *Opuntia robusta*, B) *Opuntia leucotricha*, C) *Opuntia streptacantha* y D) *Opuntia ficus-indica*. Magnificación de 250x.

the fissures could be caused by the handling of the samples and the thermal treatments applied, which can break the superficial cellular structures (epidermis), together with the maturity of the cladodes and the species involved.

The surfaces of all the samples studied showed white and amorphous particles; *O. robusta*, *O. leucotricha* and *O. ficus-indica* had a small amount of such particles, but *O. streptacantha* had the highest particle content in the whole field observed. This coincides with the results for hydrophobic compounds (Table 1), since *O. streptacantha* corresponds to the highest values compared to the other three *Opuntia* species involved.

Figure 1 shows that in the samples of *O. robusta*, *O. leucotricha* and *O. ficus-indica* (Figure 1 A, B and D; respectively) there is a higher content of particles on the sides of the stomata and in the fissures; this may be associated with the plant protecting these spaces by covering them with waxy compounds, as mentioned by Cervantes (2002), to avoid excessive transpiration.

To support the presence of hydrophobic compounds on the surface of cladodes, a microphotograph of *O. streptacantha* was obtained after the extraction process by the Soxhlet technique. The results were compared with the cuticular surface of the same species without extraction. The dehydrated sample with the presence of hydrophobic compounds (Figure 2A) shows a large content of particles dispersed over its entire surface, while Figure 2B shows a surface with an absence of particles. These results confirm that the hydrophobic compounds observed (Table 1) correspond to the particles observed in the microscopic images (Figures 1 and 2) and agree with the waxy particles reported by Ben Salem-Fnayou et al. (2013) and Rykaczewski et al. (2016) in the *Opuntia* species mentioned.

Microscopía Electrónica de Barrido

Microfotografías de la cutícula de las cuatro especies de *Opuntia* fueron obtenidas (Figura 1). Las estructuras celulares superficiales de *O. robusta*, *O. streptacantha* y *O. ficus-indica* son planas (Figura 1 A, C y D), mientras las estructuras celulares superficiales de *O. leucotricha* son micro capilares cónicos largos (Figura 1 B), similares a los apreciados por Rykaczewski et al. (2016) en *O. engelmannii* var. *Lindheimeri* y *O. basilaris*. También, *O. robusta*, *O. streptacantha* y *O. ficus-indica* presentan grietas en la cutícula. De acuerdo con Ben Salem-Fnayou, A., Zemni, H., Nefzaoui, A. & Ghorbel A. (2013), las grietas corresponden a una capa de cera epicuticular que cubre las células epidérmicas en variedades de *O. ficus-indica*. Sin embargo, las grietas podrían ser causadas por el manejo de las muestras y los tratamientos térmicos aplicados, los cuales pueden romper las estructuras superficiales celulares (epidermis), aunado a la madurez de los cladodios y la especie involucrada.

Las superficies de todas las muestras estudiadas mostraron partículas amorfas y de color blanco; *O. robusta*, *O. leucotricha* y *O. ficus-indica* tuvieron una cantidad pequeña de dichas partículas. Sin embargo, *O. streptacantha* tiene el contenido mayor de partículas en todo el campo de observación. Esta tendencia coincide con los resultados del contenido de compuestos hidrofóbicos (Cuadro 1), ya que a *O. streptacantha* corresponden los valores mayores en comparación con los de las otras tres especies de nopal involucradas.

En la Figura 1 se aprecia que en las muestras de *O. robusta*, *O. leucotricha* y *O. ficus-indica* (Figura 1 A, B y D; respectivamente) hay un contenido mayor de partículas en los costados de los estomas y en las grietas; esto puede estar asociado a que la planta protege dichos espacios cubriéndolos con compuestos cerosos, como lo menciona Cervantes (2002), para evitar transpiración excesiva.

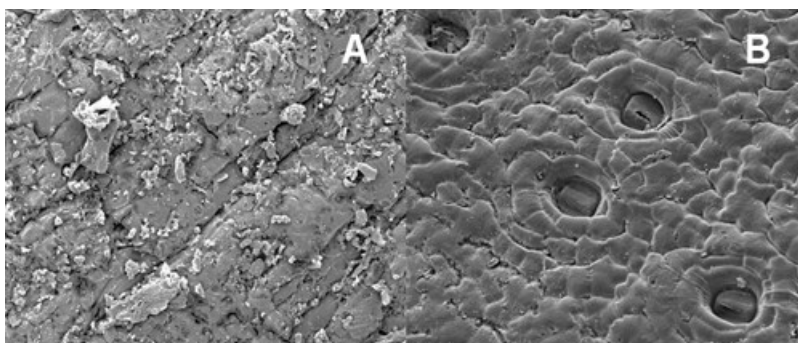


Figure 2. Microstructures of *Opuntia streptacantha* seen with scanning electron microscope at 250X; A) dehydrated sample; B) sample without hydrophobic compounds.

Figura 2. Microestructuras de *Opuntia streptacantha* observadas con SEM a 250X; A) muestra deshidratada; B) muestra con extracción de compuestos hidrofóbicos.

Crystallization and melting profiles of extracts

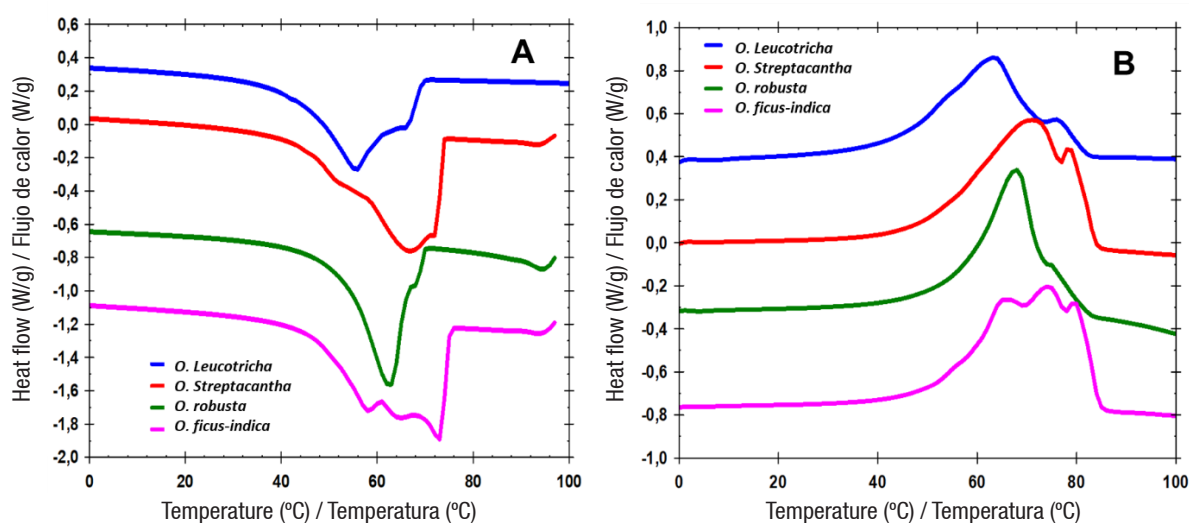
Crystallization and melting temperatures, as well as crystallization and melting enthalpies were obtained from thermograms. The exotherms (crystallization process) of *O. leucotricha*, *O. streptacantha* and *O. robusta* samples show 2 overlapping peaks during the crystallization process, while *O. ficus-indica* had 3 peaks (Figure 3 A). The presence of these peaks is probably due to the existence of diverse compounds with structural similarity (minority components) or to the polymorphism of the crystalline structures formed during the cooling process (Morales-Rueda Juan A., Dibildox-Alvarado, Elena., Charó- Alonso, Miriam A., Weiss, Richard G. & Toro-Vazquez, Jorge F. 2009)).

The sample of *O. ficus-indica* had the highest crystallization temperature ($75.46^{\circ}\text{C} \pm 0.50$), followed by *O. streptacantha* with $74.19^{\circ}\text{C} \pm 0.30$. *O. robusta* and *O. leucotricha* had the lowest crystallization temperatures ($70.5 \pm 0.10^{\circ}\text{C}$ in both cases). In candelilla and dotriacontane waxes (alkane of 32 carbon atoms at 99.5%), crystallization temperatures were 76.6 and 67.5°C , respectively (Morales-Rueda et al. 2009). In such cases, crystallization temperature can be attributed mainly to the main component, hentriacontane (alkane of 31 carbon atoms). Therefore, crystallization temperatures of *Opuntia* sample extracts could be associated to the presence of hydrophobic compounds similar to candelilla wax (i.e. alkanes, long-chain alcohols, fatty acids and long-chain esters) as reported by Toro-Vazquez, J. F., Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M., Alonzo-Macias, M. & González-Chávez, M. M. (2007).

Para corroborar la presencia de los compuestos hidrofóbicos en la superficie de los cladodios, una microfotografía de *O. streptacantha* se obtuvo después del proceso de extracción por medio de la técnica Soxhlet. Los resultados fueron comparados con la superficie cuticular de la misma especie a la que no se le realizó extracción. La muestra deshidratada con presencia de compuestos hidrofóbicos (Figura 2 A) presenta un contenido grande de partículas dispersas en toda su superficie, mientras que la Figura 2 B muestra una superficie con ausencia de ellas. Estos resultados confirman que los compuestos hidrofóbicos apreciados (Cuadro 1) corresponden a las partículas observadas en las imágenes microscópicas (Figuras 1 y 2) y concuerdan con las partículas cerosas consignadas por Ben Salem-Fnayou et al. (2013) y Rykaczewski et al. (2016) en las especies de *Opuntia* mencionadas.

Perfiles de cristalización y fusión de los extractos

A partir de los termogramas se obtuvieron las temperaturas de cristalización y fusión, así como las entalpías de cristalización y fusión. Los exotermos (proceso de cristalización) de las muestras de *O. leucotricha*, *O. streptacantha* y *O. robusta*, presentan 2 picos traslapados durante el proceso de cristalización, mientras que *O. ficus-indica* presenta 3 picos (Figura 3 A). La presencia de estos picos probablemente se debe a la existencia de compuestos diversos con similitud estructural (componentes minoritarios) o al polimorfismo de las estructuras cristalinas formadas durante el proceso de enfriamiento (Morales-Rueda Juan A., Dibildox-Alvarado, Elena., Charó- Alonso, Miriam A., Weiss, Richard G. & Toro-Vazquez, Jorge F. 2009).



**Figure 3. Crystallization (A) and melting (B) thermographs of hydrophobic compounds of four species of *Opuntia*.
Figura 3. Termogramas de cristalización (A) y fusión (B) de los compuestos hidrofóbicos de cuatro especies de *Opuntia*.**

The endothermic process (melting process) is shown in Figure 3B. The identification of the melting temperature of the samples was made from the height of the maximum peak in the cases of *O. leucotricha* and *O. robusta*, while in the case of *O. streptacantha* and *O. ficus-indica* the maximum signal of the last peak was considered, because it was the representative peak. The results show that *O. ficus-indica* had the highest melting temperature ($79.85^{\circ}\text{C} \pm 0.28$), the next one corresponds to *O. streptacantha* with $78.25^{\circ}\text{C} \pm 0.15$, while *O. robusta* and *O. leucotricha* had lower melting temperatures (67 and 63°C , respectively). All melting temperatures determined in this study, for the different species, are very different ($P < 0.0001$), as can be clearly seen in Figure 4.

The results show that *O. leucotricha*, *O. ficus-indica* and *O. streptacantha* have compounds in their cuticle with melting temperatures very similar to those reported for commercial waxes, such as candelilla wax, ($67-79^{\circ}\text{C}$; Cabello, A. C. J., Sáenz, G. A., Barajas, B. L., Pérez, B. C., Ávila, O. C., & Valdés, G. J. A. 2013), carnauba wax ($80-85^{\circ}\text{C}$; Blake et al. 2014) or rice bran wax ($78-81^{\circ}\text{C}$; Dassanayake, Kodali, & Ueno, 2011). Therefore, the hydrophobic compounds of the four *Opuntia* species have a chemical composition similar to that of the above-mentioned vegetable waxes.

Polarized Light Microscopy from extracts

The microphotographs of the samples are shown in Figure 5. In all cases, the small, abundant, colloidal-

La muestra de *O. ficus-indica* presentó la temperatura de cristalización mayor ($75.46^{\circ}\text{C} \pm 0.50$), seguida por la de *O. streptacantha* con $74.19^{\circ}\text{C} \pm 0.30$. Por su parte, a *O. robusta* y *O. leucotricha* corresponden las temperaturas de cristalización menores ($70.5 \pm 0.10^{\circ}\text{C}$ en ambos casos). En las ceras de candelilla y dotriacontano (alcano de 32 átomos de carbono al 99.5 %), las temperaturas de cristalización fueron 76.6 y 67.5°C , respectivamente (Morales-Rueda et al. 2009). En tales casos, la temperatura de cristalización puede ser atribuida principalmente a su componente principal, hentricontano (alcano de 31 átomos de carbono). Por lo tanto, las temperaturas de cristalización de los extractos de las muestras de nopal podrían estar asociadas a la presencia de compuestos hidrofóbicos similares a los de la cera de candelilla (i.e. alcanos, alcoholes de cadena larga, ácidos grasos y ésteres de cadena larga) como lo consignan Toro-Vazquez, J. F., Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M., Alonzo-Macias, M. & González-Chávez, M. M. (2007).

El proceso endotérmico (proceso de fusión) se aprecia en la Figura 3 B. La determinación de la temperatura de fusión de las muestras se hizo a partir de la altura del pico máximo en los casos de *O. leucotricha* y *O. robusta*, mientras que en el caso de *O. streptacantha* y *O. ficus-indica* se consideró la señal máxima del pico último, debido a que fue el pico representativo. Los resultados muestran que *O. ficus-indica* presentó la temperatura de fusión mayor ($79.85^{\circ}\text{C} \pm 0.28$), la siguiente corresponde a *O. streptacantha* con $78.25^{\circ}\text{C} \pm 0.15$,

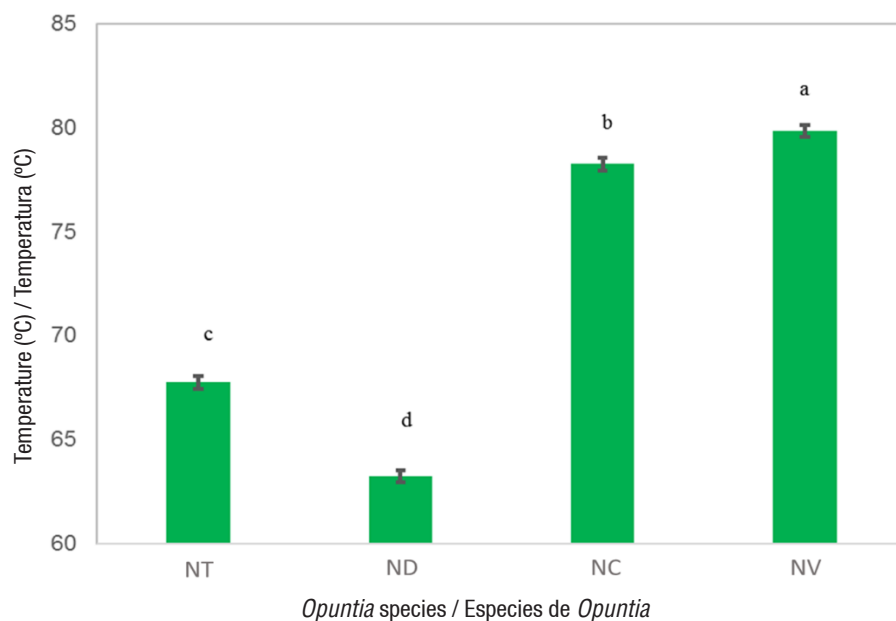


Figure 4. Melting temperatures (T_M) of extracts from four *Opuntia* species. Means associated with the species (bars) with different literals are statistically different, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Figura 4. Temperaturas de fusión (T_f) de extractos de cuatro especies de nopal (Género *Opuntia*). Medias asociadas a las especies (barras) con literales distintas son diferentes estadísticamente, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

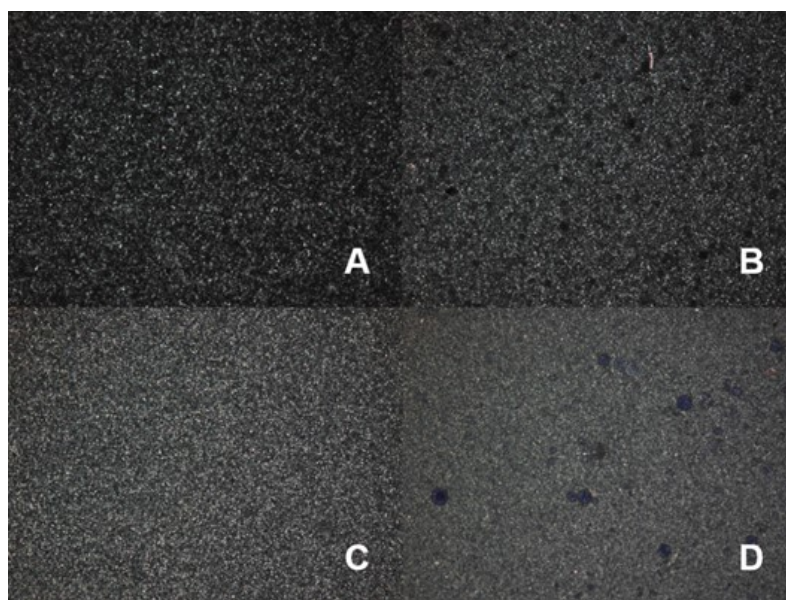


Figure 5. Microstructures of samples A) *Opuntia robusta*, B) *Opuntia leucotricha*, C) *Opuntia streptacantha* and D) *Opuntia ficus-indica* observed with a polarized light microscope. 20X Magnification.

Figura 5. Microestructuras de las muestras A) *Opuntia robusta*, B) *Opuntia leucotricha*, C) *Opuntia streptacantha* y D) *Opuntia ficus-indica* observadas con un microscopio con luz polarizada. Magnificación de 20X.

sized and granular crystals are similar to candelilla wax crystals as reported by Toro-Vázquez et al. (2007), Serrato-Palacios, L. L., Toro-Vázquez, J. F., Dibildox-Alvarado, E., Aragón-Piña, A., Morales-Armenta, M. R., Ibarra-Junquera, V. & Pérez-Martínez, J. D. (2015) y Sánchez-Becerril, M., Maragoni, A. G., Perea-Flores, M. J., Cayetano-Castro, N., Martínez-Gutiérrez, H., Andraca-Adame, J.A. & Pérez-Martínez, J.D. (2018).

These researchers showed that the shape of the crystals of various vegetable waxes, particularly candelilla and carnauba waxes are shaped like small needles with a large degree of birefringence. Accordingly, extracts from the surface of the cladodes of the four *Opuntia* species show similar crystals (i.e. needle-shaped, colloidal size, birefringent) to those already reported in the literature. This could be due to the presence of hydrophobic compounds similar to those found in candelilla or carnauba waxes.

Conclusions

The cuticle of the *Opuntia* species involved in this study has hydrophobic compounds with thermal parameters, such as melting temperature, similar to some commercial waxes such as candelilla wax or carnauba wax, suitable for use in agri-food, cosmetic and pharmaceutical industries. The extraction of hydrophobic compounds of *O. streptacantha* suggests that these compounds can be considered as a new alternative (vegetable wax) with great potential in the industry.

mientras que las especies *O. robusta* y *O. leucotricha* obtuvieron temperaturas de fusión menores (67 y 63 °C, respectivamente). Todas las temperaturas de fusión determinadas en este estudio para las distintas especies son muy diferentes ($P < 0.0001$), como se puede apreciar claramente en la Figura 4.

Los resultados demuestran que *O. leucotricha*, *O. ficus-indica* y *O. streptacantha* tienen en su cutícula compuestos con temperaturas de fusión muy similares a las consignadas para ceras comerciales, como cera de candelilla, (67-79 °C; Cabello, A. C. J., Sáenz, G. A., Barajas, B. L., Pérez, B. C., Ávila, O. C., & Valdés, G. J. A. 2013), cera de carnauba (80-85 °C; Blake et al. 2014) o cera de salvado de arroz (78 -81 °C; Dassanayake, Kodali, & Ueno, 2011). Por lo tanto, los compuestos hidrofóbicos de las cuatro especies de *Opuntia* tienen una composición química similar a la de las ceras vegetales ya mencionadas.

Microscopía de Luz Polarizada de los extractos

Las microfotografías de las muestras se muestran en la Figura 5. En todos los casos, los cristales pequeños, abundantes y de dimensiones coloidales, así como de forma granular son similares a los cristales de cera de candelilla consignados por Toro-Vázquez et al. (2007), Serrato-Palacios, L. L., Toro-Vázquez, J. F., Dibildox-Alvarado, E., Aragón-Piña, A., Morales-Armenta, M. R., Ibarra-Junquera, V. & Pérez-Martínez, J. D. (2015) y Sánchez-Becerril, M., Maragoni, A. G., Perea-Flores,

Acknowledgements

The authors thank PRODEP with the 511-6/17-7930 fund, the Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) of the UASLP under the agreement C17-FAI-06-04.04 and the Q. Adela Martínez Hernández of the Museum Laberinto de las Ciencias y las Artes of the city of San Luis Potosí for the facilities to use the Scanning Electronic Microscope.

End of English version

References / Referencias

- Arreola-Nava, H. J., Cuevas-Guzmán, R., Guzmán-Hernández, L., & González-Durán, A. (2017). *Opuntia setocarpa*, a new species of nopal from Western Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88 (4), 792-797. doi: org/10.1016/j.rmb.2017.10.028
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995). *Official Methods of Analysis* (15th ed.). Arlington, VA, USA.
- Ben Salem-Fnayou, A., Zemni, H., Nefzaoui, A., & Ghorbel A. (2013). Micromorphology of Cactus-Pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) Cladodes Based on Scanning Microscopies. *Micron* 56, 68-72. doi: 10.1016/j.micron.2013.10.010
- Blake, A. I., Co, E., & Marangoni, A. G. (2014). Structure and physical properties of plant wax crystal networks and their relationship to oil binding capacity. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 91, 885-903. doi: 10.1007/s11746-014-2435-0
- Blake, A. I., Toro-Vazquez, J. F., & Hwang, H. S. (2018). Wax oleogels. In A. Marangoni & N. Garti (Eds), *Edible Oleogels: Structure and Health Implications* (2d ed., pp.133-167). London: AOCS press.
- Cabello, A. C. J., Sáenz, G. A., Barajas, B. L., Pérez, B. C., Ávila, O. C., & Valdés, G. J.A. (2013). Cera de Candelilla y sus aplicaciones. *Avances en Química*, 8(2), 105-110.
- Cervantes, R. M. C. (2002). Plantas productoras de ceras. In R. M. C. Cervantes (Ed.), *Plantas de importancia económica en las zonas áridas y semiáridas de México*. (pp. 125-137). México, D. F. ISBN: 970-32-0182-02
- Co, E. D., & Marangoni, A. G. (2012). Organogels: An Alternative Edible Oil-Structuring Method. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 89, 749-780. doi: 10.1007/s11746-012-2049-3
- Dassanayake, L. S. K., Kodali, D. R., & Ueno, S. (2011). Formation of Oleogels Based on Edible Lipid Materials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(5), 432-439. doi:10.1016/j.cocis.2011.05.005
- de Freitas, C. A. S., de Sousa, P. H. M., Soares, D. J., da Silva, J. Y. G., Benjamin, S. R., & Guedes, M. I. F. (2019). Carnauba wax uses in food – A review. *Food Chemistry*, 291, 38-48. doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.133
- Jana, S., & Martini, S. (2016). Physical characterization of crystalline networks formed by binary blends of waxes in soybean oil. *Food Research International*, 89, 245-253. doi:10.1016/j.foodres.2016.08.003

M. J., Cayetano-Castro, N., Martínez-Gutiérrez, H., Andraca-Adame, J.A. & Pérez-Martínez, J.D. (2018). Estos investigadores demostraron que la forma de los cristales de varias ceras vegetales, particularmente ceras de candelilla y carnauba tienen forma de agujas pequeñas con un grado grande de birrefringencia. De acuerdo con lo mencionado, los extractos de la superficie de los cladodios de las cuatro especies presentan cristales similares (i.e. forma de agujas, tamaño coloidal, birrefringentes) a los ya consignados en la literatura. Esto podría deberse a la presencia de compuestos hidrofóbicos similares a los que tienen las ceras de candelilla o carnauba.

Conclusiones

La cutícula de las especies de *Opuntia* involucradas en esta investigación, tienen compuestos hidrofóbicos con parámetros térmicos, como la temperatura de fusión, similares a algunas ceras comerciales como cera de candelilla o cera de carnauba, convenientes para su uso en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica. La extracción de compuestos hidrofóbicos de la especie *O. streptacantha* sugiere que dichos compuestos pueden ser considerados como una alternativa nueva (cera vegetal) con gran potencial en la industria.

Agradecimientos

Los autores agradecen al PRODEP con el fondo 511-6/17-7930, al Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI) de la UASLP a través del convenio C17-FAI-06-04.04 y a la Q. Adela Martínez Hernández del Museo Laberinto de las Ciencias y las Artes de la ciudad de San Luis Potosí por las facilidades en el uso de Microscopio Electrónico de Barrido.

Fin de la versión en español

- Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charó-Alonso, M. A., Weiss, R. G., & Toro-Vazquez, J. F. (2009). Thermo-mechanical properties of candelilla wax and dotriacontane organogels in safflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 207-215. doi: 10.1002/ejlt.200810174
- Rojas, M. R., Saucedo P. S., De León, Z. M. A., Jasso, C. D., & Aguilar, C.N. (2011). Ensayo: Pasado, Presente y Futuro de la Candelilla. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(6), 7-18.
- Rojas-Molina, R., De León-Zapata, M. A., Saucedo-Pompa, S., Aguilar-González, M. A., & Aguilar, C. N. (2013). Chemical and Structural Characterization of Candelilla (*Euphorbia antisypilitica* Zucc.). *Journal of Medicinal Plants Research* 7(12), 702-705. doi: 10.5897/JMPR11.321

- RStudio, PBC (2017). GNU Affero General Public License version 3 (AGPL v.3). Boston, MA, USA
- Rykaczewski, K., Jordan, J. S., Linder, R., Woods, E. T., Sun, X., Kemme, N.,...,& Majure L. C. (2016). Microscale mechanism of age dependent wetting properties of Prickly Pear Cacti (*Opuntia*). *Langmuir*, 32, 9335–9341. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b02173
- Rzedowski, J. (2006). Matorral xerófilo. In J. Rzedowski (Ed.), *Vegetación de México* (1a. Edición digital, pp. 247-243). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Sánchez-Becerril, M., Maragoni, A. G., Perea-Flores, M. J., Cayetano-Castro, N., Martínez-Gutiérrez, H., Andraca-Adame, J. A. & Pérez-Martínez, J. D. (2018). Characterization of the Micro and Nanostructure of the Candelilla Wax Organogels Crystal Networks. *Food Structure*, 16, 1-7. doi: 10.1016/j.foostr.2018.02.001
- Serrato-Palacios, L. L., Toro-Vazquez, J. F., Dibildox-Alvarado, E., Aragón-Piña, A., Morales-Armenta, M. R., Ibarra-Junquera, V., & Pérez-Martínez, J. D. (2015). Phase Behavior and Structure of Systems Based on Mixtures of *n*-Hentriacontane and Melissic Acid. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 92(4), 533-540. doi: 10.1016/j.foodres.2016.10.025
- Shepherd, T., & Griffiths, D.W. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171, 469–499. doi : 10.1111/j.1469-8137.2006.01826.x
- Toro-Vazquez, J. F., Morales-Rueda, J. A., Dibildox-Alvarado, E., Charo-Alonso, M., Alonzo-Macias, M., & González-Chávez, M. M. (2007). Thermal and textural properties of organogels developed by candelilla wax in safflower oil. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 84, 989–1000. doi: 10.1007/s11746-007-1139-0
- Toro-Vazquez, J. F., Mauricio-Pérez, R., González-Chávez, M. M., Sánchez-Becerril, M., Ornelas-Paz, J. J., & Pérez-Martínez, J. D. (2013). Physical properties of organogels and water in oil emulsions structured by mixtures of candelilla wax and monoglycerides. *Food Research International* 54, 1360–1368. doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.046
- Wilkinson, R. E., & Mayeux, H. E. Jr. (1990). Composition of epicuticular wax on *Opuntia engelmannii*. *Botanical Gazette*, 151 (3), 342-347. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/2995405>