

ESTABILIDAD DEL COLOR Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS BETALAÍNAS
DE LOS FRUTOS DE *OPUNTIA FICUS INDICA (L) MILL.*, UNA CACTÁCEA
SILVESTRE DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO.

LINA MARIA JOJOA CHAMORRO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2022

ESTABILIDAD DEL COLOR Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS BETALAÍNAS
DE LOS FRUTOS DE *OPUNTIA FICUS INDICA (L) MILL.*, UNA CACTÁCEA
SILVESTRE DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

LINA MARIA JOJOA CHAMORRO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de
Químico

DIRECTOR
NELSON HUMBERTO HURTADO GUTIÉRREZ
Doctor en Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PASTO
2022

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1° del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez

Director

Juan Camilo Vargas Gallego

Jurado

Juan David Giraldo Aguirre

Jurado

San Juan de Pasto, 01 de julio de 2022

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mis padres y hermanos por ser el motor que impulsa mi vida.

A mi director de tesis, Dr. Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez por su confianza, orientación y apoyo en el desarrollo de mi proceso de investigación.

A la Universidad de Nariño y al Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica (GIPIB) por el financiamiento de este trabajo.

Al personal de la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño, por su colaboración en el análisis de HPLC-PAD.

A la universidad de Sevilla-España por en análisis de las muestras y resultados del estudio colorimétrico.

RESUMEN

En la presente investigación estudió la actividad antioxidante *in-vitro* y la estabilidad del color de las betalaínas del fruto (pulpa y cáscara) de la cactácea *Opuntia ficus indica* (L). Mill. Se evaluaron dos métodos de extracción: maceración química y extracción con ultrasonido, se planteó un diseño experimental simple usando como variable respuesta el contenido total de betalaínas y se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido de betalaínas totales del ECM (51,47mg/100g) y ECU (39,15mg/100g). Posteriormente se purificó el ECM y el extracto purificado (EPM) se sometió a una retención selectiva en silica C-18, aislando una fracción amarilla (FA) enriquecida en betaxantinas (23,19 mg indicaxantina/g ECM) y una fracción roja (FR) rica en betacianinas (2,410mg betanina/g ECM). En las fracciones se confirmó la presencia de pigmentos BC y BX mediante HPLC analítica y caracterizó tentativamente mediante comparación con datos bibliográficos la indicaxantina (prolina-betaxantina), como el compuesto mayoritario. El análisis de la actividad antirradical mostró que, entre todos los extractos, la FR tuvo mayor capacidad para capturar radicales ABTS (0,3837 mmol Trolox/g Muestra), DPPH (28,53µg/mL) y mayor poder reductor FRAP (6,640mg AA/g muestra), de igual manera, la FR tuvo mayor contenido fenólico total (235,03mg AG/g) con una fuerte correlación ($r^2=0,998$) entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico. Mediante la colorimetría triestímulo se determinó el efecto del pH (3,5 y 7) y la temperatura (4°C, 80°C y T. ambiente) sobre el color del ECM y EPM, el color inicial de los extractos cambió de anaranjado ($h^*_{ab}\sim 48$) a tonos más amarillos ($h^*_{ab}\sim 60$), más claros (mayor L^*) y menos saturados (menor C^*_{ab}) cuando se sometieron a diferentes condiciones de almacenamiento, sin embargo, se comprobó que estas variaciones solo se hacen perceptibles al ojo humano después de 20 días en el almacenamiento y que la condiciones más adecuadas para conservar el color anaranjado inicial son pH 5 y temperatura de 4°C.

ABSTRACT

In the present research project the betalain-type pigments present in the fruit (pulp and rind) of cactus *Opuntia ficus indica* (L). Mill., were extracted, quantified and the antioxidant activity in vitro and the stability of the color have been studied. During the extraction process, two methods were evaluated, the traditional extraction with chemical maceration and the ultrasound assisted extraction, a simple experimental design was proposed using the total content of betalains as a response variable, the crude extract by maceration (ECM) and the crude extract by ultrasound (ECU) were obtained and statistically significant differences were determined between the content of total betalains of the ECM (51.47mg / 100g) and ECU (39.15mg / 100g). Subsequently, the ECM was purified and the product of this (EPM) was subjected to a selective retention on C-18 silica to isolate a yellow fraction (FA) enriched in betaxanthins (23.19 mg indicaxanthin / g ECM) and a red fraction (FR) rich in betacyanins (2.410mg betanin / g ECM). In the purified extract and the fractions, the presence of BC and BX pigments was confirmed by analytical HPLC and indicaxanthin (proline-betaxanthin) was tentatively characterized by comparison with bibliographic data, as the majority compound. The analysis of the antiradical activity showed that FR has a greater capacity to stabilize free radicals ABTS (0, 3837 mmol Trolox / g Sample), DPPH (28.53µg / mL) and greater reducing power FRAP (6.640mg AA / g sample), followed by ECM, EPM, ECU and FA; similarly, between the extracts and fractions, FR had a higher total phenolic content (235.03mg GA / g) showing strong correlation ($r^2 = 0.998$) between antioxidant activity and phenolic content. Through tristimulus colorimetry it was possible to establish pH (3.5 and 7) and temperature effect (4 ° C, 80 ° C and ambient T.) on the color of the ECM and EPM, the initial color of the extracts changed from orange ($h^*_{ab} \sim 48$) to shades more yellow ($h^*_{ab} \sim 60$), lighter (higher L^*) and less saturated (less C^*_{ab}) when subjected to different conditions of storage, however, it was found that these variations only become perceptible to the human eye after 20 days in storage and that the most suitable conditions to preserve the initial orange color of the extracts are pH 5 and temperature of 4 ° C.

CONTENIDO

| | pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN | 19 |
| 1. OBJETIVOS | 21 |
| 1.1 OBJETIVO GENERAL | 21 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 2. ESTADO DEL ARTE | 22 |
| 2.1. MARCO TEORICO | 22 |
| 2.1.1 Familia de <i>Cactáceas</i> | 22 |
| 2.1.2. <i>Opuntia ficus-indica</i> | 23 |
| 2.1.2.1. <i>Opuntia ficus-indica</i> L (Mill.) Taxonomía ¹⁶ y características | 23 |
| 2.1.3. Pigmentos Naturales. | 24 |
| 2.1.4. BETALAÍNAS | 26 |
| 2.1.4.1. Estructura | 26 |
| 2.1.4.2. Betacianinas (BC) | 27 |
| 2.1.4.3. Betaxantinas (BX) | 29 |
| 2.1.4.4. Biosíntesis | 30 |
| 2.1.4.5. Estabilidad de las betalaínas | 31 |
| 2.1.4.6. Actividad antioxidante | 32 |
| 2.1.5. Técnicas de Análisis de Betalaínas | 34 |
| 2.1.5.1. Extracción de betalaínas. | 34 |
| 2.1.5.2. Separación y purificación | 35 |
| 2.1.5.3. Cuantificación e identificación de betalaínas. | 36 |
| 2.1.5.4. Cuantificación del contenido fenólico | 37 |
| 2.1.5.5. Métodos para determinación de la capacidad antioxidante. | 38 |
| 2.1.5.6 Colorimetría triestímulo | 40 |
| 2.2. ANTECEDENTES | 44 |
| 3. METODOLOGÍA. | 47 |
| 3.1 MUESTREO Y CLASIFICACIÓN DEL FRUTO. | 47 |
| 3.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL FRUTO | 47 |
| 3.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL | 48 |
| 3.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS | 48 |

| | |
|---|----|
| 3.4.1 Extracción por Maceración Química (EMQ) | 48 |
| 3.4.2. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU)..... | 49 |
| 3.4.3. Ensayos Preliminares y Elección del Método de Extracción | 49 |
| 3.5. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO BETALAÍNICO. | 50 |
| 3.6. PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE BETAXANTINAS Y BETACIANINAS | 51 |
| 3.6.1 Fraccionamiento del Extracto Purificado. | 51 |
| 3.7. ANÁLISIS DE BETALAINAS POR HPLC-ANALÍTICA..... | 52 |
| 3.8. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (CFT)..... | 52 |
| 3.9. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE. | 52 |
| 3.9.1. Método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox). | 53 |
| 3.9.2. Método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) | 53 |
| 3.9.3. Método FRAP (Potencial Antioxidante en la Reducción Férrica)..... | 54 |
| 3.10. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR MEDIANTE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO | 54 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 56 |
| 4.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS INICIALES DEL FRUTO..... | 56 |
| 4.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE BETALAÍNAS..... | 56 |
| 4.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS Y CUANTIFICACIÓN | 58 |
| 4.3.1. Cuantificación de Betalaínas | 58 |
| 4.3.2. Valoración estadística del Contenido de Betalaínas bajo los dos Métodos de Extracción | 59 |
| 4.4 PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS..... | 60 |
| 4.5 ANÁLISIS GENERAL DE BETALAÍNAS POR HPLC ANALÍTICA..... | 62 |
| 4.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT) | 65 |
| 4.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> | 69 |
| 4.6.1 Método TEAC..... | 69 |
| 5.6.2 Método DPPH | 73 |
| 4.6.3 Método FRAP | 75 |
| 4.7 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR POR COLORIMETRÍA TRIESTIMULO. | 78 |
| 4.7.1 Análisis Preliminar..... | 78 |
| 4.7.2 Características colorimétricas de ECM y EPM..... | 81 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 89 |
| RECOMENDACIONES | 91 |

| | |
|--------------------|-----|
| BIBLIOGRAFÍA | 92 |
| ANEXOS | 102 |

LISTA DE TABLAS

| | | pág. |
|-----------|---|------|
| Tabla 1. | Gradiente de elución para extracto purificado y fracciones | 52 |
| Tabla 2. | Algunas Características fisicoquímicas de los frutos | 56 |
| Tabla 3. | Contenido de betacianinas y betaxantinas en los extractos crudos | 59 |
| Tabla 4. | Análisis de varianza para contenido total de betalaínas por método de extracción | 60 |
| Tabla 5. | Tabla de Medias para contenido total de betalaínas por método de extracción con intervalos de confianza del 95,0% | 60 |
| Tabla 6. | Datos para construcción de la recta de calibrado para CFT con patrón de ácido gálico | 66 |
| Tabla 7. | Estadísticas de la regresión lineal del método de Folin-Ciocalteu | 67 |
| Tabla 8. | Contenido fenólico total en los extractos y fracciones de <i>O. ficus-indica</i> (L) Mill. | 67 |
| Tabla.9. | Prueba de múltiples rangos para CFT | 68 |
| Tabla 10. | Comparación del contenido fenólico total en diferentes frutos de cactáceas | 69 |
| Tabla 11. | Datos para método TEAC con patrón de Trolox | 70 |
| Tabla.12. | Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox en los extractos y fracciones de <i>O. ficus-indica</i> (L) Mill. | 71 |
| Tabla 13. | Valores TEAC en frutos del género <i>Opuntia</i> | 72 |
| Tabla 14. | Ecuaciones de correlación para método DPPH | 73 |
| Tabla 15. | EC ₅₀ de extractos y fracciones de <i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill | 74 |
| Tabla 16. | Poder antioxidante en la reducción férrica de los extractos y fracciones de <i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill. | 76 |
| Tabla 17. | Contenido fenólico total, TEAC, DPPH y FRAP para extractos crudos, purificado y fracciones de los frutos <i>O. ficus-indica</i> | 77 |
| Tabla 18. | Condiciones usadas para estudio de estabilidad del color. | 80 |
| Tabla 19. | Variación en los parámetros del color del ECM. | 83 |
| Tabla 20. | Variación en los parámetros del color del EPM | 83 |
| Tabla 21. | Diferencias de color para ECM a 4°C,80°C y T. ambiente a pH 3,5 y 7 | 87 |
| Tabla 22. | Diferencias de color para EPM a 4°C,80°C y T. ambiente a pH 3,5 y 7 | 87 |

LISTA DE FIGURAS

| | | pág. |
|------------|---|------|
| Figura 1. | Tipos de Cactáceas | 22 |
| Figura 2. | <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill. del departamento de Nariño | 24 |
| Figura 3. | Estructura de algunos pigmentos naturales | 25 |
| Figura 4. | Estructuras generales de: (a) ácido betalámico y (b) betalaínas, mostrando resonancia del cromóforo | 26 |
| Figura 5. | Estructura general de las betacianinas | 27 |
| Figura 6. | Estructura de la neobetanina. | 29 |
| Figura 7. | Estructura de betaxantinas | 29 |
| Figura 8. | Biosíntesis de betalaínas | 30 |
| Figura 9. | Hidrólisis de la betanina en medio básico | 32 |
| Figura 10. | Reacción de fenoles con reactivo de Folin-Ciocalteu | 38 |
| Figura 11. | Esquema reacción con ABTS | 39 |
| Figura 12. | Reacción del DPPH. | 40 |
| Figura 13. | Representación espacio CIELab | 42 |
| Figura 14. | Atributos de color | 42 |
| Figura 15. | Muestreo frutos de cactácea en municipio de Taminango | 47 |
| Figura 16. | Proceso de obtención de ECM | 49 |
| Figura 17. | Apariencia de ECU | 50 |
| Figura 18. | Separación de betalaínas usando cromatografía de columna | 51 |
| Figura 19. | Prueba cualitativa para confirmar presencia de betalaínas | 57 |
| Figura 20. | Espectros de absorción ECM en medio ácido (a) y básico (c) y ECU a pH ácido (b) y básico (d). | 58 |
| Figura 21. | Espectros de absorción UV-Vis de fracciones, FA y FR | 61 |
| Figura 22. | Cromatogramas HPLC-PDA de FA y FR | 62 |
| Figura 23. | Perfiles cromatográficos del EPM a 480nm (a) y 538nm (b) | 63 |
| Figura 24. | Espectros UV-Vis on-line de algunos picos cromatográficos del extracto purificado EPM y las fracciones. | 64 |
| Figura 25. | Curva de calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales | 66 |
| Figura 26. | Diagrama de barras del CFT en extractos y fracciones | 68 |
| Figura 27. | Recta de calibración con Trolox para método TEAC. | 70 |
| Figura 28. | Diagrama de barras de valores de TEAC ($\mu\text{mol TROLOX} / \text{g muestra}$) | 71 |
| Figura 29. | Gráfica de correlación entre el CFT y la actividad antioxidante TEAC. | 72 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 30. | Curva dosis-respuesta para DPPH del ECM | 73 |
| Figura 31. | Diagrama de barras de valores de EC50 ($\mu\text{g/mL}$) de extractos y fracciones | 75 |
| Figura 32. | Recta de calibrado con ácido ascórbico para método FRAP | 75 |
| Figura 33. | Diagrama de barras de valores FRAP (mgAAE/g muestra) | 76 |
| Figura 34. | Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y el poder reductor FRAP | 77 |
| Figura 35. | Variaciones de color de los extractos ECM y EPM a diferentes valores de pH | 79 |
| Figura 36. | Cambios en los espectros de absorción para ECM y EPM a diferentes condiciones de pH y temperatura ambiente | 80 |
| Figura 37. | Comportamiento de ECM y EPM durante el almacenamiento a 4°C y diferentes condiciones de pH | 80 |
| Figura 38. | Variación del tono o matiz h^*_{ab} en ECM y EPM | 82 |
| Figura 39. | Variación de luminosidad L^*_{ab} del color en ECM y EPM | 84 |
| Figura 40. | Variación de croma C^*_{ab} en ECM y EPM | 85 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|---|------|
| ANEXO A. Certificado de clasificación taxonómica impartido por el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad de Nacional. | 102 |
| ANEXO B. Coloración azul característica de la reacción del Método de Folin-ciocalteu. | 103 |
| ANEXO C. Coloración azul-verdosa característica del radical ABTS•+. | 103 |
| ANEXO D. Coloración violeta característica del radical DPPH. | 103 |
| ANEXO E. Coloración característica de la reacción FRAP | 103 |
| ANEXO F. Tablas de porcentajes de área y altura de los picos cromatográficos más representativos en el EPM | 104 |
| ANEXO G. Gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para el CFT de extractos y fracciones. | 104 |
| ANEXO H. Estadísticas de la regresión lineal del método TEAC. | 104 |
| ANEXO I. Prueba de Múltiple Rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del método TEAC | 105 |
| ANEXO J. Construcción de las curvas dosis-respuesta para método DPPH de los extractos y fracciones. | 105 |
| ANEXO K. Curva dosis respuesta para el control ácido ascórbico usado en DPPH. | 106 |
| ANEXO L. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del EC ₅₀ en DPPH. | 106 |
| ANEXO M. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del contenido FRAP. | 107 |
| ANEXO N. Variación en los espectros de absorción de ECM y EPM durante el almacenamiento a 80°C y T. ambiente a diferentes condiciones de pH | 108 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| A | absorbancia |
| A.A | Ácido ascórbico |
| a* | Eje a |
| A _{max} | Absorbancia máxima |
| ABTS | Ácido 2,2'-azinobis-(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfonato) |
| AG | Ácido gálico |
| B | Pendiente de la recta de regresión |
| b* | Eje b |
| BC | Betacianinas |
| BX | Betaxantinas |
| C* _{ab} | Croma |
| CC | Cromatografía en columna |
| CFT | Contenido fenólico total |
| DE | Desviación estándar |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo |
| EAU | Extracción asistida con ultrasonido |
| ECM | Extracto crudo por maceración |
| ECU | Extracto crudo por ultrasonido |
| EMQ | Extracción por maceración química |
| EPM | Extracto puro por maceración |
| EC ₅₀ | Concentración de antioxidante necesario para disminuir la concentración de DPPH en un 50% |
| ESI | Ionización electrospray |
| FA | Fracción amarilla |
| FR | Fracción roja |
| FRAP | Poder antioxidante en la reducción férrica |
| h* _{ab} | Tono o matiz |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficiencia |
| HPLC-MS | Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas |
| HPLC-PDA | Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos. |
| L* _{ab} | Luminosidad |
| N | Tamaño muestral |
| Rf | Factor de retención |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TEAC | Capacidad antioxidante equivalente al TROLOX |
| t _R | Tiempo de retención |
| UV | Ultravioleta |
| UV-Vis | Ultravioleta-visible |

| | |
|------------------------|--|
| X_0 | Valor de x estimado usando la recta de calibración |
| λ | Longitud de onda |
| $\lambda_{\text{máx}}$ | Longitud de onda de máxima absorción |
| Δ | (Cantidad de cambio). Valor final-valor inicial |

GLOSARIO

ACILO: grupo funcional derivado generalmente de un ácido tras la pérdida de un hidroxilo tiene como fórmula R-CO-

AGLICONA: compuesto químico formado a partir de un glicósido cuando un átomo de hidrógeno sustituye a un grupo glicosilo.

ANTIOXIDANTE: son moléculas que participan en la prevención, eliminación o estabilización de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno que causan estrés oxidativo.

ANTOCIANINA: pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos.

BETALAINAS: pigmentos hidrosolubles, derivados del ácido betalámico, responsables de la coloración rojo-violeta y amarillo-naranja de algunas plantas de la familia *Caryophyllales*. Se dividen en betacianinas y betaxantinas.

BETACIANINAS: pigmentos tipo betalaína de coloración rojiza a violeta, se caracterizan por la conjugación del ácido betalámico con una estructura ciclo-DOPA.

BETAXANTINAS: pigmentos tipo betalaína de coloración amarilla a naranja, se caracterizan por la conjugación del ácido betalámico con aminoácidos o aminas.

CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA: técnica de separación donde la fase inmóvil es apolar y la fase móvil tiene una polaridad moderada. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

CROMÓFORO: un grupo de átomos en un compuesto químico que son responsables de la coloración del compuesto

EFFECTO BATOCRÓMICO: cuando la longitud de onda de absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda mayores.

EFFECTO HIPSOCRÓMICO: cuando la longitud de onda de absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda menores.

ENDÓGENO: lo que se produce en el interior del organismo o las células. Lo opuesto es lo que se produce en el exterior (exógeno).

EPÍMERO: es el estereoisómero de otro compuesto que tiene una configuración diferente en uno solo de sus centros quirales.

ESTEREOISÓMERO: isómero de una molécula que tiene las mismas conexiones átomo a átomo que dicha molécula, pero difiere en la orientación espacial de los mismos.

HIDROCOLOIDE: polímeros de alto peso molecular (polisacáridos y proteínas) que tienen una gran afinidad por el agua donde se dispersan y forman soluciones coloidales.

IN VITRO: que sucede o que tiene lugar en un medio ambiente artificial en el laboratorio.

ISÓMEROS: compuestos que tienen la misma fórmula molecular, es decir, iguales proporciones relativas de los átomos que conforman su molécula, pero diferente fórmula estructural (y por tanto diferentes propiedades).

MACERACIÓN QUÍMICA: proceso de extracción sólido-líquido.

MUCÍLAGO: sustancia gelatinosa de algunas plantas que contiene proteínas y polisacáridos y es similar a goma vegetal.

NUTRACÉUTICOS: término que combina la idea de alimento o nutriente con la de producto farmacéutico con la intención de denominar genéricamente a los productos alimentarios que poseen cierta capacidad curativa.

PIGMENTOS: son compuestos químicos que absorben la luz en el intervalo de longitud de onda de la región visible.

RADICAL LIBRE: átomo o molécula que contiene al menos un electrón no apareado y existente por un breve período de tiempo antes de reaccionar para producir una molécula estable

ULTRASONIDO: técnica que hace uso de ondas de sonido.

INTRODUCCIÓN

El color es una característica importante en la industria debido a que condiciona la manera en que percibimos los objetos, por tal razón los colorantes son muy usados en diferentes matrices, por ejemplo, en los alimentos se emplean para realzar el color natural que estos presentan y además compensan las pérdidas que se pueden producir por factores ambientales o a consecuencia de los diferentes procesos a lo largo de la cadena productiva.

La investigación en el campo de los pigmentos naturales provenientes de cactáceas permite establecer el potencial de ellas como alimento con propiedades biofuncionales y el desarrollo de productos con valor agregado que puedan ser usados como colorantes naturales. La importancia de los pigmentos naturales surge debido a la preocupación por posibles efectos tóxicos de los colorantes de origen sintético¹, diversas publicaciones indican que causan hiperactividad en los niños y también pueden aumentar el riesgo de padecer trastornos hepáticos, dermatitis e incluso pueden ser carcinógenos². De esta manera, se postulan como posibles reemplazantes a los pigmentos naturales como las betalainas y antocianinas que además de aportar color se ha comprobado que tienen efectos nutraceuticos como antioxidante, antiinflamatorios, antifúngicos, antibacterianos, entre otros^{3,4}.

Entre los pigmentos naturales, las betalainas, que se encuentran en diferentes especies vegetales (cactus, amarantos, acelgas, espinacas y buganvillas)⁵ son una fuente importante de colorantes. Las investigaciones de las características fisicoquímicas de las betalainas son de gran utilidad, ya que estos pigmentos además de brindar coloración que va desde amarillo-anaranjado hasta rojo-violeta, tienen alta capacidad antioxidante asociada a reducir el riesgo de enfermedades degenerativas⁶. Adicionalmente estos son hidrosolubles, lo que presenta una ventaja aplicativa sobre otros pigmentos naturales como las clorofilas y carotenoides, y también son estables en un rango de pH entre 3-7⁷, lo que las convierte en una buena alternativa como aditivo para alimentos neutros y de baja acidez.

Interesantemente el extracto de remolacha roja, rico en betalainas, es comúnmente utilizado como colorante natural en alimentos, cosméticos y

¹ DOWNHAM, Alison and COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. En: Int. J. Food Sci. Techn., 2000, vol. 35, p. 5-22.

² SHARMA, Vinita; MCKONE, Harold and MARKOW, Peter. Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic Food Dyes. En: J. Chem. Educ., 2011, vol 88, no 1., p. 24-28

³ AZEREDO, Henriette. Betalains: properties, sources, applications, and stability-a review. En: Int. J. Food Sci. Technol., 2009. vol. 44, no. 12, p. 2367

⁴ MOSQUERA, Natalia. Contenido De Betalainas y Actividad Antioxidante In Vitro Del Ulluco (*Ullucus Tuberosus*). Trabajo de grado Química. Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2016. 128 p.

⁵ STEPHENS, P.F. Angiosperm Phylogeny. [En línea]. 2007. Disponible en: <<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>>

⁶ STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Betalains-emerging prospects for food scientists. En: Trends Food Sci. Technol., 2007. vol. 18, no. 10, p. 514-525.

⁷ AZEREDO. Op. Cit., p.265.

medicamentos, no obstante, debido a la presencia de geosmina tiene un sabor residual característico, lo que limita su aplicación⁸. Así, se hace necesario explorar otras fuentes de betalaínas, con mejores características organolépticas y que brinden gran diversidad de color. En este sentido, el departamento de Nariño ofrece gran diversidad de fuentes de colorantes naturales, principalmente en las tunas o frutas de cactáceas. Es el caso de los frutos de la especie *Opuntia ficus indica* (L). Mill. que crece de forma silvestre en zonas áridas del corregimiento Remolino, al norte del departamento y que promete ser una fuente potencial de betalaínas de color anaranjado.

En Colombia la gran biodiversidad en plantas está determinada por la gran variedad de los pisos térmicos que ofrece su geografía. Esta ventaja competitiva que nos ofrece nuestra riqueza natural nos permite plantear el presente trabajo con el objeto de evaluar y cuantificar la composición betalaínica de especies silvestres colombianas promisorias para el desarrollo de productos benéficos para la salud humana como los colorantes naturales. El presente trabajo se enfocó en el estudio de los pigmentos mayoritarios tipo betalaínas presentes en los frutos de una cactácea, así como en el análisis del contenido fenólico, actividad antirradical *in vitro* y comportamiento del color por colorimetría triestímulo frente a diferentes condiciones de almacenamiento. El fruto seleccionado fue: *Opuntia ficus-indica* (L). Mill y los resultados obtenidos pueden incentivar la investigación en matrices vegetales del departamento como fuentes de betalaínas con potencial para ser usado como colorante de manera industrial.

⁸ BETANCOURT, Omaira. Aislamiento, caracterización, estabilidad del color y capacidad antioxidante in vitro de los pigmentos tipo betalaínas del fruto de *Opuntia dillenii*. Trabajo de grado Química. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2015. 112 p.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la estabilidad del color y evaluar la capacidad antioxidante *in-vitro* de las betalaínas presentes en el fruto de una cactácea que crece de forma silvestre en zonas áridas del departamento de Nariño

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Extraer y purificar las betalaínas presentes en los frutos de la cactácea, mediante extracción con solvente y técnicas cromatográficas
- ❖ Cuantificar el contenido de betalaínas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y espectrofotometría UV-visible.
- ❖ Evaluar la estabilidad del color de los extractos coloreados mediante colorimetría triestímulo, sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento.
- ❖ Estudiar la capacidad antioxidante *in-vitro* de extractos usando los métodos TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazol) y FRAP (Poder antioxidante en la reducción férrica).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. MARCO TEORICO

2.1.1 Familia de Cactáceas

Las fuentes de betalaínas están restringidas a las plantas superiores del orden *Caryophyllales*. Dentro de este orden se distinguen varias familias, una de ellas es la familia *Cactaceae* o cactácea⁹. Las cactáceas son plantas suculentas, es decir, pueden almacenar grandes cantidades de agua, la mayoría son espinosas, propias de zonas áridas y son conocidas como cactus¹⁰.

Las cactáceas comprenden aproximadamente 1600 especies, que se encuentran distribuidas principalmente en América desde Chile y Argentina hasta Canadá y también en algunas zonas de África¹¹. En ellas están presentes las betalaínas, un tipo de pigmentos nitrogenados derivados de la tirosina que reemplazan a las antocianinas (presentes en los frutos y flores de la mayoría de las plantas). Este grupo de plantas se pueden clasificar en tres tipos: las pitayas (trepadoras), pereskias (columnares) y las tunas¹². Las tunas son los frutos de los cactus que pertenecen al género *Opuntia* y entre ellas se destacan *Opuntia dillenii*, *O. stricta*, *O. ficus-indica*, entre otras.

Figura 1. Tipos de Cactáceas



*De izquierda a derecha: pitaya, pereskias y tunas. Fuente: Imágenes tomadas de Bueno y Plumed (2019)

⁹ HARRIS, Nilangani, et al. Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. En: BMC plant biology, 2012, vol. 12, no. 1, p. 2.

¹⁰ Ibid., p.2.

¹¹ ESQUIVEL, Patricia. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. Agronomía Mesoamericana, 2001, vol.15, no 2, p.215-219

¹² BROCKINGTON, Samuel, et al. Complex pigment evolution in the *Caryophyllales*. En: New Phytologist., 2011, vol.190, no. 4., p.854-864.

¹³ HERNANDEZ, Mateo. Colombia en el mundo - Los Andes secos. [En línea]. 2013. [10 de marzo de 2020]. Disponible en: <<http://biodiversidadyconservacion.blogspot.com/2013/12/colombia-en-elmundo-los-andes-secos.htm>>

2.1.2. *Opuntia ficus-indica*

Esta especie al igual que muchas otras del género *Opuntia* tienen potencial como cultivo para obtención de frutos. *Opuntia ficus-indica*, es uno de los cactus más cultivados a nivel comercial en países como México y Argentina¹³, en Colombia en cambio, está subexplotado y normalmente crece de forma silvestre en zonas áridas de los cañones de los ríos Chicamocha, Dagua y Patía (entre los departamentos de Cauca y Nariño), al sur de la sabana de Bogotá y en la cuenca del río Catatumbo en Norte de Santander¹⁴

En las zonas donde esta especie hace presencia se conoce como tuna, nopal, higo o chumbera y se usa como planta ornamental y en el ámbito agropecuario como cercas vivas y alimento para ganado. También se le han atribuido propiedades como cicatrizante y sus frutos, que pueden tener coloración desde blanco, amarillo, naranja, rojo y púrpura, se consumen para combatir problemas digestivos, dolores estomacales y mejorar la piel con problemas de acné¹⁵.

2.1.2.1. *Opuntia ficus-indica* L (Mill.) Taxonomía¹⁶ y características

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Caryophyllales
Familia: Cactaceae
Subfamilia: Opuntioideae
Tribu: Opuntieae
Género: *Opuntia* Mill
Especie: *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Este cactus es una especie arbórea de entre 1 y 3 metros de altura, sus ejemplares están formados por varios cladodios planos, ovales y verdes que tiene espinas, cortas y finas con aspecto veloso. Los cladodios más antiguos forman un tallo recto que es el soporte de la planta y en los más nuevos crecen flores amarillas en forma de corona y los frutos (figura 2.). Los frutos maduros son ovoides, con cáscara gruesa, espinosa y de color anaranjado, la pulpa, del mismo color, es jugosa, dulce y abundante en semillas¹⁷.

¹⁴ RUIZ, Rosalba. Distribución, Variación Morfológica y Correlaciones Ecológicas de *Opuntia Miller (Cactaceae)* en Colombia. Trabajo de grado. Montería. Colombia: Universidad de Córdoba, 2013. 112 p.

¹⁵ CONGRESO COLOMBIANO DE BOTÁNICA. Las cactáceas de Colombia, una familia de plantas promisorias poco estudiada. En: Libro de Resúmenes III Congreso Colombiano de Botánica. Popayán, Colombia: Ramírez-Padilla, Eds. Universidad del Cauca. 2004. p. 318-319.

¹⁶ GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. En: Wiersema J H. [En línea]. 2019. [10 marzo de 2020]. Disponible en: <<https://www.gbif.org/es/species/101339208>>

¹⁷ RUIZ, Op. Cit., p.23

Figura 2. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. del departamento de Nariño



Fuente: este estudio

2.1.3. Pigmentos Naturales.

Los pigmentos naturales son metabolitos secundarios, que a diferencia de los primarios no tiene un rol directo en la supervivencia y reproducción. Sin embargo, éste no es el caso de carotenoides y clorofilas, que están implicados en la fotoprotección y fotosíntesis, procesos esenciales para la supervivencia del organismo¹⁸.

Entre los principales pigmentos naturales, se distinguen cuatro grupos (figura 3): clorofilas y carotenoides, que son insolubles en agua y antocianinas (flavonoides) y betalainas, que tiene características hidrosolubles¹⁹.

Las clorofilas son los principales pigmentos verdes que contienen los organismos fotosintéticos, tiene un papel vital en el proceso de la fotosíntesis mediante el cual las plantas convierten el agua, CO₂ y luz solar en energía química²⁰. Son compuestos tetrapirrólicos con un ion de magnesio coordinado en el centro. Existen varias clorofilas en la naturaleza, las cuales se diferencian en los sustituyentes del anillo de porfirina, siendo la clorofila a(verde-azul) y la b (verde-amarilla) las que se encuentran en las plantas superiores y generalmente tienen dos bandas de absorción en el espectro UV-vis, una entre 400-500 y la segunda

¹⁸ NEELWARNE, Bhagyalakshmi, et al. Red Beet: An Overview Red Beet Biotechnology. En: Food Pharm. Appl., 2013, vol 55, p. 5-18.

¹⁹ RODRIGUEZ, Delia. Natural food pigments and colorants. En: Curr. Opin. Food Sci., 2016, vol. 7, p. 20.

²⁰ BOROSKY, Yelena. Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripening in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. En: Theor. Appl. Genet., 2008, vol. 117., p. 235-240.

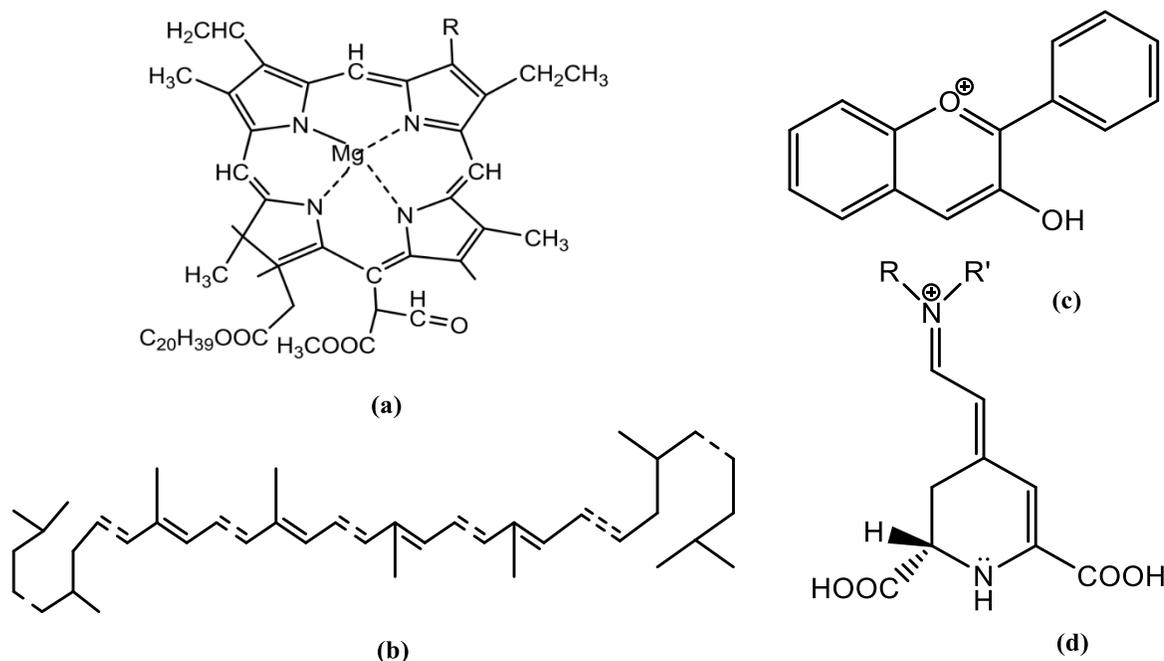
²¹ KAIMAINEN, Mika. Stability of Natural Colorants of Plant Origin. Tesis Doctoral en Ciencias de los Alimentos. Turku: University of Turku. Food Chemistry and Food Development. Department of Biochemistry, 2014. p. 3

entre 600-700²¹.

Los carotenoides son pigmentos liposolubles, de color amarillo, naranja o rojo que se encuentran en la mayoría de las plantas superiores. Estructuralmente son compuestos constituidos por ocho unidades de isoprenoide que forman una cadena principal de 40 carbonos y presentan tres máximos de absorción entre 300 y 500 nm²². Estos se clasifican en: carotenos, con estructuras hidrocarbonadas y en xantofilas, que pueden contener grupos hidroxilo, metoxilo, carboxilo, epoxi, o ceto en su estructura.

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular que comprenden colores como el amarillo, naranja, rojo, azul y violeta. Dentro de la familia de los flavonoides los pigmentos más importantes son las antocianinas que dan los colores rosa, rojo, azul y violeta en flores y frutas de la mayoría de las plantas. Estructuralmente son derivados glicosilados de aglicona y tienen máximos de absorción a 250 y 650nm²³.

Figura 3. Estructura general de algunos pigmentos naturales



(a) Clorofilas, **(b)** Carotenoides, **(c)** Flavonoides, **(d)** Betalainas. Fuente: Adaptado de KAIMAINEN (2014)

²² YAHIA, Elhadi, et al. Chemistry, stability and biological action of carotenoides. Fruit and vegetable En: Phytochemicals chemistry and nutritional value, and stabilit. 2 Ed. New York: Willey, 2010, p. 179-184.

²³ ORNELA-PAZ, Jose. Changes in external and internal color during postharvest ripening of manila and ataulfo mango fruit with flavonoid content determined by liquid chromatography-mass spectrometry. En: Postharvest Boil. Tech, 2008, vol. 50, p.145-152.

2.1.4. BETALAÍNAS

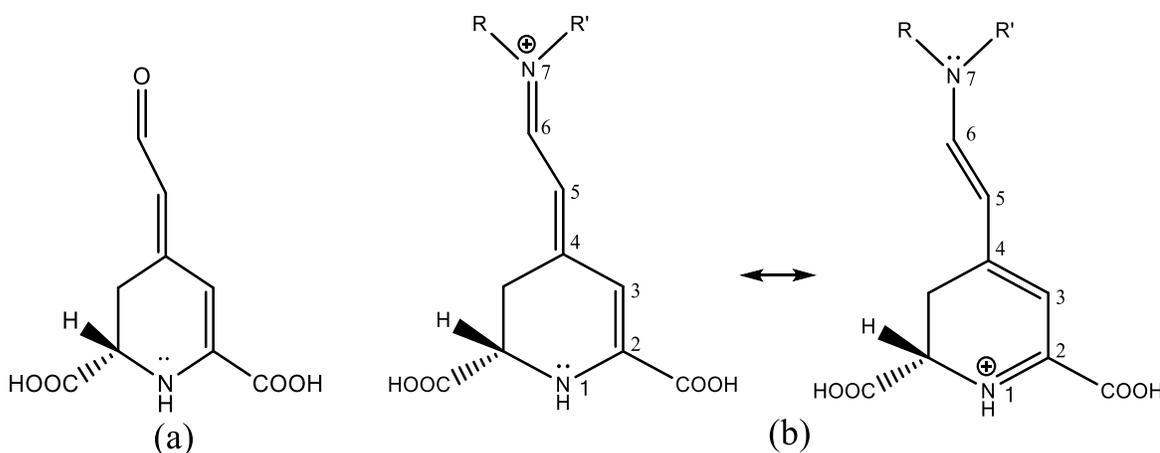
Son compuestos orgánicos, hidrosolubles que brindan colores amarillos, naranjas, rojos y violetas a algunas especies. En comparación con antocianinas, son escasos en la naturaleza y hasta el momento no se comprobado la presencia de antocianinas y betalainas en el mismo organismo, es decir, son mutuamente excluyentes²⁴. Las betalainas se encuentran en diferentes partes de la planta (raíces, frutos y flores) y se acumulan en las vacuolas celulares, principalmente en los tejidos epidérmicos y subepidérmicos²⁵.

2.1.4.1. Estructura

Las betalainas son pigmentos vegetales derivados iminados del ácido betalámico (figura 4a). La estructura general de estos pigmentos se basa en el cromóforo 1,7-diazoheptametinamino y su coloración se debe a los dobles enlaces conjugados en resonancia del núcleo aromático con dicho cromóforo²⁶.

Dependiendo de la sustitución en R y R' (figura 4b) existen dos grupos estructurales conocidos como betacianinas BC (coloración roja-violeta) y betaxantinas BX (coloración amarilla-naranja), que exhiben máximos de absorción cercanos a 540 y 480 nm, respectivamente²⁷. Las BC tienen un residuo ciclo-DOPA mientras que las BX tienen aminoácidos o aminas adicionadas en dicha posición.

Figura 4. Estructuras generales de: **(a)** ácido betalámico y **(b)** Betalainas, mostrando resonancia del cromóforo.



Fuente: Adaptado de DELGADO (2002)

²⁴ FENNEMA, Owen. Química de los alimentos. 2 Ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. 1126 p. ISBN: 978-84-200-1250-6

²⁵ BETANCOURT. Op. Cit., p.23.

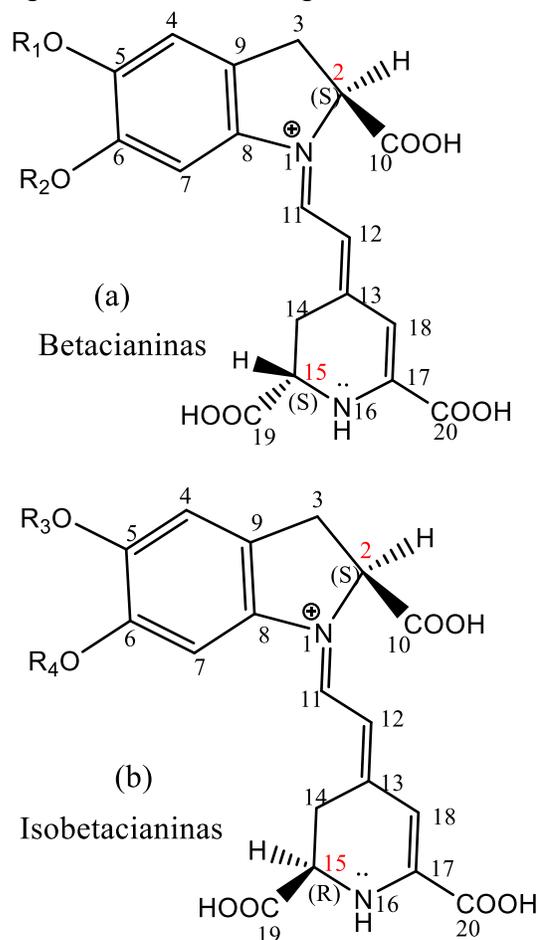
²⁶ BÖHM, Halm and RINK, Erick. Betalains, En: Cell cultura and somatic cell genetics of plants. New York: Academic Press. 1988, vol. 5. p. 449-463

²⁷ ORNELA-PAZ. Op. Cit., p.150

2.1.4.2. Betacianinas (BC).

Pigmentos rojo-violeta, producto de la condensación del ácido betalámico con el ciclo-DOPA (ciclo-3,4-dihidroxifenilalanina) o sus derivados glicosilados²⁸. Formados por una estructura base llamada betanidina la cual puede ser glicosilada y/o acilada. Las betacianinas son ópticamente activas por tener dos carbonos quirales en las posiciones C2 y C15²⁹. Con los diastereoisómeros betanidina (2S, 15S) y la isobetanidina (2S, 15R) y siguiendo patrones de glicosilación y acilación en la posición C5 o C6 se forman diferentes grupos de BC (figura 5).

Figura 5. Estructura general de las betacianinas



| | |
|----------------|--|
| Betanidina | R ₁ =H; R ₂ =H |
| Isobetanidina | R ₃ =H; R ₄ =H |
| Betaninas | R ₁ =glucosil o derivados y R ₂ =H |
| Isobetanas | R ₃ = glucosil o derivados ; R ₄ =H |
| Amarantinas | R ₁ = 2'-glucoronil glucosil/ derivados; R ₂ = H |
| Isoamarantinas | R ₃ = 2'-glucoronil glucosil /derivados; R ₄ =H |
| Gompreninas | R ₁ = H; R ₂ = Glucosil o derivados |
| Isogompreninas | R ₃ = H; R ₄ = Glucosil o derivados |

Fuente: Adaptado de KHAN (2015)

²⁸ STINTZING, Florian, et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones. En: J. Agric. Food Chem., 2005, vol. 53, p. 442-451.

²⁹ STINTZING, Florian; SCHIEBR, Andreas and CARLE, Reinhold. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. En: Eur Food Res Technol, 2001, vol. 212, p.396-407.

³⁰ DELGADO, Angélica. Betalainas del fruto de pitaya amarilla Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante in vitro. Trabajo de grado Química. Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de química, 2015. 120 p.

La unidad de azúcar más común en las BC es la glucosa, como en el caso de la betanina (betanidina-5-O- β -glucósido), y menos frecuentes son la soforosa y ramnosa³⁰. Es también común que se encuentren aciladas con grupos sulfuro, malonilo, 3-hidroxi-3-metilglutárico y ácidos hidroxicinámicos³¹. La mayoría de las BC se encuentran glicosiladas en la posición C5 y algunas veces en la C6, las primeras se conocen como betaninas y las segundas como gompreninas cuando la unidad de azúcar enlazada es la glucosa³².

La estructura básica de la betanina, en algunos casos se extiende a una molécula de ácido glucorónico unida a la posición 2' de la glucosa, este tipo de BC se conocen como Amarantinas (figura 5). En otros casos la estructura no posee el grupo carboxilo en la posición 2, por tanto, se conocen como 2-descarboxi-betalainas³³.

Las betacianinas presentan dos máximos de absorción, el primero debido a la estructura del ciclo-DOPA, en el rango UV entre 270 y 280nm, y el segundo en la región visible entre 530-550 nm. También pueden tener un tercer máximo alrededor de 330nm, esté debido a la acilación de algunas BC con ácidos hidroxicinámicos³⁴. El tipo de sustitución en la estructura base de la betanidina, determina la coloración de las diferentes BC y sus respectivos máximos de absorción. El desplazamiento batocrómico de las BC, en la región visible, de 50 a 70 nm en comparación con las BX se atribuye a que la resonancia electrónica se extiende a la estructura aromática del ciclo- DOPA³⁵.

Existe un grupo particular de BC, las neobetacianinas, que tienen características espectrales similares a las BX, es decir sus máximos de absorción están alrededor de 460-480nm. Este desplazamiento se debe a la deshidrogenación en las posiciones 14 y 15, por eso, las neobetacianinas no tienen el centro quiral C15 lo que las diferencian de todas las demás betacianinas. La neobetanina (figura6), por ejemplo, tiene color amarillo y $\lambda_{\text{máx}}$ cercano a 470nm³⁶. Así, estos pigmentos a pesar, de ser BC tienen colores amarillos y naranjas y no rojos ni violetas. Esta desprotonación generalmente puede deberse a la degradación termina u oxidación del aire de las betacianinas comunes, aunque también, las neobetacianinas pueden ser componentes propios de las plantas³⁷.

³¹ KHAN, Mohammad and GIRIDHAR, Parvatam. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: *Phytochemistry*, 2015, vol. 117, p. 267-295.

³² AZEREDO. Op. Cit., p.2365.

³³ ESATBEYOGLU, Tuba, et al. Betanin A food colorant with biological activity. En: *Mol. Nutr. Food Res.*, 2015, vol. 59, no. 1. p.36.

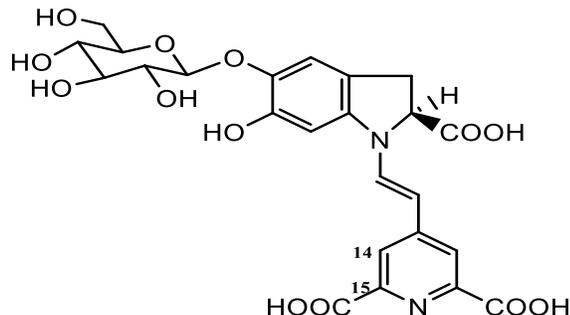
³⁴ STINTZING, Florian C and CARLE, Reinhold. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, vol. 15, no. 1, p. 24.34.

³⁵ HERBACH, Kirsten; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. En: *J. Food Sci.*, 2006, vol. 71, no. 4.

³⁶ HERBACH, Kirsten; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. En: *J. Food Sci.*, agosto, 2004b, vol. 69, no. 6, p. C491-C498

³⁷ SPORNA, Aneta, et al. Liquid chromatographic techniques in separation of betacyanins and their derivatives from red beet roots. En: *Chall. Mod.Technol.*, 2010, vol. 10, p. 19-22.

Figura 6. Estructura de la neobetantina.

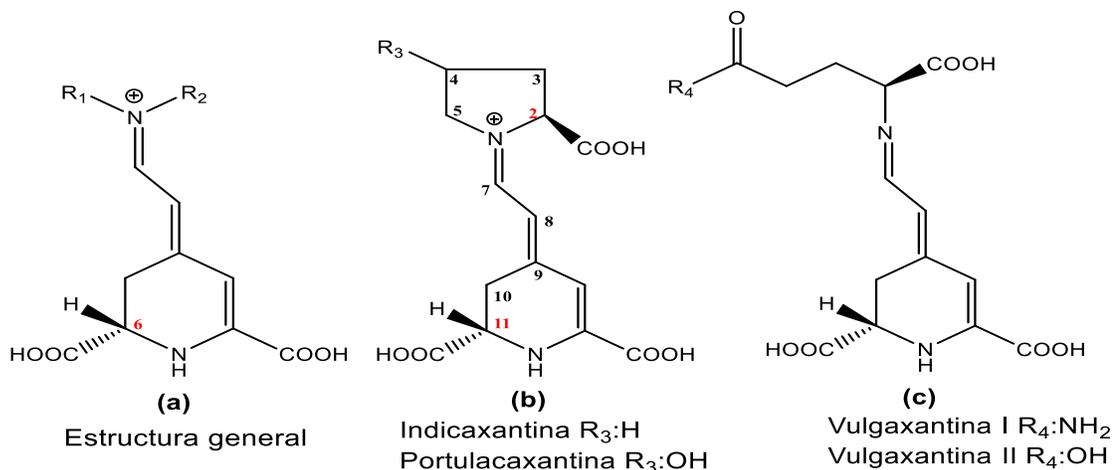


Fuente: Adaptado de WYBRANIEC y MIZRAHI (2005)

2.1.4.3. Betaxantinas (BX).

Pigmentos de color amarillo-anaranjado, son el producto de la condensación del ácido betalámico con diferentes aminoácidos o aminas³⁸. Su estructura básica se muestra en la (figura 7), donde el grupo R1 es usualmente un hidrógeno, excepto para la indicaxantina y portulacaxantina donde los grupos R1 y R2 forman una prolina e hidroxiprolina, respectivamente (figura 7b). Entre las BX más comunes están la vulgaxantina I (glutamina-betaxantina) y la indicaxantina (prolina-betaxantina)³⁹.

Figura 7. Estructura de betaxantinas.



*En (a): estructura general en (b) y (c): Estructura de BX más comunes. Fuente: Adaptado de KHAN (2015)

Las betaxantinas no incluyen a los grupos R1 y R2 en el sistema resonante por tanto sus absorbancias máximas son menores que en las betacianinas y están en el rango de 460-485 nm⁴⁰. Las BX tienen un centro quiral en C11 (figura 7b), lo que las hace ópticamente activas. La presencia de los epímeros (2S, 11S y 2S, 11R)

³⁸ STINTZING. 2005. Op. Cit., p.445

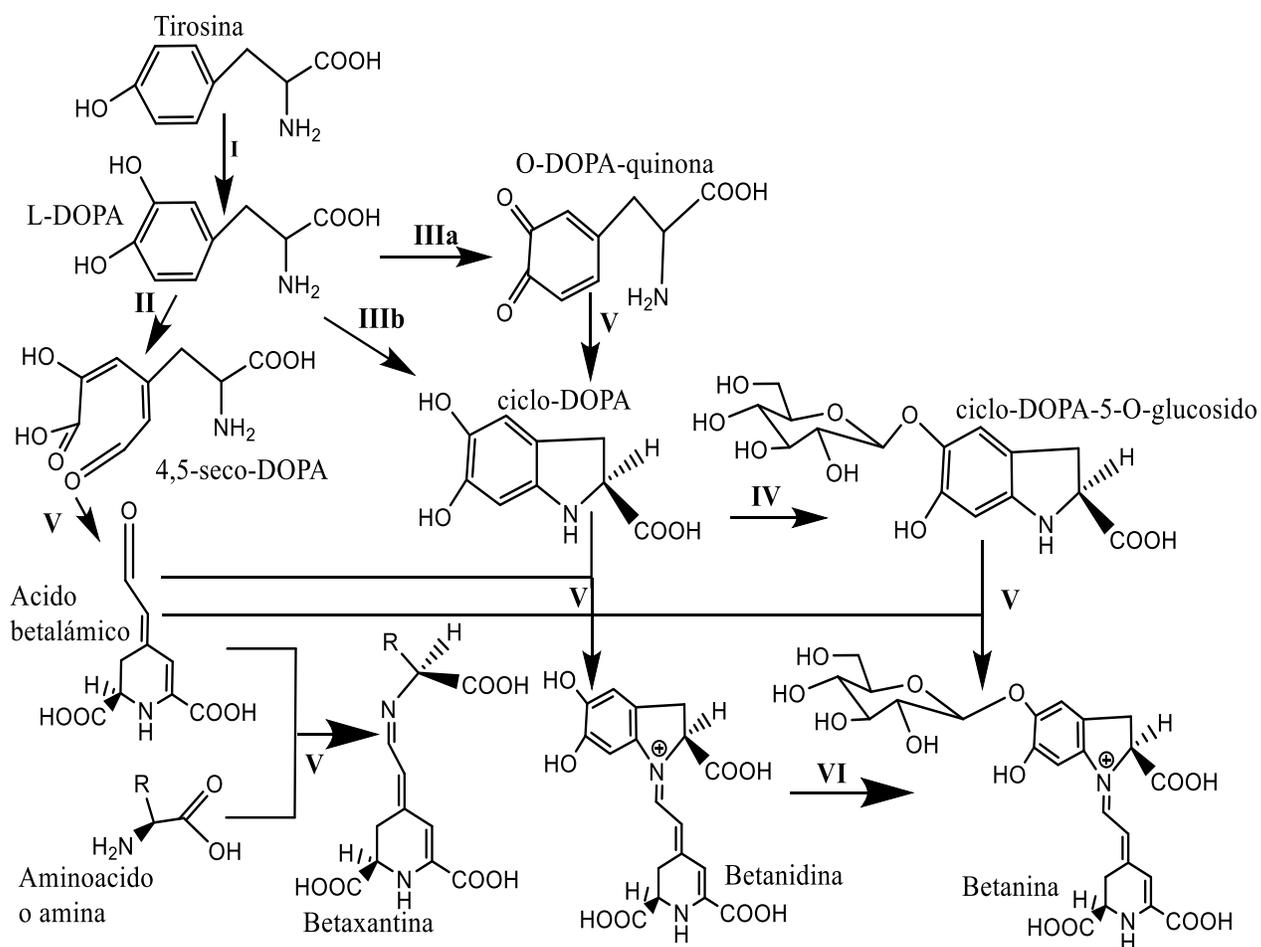
³⁹ GENGATHARAN, Ashwini; DYKES, Gary and CHOO, Wee. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. En: LWT-Food Sci. Techn., 2015, vol. 64, no. 2., p. 645-649

puede deberse a su formación natural en las plantas, aunque también se reporta que se pueden presentar de manera *in vitro*⁴¹.

2.1.4.4. Biosíntesis

La biosíntesis de betalínas aún no se ha caracterizado por completo, pero hasta el momento se sugiere que se derivan de la tirosina siguiendo una ruta biosintética que involucra diferentes enzimas⁴².

Figura.8 Biosíntesis de betalínas



* I tirosina hidroxilasa, II DOPA-4,5-dioxigenasa, IIIa tirosina en presencia de O₂, IIIb citocromo P450 (CYP76AD1), IV ciclo-DOPA-5-O-glucosiltransferasa, V reacción espontánea, VI betanidina-5-O-glucosiltransferasa. Fuente: Adaptado de ESATBEYOGLU (2015) y SAKUTA (2014)

⁴⁰ STINTZING. 2005. Op. Cit., 445

⁴¹ BETANCOURT. Op. Cit., p. 39.

⁴² GARCÍA, Verónica. Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia stricta*. Trabajo de grado Ingeniera Química. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, 2008. 132 p.

Inicialmente la L-tirosina sufre una hidroxilación, formando L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), proceso catalizado por la tirosinasa. Luego por acción de la DOPA-4,5-dioxigenasa se forma 4,5-seco-DOPA, que se reorganiza espontáneamente a ácido betalámico. La formación de betaxantinas ocurre a partir de la condensación de ácido betalámico con aminas o aminoácidos⁴³. Para la formación de betacianinas, el ácido betalámico se une con el ciclo-DOPA, el cual se forma a partir de L-DOPA mediante una reacción de oxidación, pasando por un intermediario inestable O-DOPA-quinona que se cicla espontáneamente para formar ciclo-DOPA⁴⁴. Las BC son generalmente O-glicosiladas en el C5 o C6 y con frecuencia luego son aciladas, la glicosilación puede ocurrir en el ciclo-DOPA o en la betanidina⁴⁵.

En cuanto la biosíntesis de las 2-descarboxibetacianinas, se ha propuesto una ruta a partir de la condensación del ácido betalámico y 2-descarboxi-ciclo-Dopa, seguido de la glicosilación y acilación⁴⁶.

2.1.4.5. Estabilidad de las betalaínas

La estabilidad del color es un factor importante que puede restringir el uso de pigmentos naturales en la industria, estos deben ser estables a factores como temperatura, luz, oxígeno, pH, entre otros.

Para que un pigmento pueda usarse en procesos industriales deben considerarse ciertas características que pueden aumentar su estabilidad⁴⁷, como: alto grado de glicosilación y acilación, pH menor a 7, baja temperatura, oscuridad, atmósfera de nitrógeno, baja actividad del agua. Por el contrario, bajo grado de glicosilación y acilación, alta actividad del agua, alta temperatura, luz, oxígeno y presencia en la matriz de enzimas degradantes del pigmento, disminuirán la estabilidad del mismo^{48, 49}.

En un rango de pH entre 4-8, las betalaínas son más estables⁵⁰. A pH menores a 3 se presenta pérdida del color y se observan desplazamientos hipsocrómico en los máximos de absorción tanto para BC como en BX⁵¹.

⁴³ KOBAYASHI, Naoko, et al. Betalains from Christmas cactus. En: *Phytochemistry*, 2000 vol. 54, p. 419-426.

⁴⁴ HARRIS. Op. Cit., p.2

⁴⁵ SAKUTA, Masaaki. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. En: *Plant biotechnol. Rep.*, 2014, vol. 8, no. 1, p. 41.

⁴⁶ KOBAYASHI, Naoko, et al. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. En: *Phytochemistry*, 2011, vol. 56, no. 5, p. 429-436.

⁴⁷ SOCACIU, Carmen. *Food Colorants. Chemical and Functional Properties*. FL: CRC Press, New York: Taylor & Francis Group. 2008, p. 286

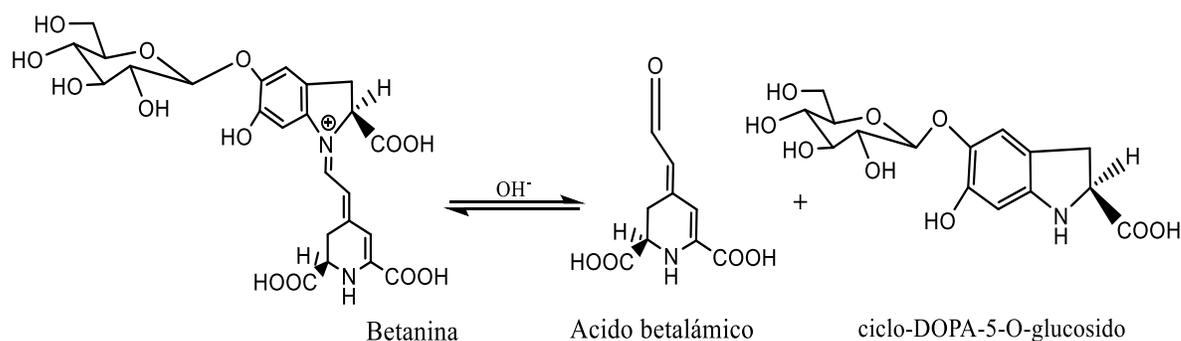
⁴⁸ HERBACH. 2006. Op. cit., p. R42

⁴⁹ SINGER, J y VON ELBE, J. Degradation rates of vulgaxanthine I. En: *J. Food Sci.*, 1980, vol.45, no. 3, p. 489-491.

⁵⁰ STINTZING. 2004 Op. Cit., p. 24.

En medio básico, el enlace imina se rompe (figura 9) para formar ácido betalámico y ciclo-DOPA(betacianinas) o compuestos amino (betaxantinas)⁵², generando también pérdida del color y desplazamiento de sus máximos de absorción.

Figura 9. Hidrólisis básica de la betanina



Fuente: Adaptado de HERBACH (2004)

La actividad del agua y altas temperaturas también perjudican la estabilidad de las betalainas, pudiéndose presentar escisión del enlace imino al igual que en la hidrólisis en medio alcalino⁵³. Un mayor contenido de agua aumenta la solubilidad del oxígeno, lo que disminuye la estabilidad, pues la reacción entre las betalainas y oxígeno molecular es una de las principales causas de la pérdida de color⁵⁴. La degradación térmica de las betalainas ha sido estudiada por autores como Sánchez (2006)⁵⁵, quien afirma que al calentar betanina la coloración se torna marrón, concluyendo que a temperaturas mayores de 80°C se favorece la degradación^{56, 57}.

2.1.4.6. Actividad antioxidante

La principal característica de un compuesto antioxidante es la estabilización de un radical y la regeneración del antioxidante radicalario⁵⁸. Los radicales libres y otras

⁵¹ SOCACIU. Op. Cit., p. 286.

⁵² HERBACH, Kirsten; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. En: Eur. Food Res. Techn., septiembre, 2004a, vol. 219, no. 4, p. 377-385.

⁵³ HERBACH. 2006. Op. cit., p. R42

⁵⁴ AZEREDO. Op. Cit., p. 2365.

⁵⁵ SANCHEZ, Noé. Extracción y caracterización de los principales compuestos de *Opuntia xocconostle*, Tesis maestría. México: Centro de investigación en ciencias aplicadas y tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional, 2006.p. 107.

⁵⁶ SOCACIU. Op. Cit., p. 286.

⁵⁷ STINTZING. 2007. Op. cit., p. 514-515.

⁵⁸ NAMIKI M. Antioxidants/antimutagens in food. En: Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1990, vol. 29, no 4., p. 273-300

especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) se producen como un efecto secundario del metabolismo oxidativo o por razones exógenas como el alcohol, cigarrillo, radiación UV y diferentes contaminantes⁵⁹. Las ROS y RNS son moléculas que tienen oxígeno y nitrógeno, respectivamente, que puede estar en forma de radical libre o no, como el peróxido de hidrogeno H₂O₂, superóxido O₂^{-*} y el radical hidroxilo OH. Cuando hay un exceso de radicales se genera en la célula el estrés oxidativo, que es el desequilibrio entre la producción y destrucción de ROS y RNS. Cuando esto ocurre se empiezan a oxidar importantes macromoléculas como los lípidos de membranas, las proteínas, enzimas y ADN, causando efectos nocivos en la célula e incluso apoptosis y se desencadenan enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro ⁶⁰.

La célula tiene sustancias antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo (antioxidantes endógenos) pero además existen antioxidantes exógenos como vitamina E, vitamina C y los pigmentos naturales presentes en las plantas⁶¹. Las betalaínas tienen la capacidad de captar radicales libres, se sugiere que dicha característica tiene relación con su estructura y aumenta cuando hay mayor número de grupos hidroxilo e imino⁶². De acuerdo a varios autores utilizando el método DPPH se ha encontrado que las BC y BX presentan una actividad antioxidante aproximadamente 3-4 veces mayor en comparación con el ácido ascórbico^{63,64}. Por su parte, con el ensayo TEAC se demostró que a pH > 4 la betanina tiene una actividad antioxidante 2 veces mayor que algunas antocianinas⁶⁵. Sin embargo, se debe considerar que estos ensayos no son específicos y que la capacidad antioxidante de extractos ricos en betalaínas se puede deber a la presencia de otros compuestos presentes en el medio⁶⁶. Se ha demostrado también que las betacianinas tienen una mayor actividad antioxidante que las betaxantinas^{67, 68}, pero en general se resaltan los beneficios para la salud por parte de los pigmentos betalaínicos.

⁵⁹ HAYEK, Saeed and IBRAHIM, Salam. Antimicrobial activity of xoconostle pears (*Opuntia matudae*) against escherichia coli. Laboratory medium. En: Int. J. Microbiol., 2012, vol. 2012.

⁶⁰ Ibid. p.3

⁶¹ KHAN, Mohammad. Stabilization of betalains: A review. En: Food Chem., 2016, vol. 197, p. 1281-1282.

⁶² CAI, Yizhong; SUN, Mei and CORKE, Harold. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. En: J. Agric. Food Chem., 2003, vol. 51, no. 8., p. 2288-2294.

⁶³ KHAN. 2016. Op. Cit., p.1282.

⁶⁴ MOSQUERA. Op. Cit., p.69.

⁶⁵ GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A.; SZYMUSIAK, H. and MALINOWSKA, P., Betanin, the main pigment of red beet: molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. En: Food Addit. Contam., 2006, vol. 23, p. 1079-1087.

⁶⁶ POMPELLA, Alfonso, et al. The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. En: Nutrition, 2014, vol. 30, no. 7, p. 791-793.

⁶⁷ BUTERA, Daniela, et al. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. En: J. Agric. Food Chem., 2002, vol. 50, no. 23., p. 6895-6901.

⁶⁸ ESCRIBANO, Josefa, et al. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. En: Phytochem. Anal., 1998, vol. 9, no. 3, p. 124-127.

2.1.5. Técnicas de Análisis de Betalaínas

2.1.5.1. Extracción de betalaínas.

Previo a la extracción de pigmentos naturales el material vegetal se debe preparar, frecuentemente se lava, pela, seca y pulveriza. El proceso de extracción depende de factores como el tamaño de partícula de la muestra y los solventes usados, por esto es aconsejable emplear partículas finas ya que se incrementa el área superficial, facilitando la ruptura de la pared celular y mejorando la extracción⁶⁹. La elección del solvente dependerá de varios factores como miscibilidad, selectividad, precio, estabilidad térmica y química, entre otros. Las betalaínas usualmente son extraídas con agua o agua acidificada con HCl 0,1%⁷⁰ y en la mayoría de los casos se usa metanol o etanol que completan la extracción y facilitan la separación entre los pigmentos y proteínas co-extraídas, que pueden interferir en posteriores análisis⁷¹.

Existen varios métodos de extracción para pigmentos naturales, siendo el sólido-líquido el que se usa con mayor frecuencia⁷². La maceración química es una técnica tradicional y muy utilizada para pigmentos tipo betalaínas. Consiste en poner en contacto el material vegetal con el solvente de extracción, este se difunde en la muestra, las betalaínas se solubilizan y la fase líquida enriquecida del pigmento se difunde fuera, durante el procedimiento se recomienda agitación para aumentar la velocidad de la extracción⁷³.

La extracción asistida con ultrasonido, es otra técnica útil y muy usada para aislar compuestos. Las muestras se ponen en contacto con solventes en un recipiente cerrado dentro de un equipo conocido como sonicador, donde una corriente eléctrica transmite su energía a un sistema mecánico que la convierte en vibraciones de alta intensidad que generan ondas de ultrasonido⁷⁴. Las ondas generan, a su vez, burbujas microscópicas en el solvente de extracción, estas burbujas sufren procesos de expansión y colapso y así se transmite su energía al material vegetal, que rompe sus membranas externas y permiten que el solvente entre en contacto con los compuestos

⁶⁹ ROSERO, Johanna. Extracción y Caracterización de los Principios Activos Fenólicos con Actividad Antioxidante a partir de Residuos de Aguacate: Epicarpio y Semilla (*Persea americana*). Trabajo de grado Química. Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2017. 153 p.

⁷⁰ DELGADO, Francisco; JIMÉNEZ, Alfredo and PAREDES, Octavio. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. En: Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2000, vol. 40, no. 3., p. 176.

⁷¹ CAI, Yizhong; SUN, Mei and CORKE, Harold. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in Amaranthaceae. En: J. Agric. Food Chem., 2001, vol. 49, p. 1971-1978.

⁷² EDER, Reinhard. Pigments. En: NOLLET, Leo M.L. Food analysis by HPLC. 2 Ed. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 2012. 826 p.

⁷³ Ibid., p.826.

⁷⁴ CORONA, Edith, et al. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) y su actividad antioxidante. En: Agrociencia, 2016, vol.50, no.4., p.67.

de interés, y los pigmentos disueltos son difundidos por fuera del material vegetal ⁷⁵.

2.1.5.2. Separación y purificación

Al extraer las betalaínas con solvente acuosos se hace necesaria una purificación, pues se genera co-extracción de azúcares, proteínas, y demás compuestos hidrosolubles presentes en la matriz. Compuestos como proteínas y mucilagos se eliminan mediante precipitación etanólica⁷⁶ y también se puede realizar una fermentación aerobia para reducir químicamente los azúcares libres⁷⁷. Se ha reportado que se puede purificar betalaínas con cromatografía en columna (CC), utilizando resinas como Amberlita XAD-7^{78,79} que es una resina medianamente polar, formada por polímeros acrílicos y ayuda a separar moléculas polares como azúcares y solutos de bajo peso molecular por tener menor fuerza de adsorción en la fase estacionaria⁸⁰. También se puede usar Sephadex G-25, una resina que permite eliminar polisacáridos, polipéptidos, proteínas globulares y ácidos nucleicos y a la vez ayuda a fraccionar betalaínas⁸¹.

Para la separación de betalaínas en betacianinas y betaxantinas se han utilizado métodos como la electroforesis y técnicas cromatográficas. La cromatografía en capa delgada permite detectar la presencia de BX y BC gracias a que los pigmentos amarillos y rojos pueden observarse sin necesidad de reveladores⁸². Sin embargo, esta no es la técnica preferida para separar betalaínas, generalmente se usan placas revestidas de celulosa y debido a la polaridad de los pigmentos, los factores de retención (Rf) son bajos, generando unas separaciones inadecuadas⁸³.

En la cromatografía en columna (CC), se han utilizado varios tipos de resinas, no sólo para la purificación sino también para la separación de betalaínas en BC y BX. El soporte más utilizado en la separación es la C-18 y utilizando mezcla de solventes como agua- metanol y agua-acetonitrilo, se facilita la separación de las BX que eluyen antes que las BC⁸⁴.

⁷⁵ LAQUI-VILCA, Cesar, et al. Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) hulls. *Ind. Crops Prod.*, 2018, vol. 111, p. 606-614.

⁷⁶ STINTZING, Florian; SCHIEBER, Andreas and CARLE, Reinhold. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *En: J. Agric. Food Chem.*, 2002b, vol. 50, no. 8, p. 2303.

⁷⁷ AZEREDO. *Op. Cit.*, p.2367

⁷⁸ KUNIN, Robert. The use of macroreticular polymeric adsorbents for the treatment of waste effluents. *En: Macromol. Chem. Phys.*, 1975, vol. 11, p. 206.

⁷⁹ DELGADO. 2000. *Op. Cit.*, p.48

⁸⁰ *Ibid.*, p. 48

⁸¹ SANCHEZ-GONZALEZ, Noe, et al. Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *En: J. Agric. Food Chem.*, 2013, vol. 61, no. 49, p. 11995- 12004.

⁸² DELGADO. 2000. *Op. cit.*, p. 262.

⁸³ SANCHEZ. 2006. *Op. Cit.*, p. 107

2.1.5.3. Cuantificación e identificación de betalaínas.

La cuantificación de los pigmentos se basa en las propiedades fotométricas de estos compuestos, según las cuales absorben luz en diferentes regiones del espectro visible (BX en el rango de 460-480nm y BC 530-550nm). Debido a que el entorno del pigmento puede influir considerablemente en la posición del máximo de absorción y la forma del espectro, la medición precisa de la concentración requiere que el pigmento se disuelva en un disolvente para el cual el coeficiente molar haya sido determinado, es el caso del agua^{85,86}.

Además, la espectrofotometría UV-visible genera el espectro de absorción mediante la absorción selectiva de la radiación UV y ayuda a proporcionar información fundamental para la determinación de la composición química, la estructura y propiedades de las betalaínas⁸⁷.

La cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC (por sus siglas en inglés) es muy usada en el estudio de betalaínas, se puede acoplar a detectores como MS (espectrometría de masas) y/o RMN (resonancia magnética nuclear) permitiendo la separación e identificación simultánea. Usualmente en HPLC se usan soportes de fase reversa (columnas C18) y con tamaños de partícula entre 3 y 10 μm ⁸⁸. La elución se hace con un gradiente lineal con agua acidificada con ácido fórmico o acético y como fase orgánica se emplea acetonitrilo o metanol⁸⁹.

En HPLC, la presencia de BX y BC se puede detectar alrededor de 480nm y 540nm, respectivamente. Las BX eluyen antes que las BC en HPLC en fase reversa,⁹⁰ y en la mayoría de los casos se identifican las formas isoméricas de las betacianinas (2S, 15S y 2R, 15R) que difieren en sus t_r , siendo las isobetacianinas (2S, 15R) mayormente retenidas por la fase estacionaria⁹¹.

El HPLC-MS es útil para análisis en mezclas complejas como los extractos, porque separa e identifica, el método de ionización más empleado es la ionización por electrospray (ESI) en modopositivo⁹².

⁸⁴ GONZALEZ, Álvaro. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. España: El Sevier, 2010.p 25

⁸⁵ SANCHEZ. 2013. Op. Cit., p. 11995.

⁸⁶ STINTZING, Florian; SCHIEBER, Andreas and CARLE, Reinhold. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. En: Eur. Food Res. Techn., 2003.vol. 216, p. 303-311

⁸⁷ DELGADO-VARGAS, Francisco, and PAREDES, Octavio. The color phenomenon. En: Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 28-29

⁸⁸ MARTINEZ, Joaquin, et al. Experimentación Química general. 5 Ed. Madrid: Thomson ediciones, 2009, 172 p. ISBN: 9788497324250

⁸⁹ OBÓN, Concepción and RIVERA, Diego. Plant Pigments and their manipulation. En: Economic Botany, 2006, vol. 60, no. 1, p. 92-92

⁹⁰ STRACK, Dieter; VOGT, Thomas and SCHLIEMANN, Willibald. Recent advances in betalain research. En: Phytochemistry, 2003, vol.62, n. 3, p. 247-269.

⁹¹ PIRES Letícia, et al. A comparative study of the purification of betanin. En: Food Chem., 2012, vol. 131, no. 1, p. 234.

Los espectros de masas brindan información sobre el compuesto principal y residuos químicos o fragmentos. También la RMN permite obtener detalles sobre la estatura molecular de los pigmentos, la RMN-¹H y técnicas bidimensionales proporcionan información valiosa sobre los desplazamientos y constantes de acoplamiento de las betalainas más comunes como la betanina e indicaxantina⁹³.

La evidencia estructural inequívoca solo puede ser encontrada con RMN, pero la identificación tentativa de los compuestos se basa en una comparación de los tiempos de retención (*t_r*), espectros UV-visible y los espectros de masas, con patrones y algunos datos publicados⁹⁴.

2.1.5.4. Cuantificación del contenido fenólico

Para la determinación de fenoles totales existen varios métodos espectrofotométricos, pero uno de los más empleados es el de Folin-Ciocalteu⁹⁵, desarrollado en 1927 y cuyo fundamento es la oxidación de compuestos fenólicos por óxidos de molibdeno y tungsteno en medio básico⁹⁶. En 1965 el método fue mejorado por Singleton y Rossi, quienes usaron un reactivo heteropolianión molibdotungstosfosfórico, conocido actualmente como reactivo de Folin-Ciocalteu. La reacción en medio básico permite la transferencia de electrones y reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotungsténico a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23})⁹⁷ que tienen un máximo de absorción a 765nm. La cuantificación de los fenoles en la muestra se determina usando una recta de calibrado usando un patrón de ácido gálico, la intensidad del color es proporcional a la concentración de fenoles⁹⁸.

⁹² DAVIS, Kevin. Annual plant reviews. En: Plant, pigment and their manipulation. New York: John Wiley & Sons, 2009, vol. 14, p. 328-331.

⁹³ *Ibid.* p.330.

⁹⁴ YEDDES, Nazzir, et al. Comparative study of antioxidant power, Polyphenols, Flavonoids and betacyanins of the peel and pulp of three Tunisian Opuntia Forms. En: Antioxidants, 2013, vol. 2, no 2., p. 37,51.

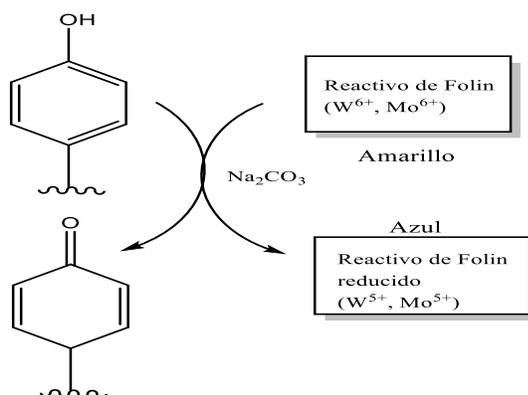
⁹⁵ FOLIN, Otto and CIOCALTEU, Vintila. Tyrosine ando Tryptophan determination in proteins. En; J. Biol. Chem., 1927, vol. 73, p. 637-650.

⁹⁶ *Ibid.* p.640.

⁹⁷ SEEJA, N., et al. Investigation of total phenolic contents, antioxidant activities and analyses of active compounds in some sweet peppers (*Capsicum annuum L.*). En: NU Sci. J., 2014, vol. 11, no. 1, p. 40.

⁹⁸ ROVER, Marjorie and BROWN, Robert. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. En: J. Anal. Appl. Pyrolysis, 2013, vol. 104, p. 367.

Figura 10 Reacción de fenoles con reactivo de Folin-Ciocalteu



Fuente: Adaptado de GARCÍA (2015)

2.1.5.5. Métodos para determinación de la capacidad antioxidante.

Una buena alternativa para prevenir el daño por los radicales libres es la adición de antioxidantes en los alimentos, de modo que las betalainas no solo aporten color, sino que pueden ser benéficas para la salud. Una de las estrategias más aplicadas para evaluar la actividad antioxidante total de un compuesto es determinar su actividad frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical o catión radical. Se distinguen algunos métodos importantes para determinar la actividad antioxidante frente a radicales libres de manera *in vitro*:

2.1.5.5.1. Método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox).

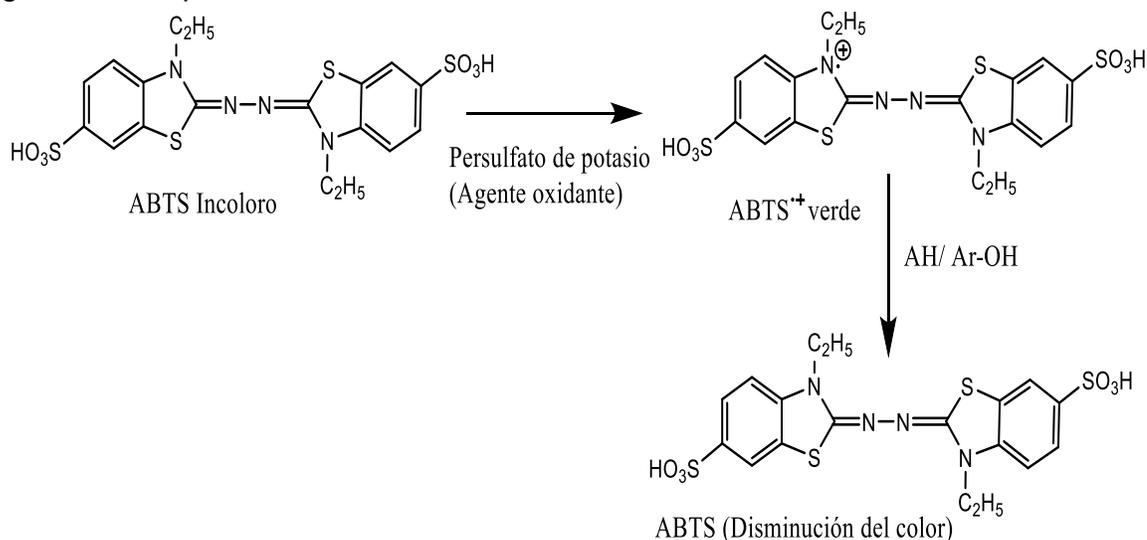
Se desarrolló para analizar la actividad antioxidante del plasma humano ⁹⁹. La técnica se fundamenta en la eliminación que tiene un antioxidante frente al catión radical de larga duración ABTS^{•+} (ácido 2,2 –azino-bis (3etilbenzotiazolina)-6-sulfónico), este se forma directamente por la oxidación del ABTS al someterlo a reacción con persulfato de potasio u otros oxidantes y se caracteriza por tener una coloración azul-verdosa con varios máximos de absorción a 415, 645, 734 y 815 nm¹⁰⁰. El seguimiento espectrofotométrico se hace 734nm y se observa la disminución de la absorbancia del radical en presencia del antioxidante a un tiempo dado. Esta decoloración se compara con la decoloración de un patrón

⁹⁹ CRAFT, Brian, et al. Phenol-based Antioxidants and the *in vitro* Methods Used for Their Assessment. En: Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2012, vol. 11, no 2., p. 161.

¹⁰⁰ PRIOR, Ronald; WU, Xianli and SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. En: J. Agric.Food Chem., 2005, vol. 53, p. 4297.

derivado de la vitamina E, conocido como Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico), mediante una curva de calibración, así los resultados se expresan en relación al Trolox¹⁰¹.

Figura 11. Esquema reacción con ABTS



Fuente: Adaptado de PRIOR (2005)

2.1.5.5.2. Método DPPH

Este método, fue desarrollado por Brand-William y se basa en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes frente al radical DPPH• (*2,2-difenil-1-picrilhidrazilo*)¹⁰². El mecanismo de reacción se basa en una transferencia de hidrogeno, por eso la capacidad de eliminar el radical está fuertemente influenciada por el solvente y el pH de la reacción¹⁰³. A diferencia del ABTS•+, el DPPH• está disponible comercialmente y es uno de los pocos radicales orgánicos de nitrógeno estable, su coloración es morada y por acción del antioxidante dicho radical se reduce a su correspondiente hidrazina de color amarillo palido¹⁰⁴. La capacidad antioxidante se evalúa con la medición espectrofotométrica de la pérdida de color del DPPH• a 515 nm después de la reacción con los pigmentos.

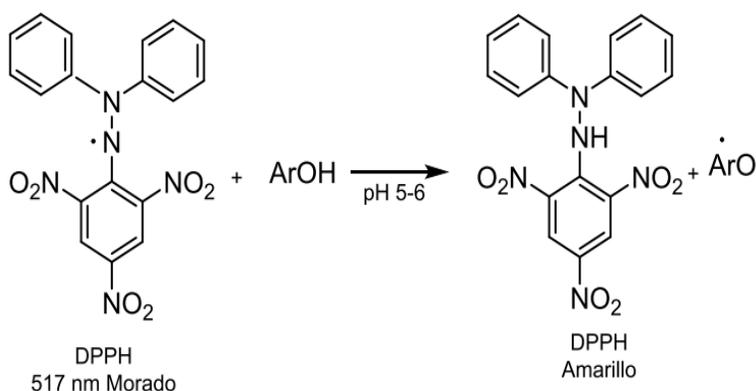
¹⁰¹ CRAFT. Op. Cit., p.162.

¹⁰² BRAND-WILLIAM, Mery; CUVÉLIER, Erik and BERSET, Carl. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: LWT-Food Sci. Techn., 1995, vol. 28, no. 1., p. 25-30.

¹⁰³ PRIOR. Op. cit., p. 4295.

¹⁰⁴ ALAM, Nur; JAHAN, Nusrat and RAFIQUZZAMAN, Md. ad. En: Saudi Pharm. J., 2013, vol. 21, no.2., p.143-152

Figura 12. Reacción del DPPH.



Fuente: ALAM (2012)

2.1.5.5.3. Método FRAP (Poder antioxidante en la reducción férrica).

Es un método colorimétrico que permite evaluar de forma total el potencial reductor atribuible a las especies antioxidantes, basado en la determinación de la concentración final de los iones Fe^{2+} , formados por reducción de iones Fe^{3+} . Fue desarrollado inicialmente por Benzie et al., (1996), para evaluar el poder antirradical en el plasma sanguíneo usando 2, 4,6-tripiridil-S-triazina como cromógeno¹⁰⁵. Más adelante se realizaron modificaciones como el método de Hinneburg¹⁰⁶, que utiliza ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) como sustancia cromógena¹⁰⁷, la cual cambia de coloración roja a azul-verdoso por la reducción del hierro. El cambio de color de la solución se mide a una longitud de onda de 700 nm, la coloración azul-verdosa formada es proporcional al poder reductor.

2.1.5.6 Colorimetría triestímulo

El color se puede definir como las longitudes de onda de luz del espectro visible (380nm-770nm) que son detectadas por la retina del ojo humano¹⁰⁸.

¹⁰⁵ BENZIE, Iris and STRAIN, Jorget. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. En: Anal. Biochem., 1996.vol 239, p. 70-76.

¹⁰⁶ HINNEBURG, Iris; DORMAN, Damien and HILTUNEN, Raino. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. En: J. Agric. Food Chem., 2006, vol. 97, p. 122-129.

¹⁰⁷ CRAFT. Op. Cit., p.161.

¹⁰⁸ PHEBE, Ding, et al. Red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit colour and betacyanin content depend on maturity. En: Int. Food Res. J., 2009, vol. 16, p. 233-242.

La percepción del color de un objeto depende de varios factores, entre ellos: la fuente de luz, la reflexión o transmisión de la luz y también del observador, pero sin lugar a duda, todos los colores detectados por el ojo humano están asociados a una longitud de onda de luz. El color azul-violeta corresponde a valores de absorbancia entre 380 y 480 nm, el verde corresponde a 480-560 nm, amarillo entre 560 y 590 nm, naranja 590-630 nm y el rojo entre 630-750 nm^{109, 110}.

La colorimetría triestímulo es la rama de la ciencia que estudia la especificación numérica del color¹¹¹, esta reproduce matemáticamente la fisiología de la visión humana y permite la comparación con el análisis sensorial, generando múltiples aplicaciones en la industria¹¹². Productos como textiles, pinturas, cosméticos, entre otros, se generan en grandes lotes y, a menudo, se busca replicar sus colores de manera idéntica. En otros casos, los fabricantes requieren producir un color particular con coordenadas de color en ciertas tolerancias; de esta manera la colorimetría es esencial en el control de calidad¹¹³.

Entre diferentes espacios de color existentes (CIEXYZ, CIEUVW, CIELUV, CIELab) CIELab es el más usado y recomendado para aplicaciones industriales. Las leyes que rigen la generalización cromática se pueden expresar de forma geométrica, considerando el espacio vectorial de tres dimensiones denominado Espacio Triestímulo CIELab (CIE L^* a^* b^*), que es un espacio de color especificado por la Comisión Internacional de Iluminación, que describe todos los colores visibles para el ojo humano y fue creado para servir como un modelo, que independiente del dispositivo pueda ser utilizado como referencia¹¹⁴.

CIELab (figura 13) indica los valores del color con tres ejes: L^* , a^* y b^* . El eje vertical central representa la luminosidad (L^*) y de acuerdo a este atributo, cada color es equivalente a un miembro en la escala de grises, entre negro ($L^*=0$) a blanco ($L^*=100$), es decir es una medida de la claridad del color. Los ejes de color se basan en el hecho de que un color no puede ser rojo y verde, ni amarillo y azul al mismo tiempo, porque estos colores son opuestos entre sí. En el eje a^* , los valores positivos indican cantidades de rojo, mientras que los valores negativos indican cantidades de verde. En el eje b^* , el amarillo es positivo y el azul es negativo, y para los dos ejes, cero corresponde al gris neutro¹¹⁵.

¹⁰⁹ DELGADO-VARGAS. 2002. Op. cit. p.29.

¹¹⁰ SCHANDA, J. Colorimetry: Understanding the CIE system. 2 Ed. New York: Wiley. Wyszecki G and Stiles WS, 1982. 408 p. ISBN: 978-0-470-04904-4

¹¹¹ TECHNICAL GUIDES. . [En línea]. 2010. [20 marzo 2021. Disponible en: <Recuperado de http://dba.med.sc.edu/price/irf/Adobe_tg/models/cielab.html>.

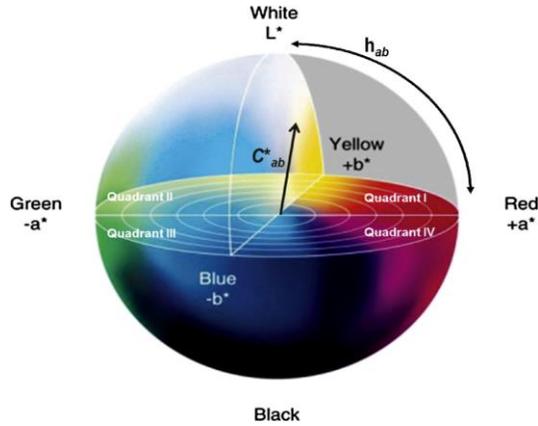
¹¹² BERNIS, Roy; BILLMEYER, Robert and SALTZMAN'S, Sam. Principles of Color Technology. 2 ed. New York: Wiley, 1981. 272 p. ISBN: 978-1-119-36668-3

¹¹³ JUDD, Deane and WYSZECKI, Gunther. Colour in Business, Science and Industry, 3 Ed. New York: Wiley. 1975. 856 p. ISBN: 978-0471452126

¹¹⁴ ZHU, Fan; et al. Influence of *Amaranthus* Betacyanin Pigments on the Physical Properties and Color of Wheat Flours. En: J. Agric. Food Chem., 2008, vol. 56, p. 8212-8217.

¹¹⁵ SANT'ANNA, Voltaire, et al. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods, a review. En: Dyes and Pigments, 2013, vol. 98, p. 601-608.

Figura 13. Representación espacio CIELab



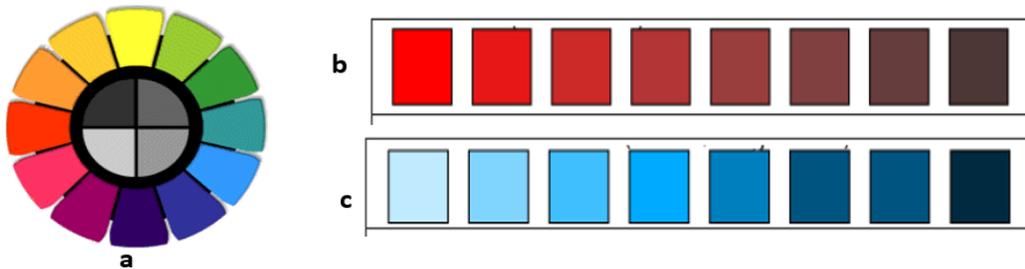
Fuente: SANT'ANNA. (2013)

La clasificación de los colores de acuerdo al espacio CIELab también puede hacerse en coordenadas cilíndricas de luminosidad (L^*), cromía o saturación (C^*_{ab}) y tono o matiz (h^*_{ab})¹¹⁶, características que se muestran en la (figura 14). El tono es una característica, mediante la cual se puede definir tradicionalmente los colores ejemplo: el rojo, amarillo, naranja, etc. El ángulo de tono siempre se mide en sentido contrario a las agujas del reloj desde el eje a^* positivo, así los valores de h^*_{ab} varían desde 0° (eje a^* , rojo), 90° (eje b^* , amarillo), 180° (eje $-a^*$, verde), 270° (eje $-b^*$, azul), hasta 360° (eje a^*).

El cromía (C^*_{ab}) se calcula como se muestra en la ecuación 1 y brinda información sobre la pureza de los colores, mientras más saturado el color (mayor cromía), más puro es y más brillante se lo percibe.¹¹⁷

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Figura 14. Atributos de color



*En **a**: matiz o tono, **b**: ejemplo de saturación, **c**: ejemplo de luminosidad del color. Fuente: Adaptado de LA NUBEARTISTICA.es

¹¹⁶ *Ibid.*, p. 265

¹¹⁷ BILLMEYER. *Op. Cit.*, p.

La diferencia de color (ΔE_{ab}^*) para dos colores se calcula con los valores de L^* , a^* y b^* , usando la ecuación 2 y representa el cálculo de la distancia Euclidiana entre dos puntos en el espacio tridimensional CIELab.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde $\Delta L^* = L^* (\text{final}) - L^* (\text{inicial})$, Δa^{*2} y Δb^{*2} representan el cambio en las coordenadas de color de una muestra antes de un tratamiento. El ΔE_{ab}^* es importante porque evalúa la relación entre el análisis visual y el numérico, pero, aunque el espacio CIELab es el más uniforme, no es perfecto y el valor de ΔE_{ab}^* no siempre corresponde con la diferencia de color entre dos muestras evaluadas mediante un examen visual¹¹⁸.

¹¹⁸ WYSZECKI, Gunther and STILES WS. Color Science Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae, 2 Ed. New York: Wiley, 1982. 968 p. ISBN: 978-0-471-39918-6

2.2. ANTECEDENTES

Las betalainas han adquirido gran interés investigativo para su uso como colorantes en la industria. Diversos autores han reportado que además de su color, tienen efectos positivos para la salud, como su capacidad antioxidante, que se sabe desempeña un papel fundamental en la prevención de enfermedades^{119, 120}. El estudio de las betalainas es reciente en comparación con otros pigmentos naturales como antocianinas, carotenoides y clorofilas, que se han investigado en mayor proporción. Se han reportado cerca de 75 estructuras de betalainas, entre BC y BX¹²¹, que son pocas cuando se considera que se han identificado aproximadamente 550 antocianinas¹²².

Los estudios de los pigmentos betalainicos se centraron inicialmente en los extractos de la remolacha roja (*Beta vulgaris*), encontrando que contiene tanto pigmentos rojo-púrpura como amarillos y concluyendo que la betacianina mayoritaria de esta especie es la betanina (betanidina-5-O-β-glucósido) y la betaxantina principal es la vulgaxantina I (Glutamina-Betaxantina)¹²³. Actualmente de esta raíz se extrae el color “rojo de remolacha” o E-162¹²⁴.

Se reportan investigaciones sobre betalainas en granos indígenas andinos, como quínoa y kiwicha, sin embargo, se concluyó que el contenido de estos pigmentos es bajo en estas especies. Carrasco, et al¹²⁵, encontró solo 2mg betanina por cada 100g de grano y sugirió que estos granos tienen un excelente potencial como fuentes de compuestos bioactivos promotores de la salud como polifenoles.

También se han explorado otras fuentes de betalainas como los frutos de cactáceas (tunas y pitayas) y algunas flores de Amaranteaceas¹²⁶. Stintzing y colaboradores en 2013 identificaron 5 betalainas en pitaya utilizando HPLC-MS y encontraron betalainas características resultantes de la unión del ácido betalámico con serina, ácido amino-butírico, valina, isoleucina y fenilalanina¹²⁷. Fernández

¹¹⁹DOWNHAM. Op. Cit., p. 7

¹²⁰AZEREDO. Op. cit., p. 2365

¹²¹STINTZING. 2001. Op. Cit., p. 356

¹²²ANDERSEN, Oyvind and MARKHAM Kenneth. The anthocyanins. En: Flavonoids: Chemistry, biochemistry and application. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p.1050.

¹²³NEMZER, Boris, et al. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. En: Food Chem., 2011, vol. 127, p. 42-53.

¹²⁴AZEREDO. Op. cit., p. 2365

¹²⁵CARRASCO, Enrique, et al. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). En: Food Chem., 2013, vol. 120., p.128-133.

¹²⁶SUN, Mei and CORKE, Harold. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the *Amaranthaceae*. En: J. Agric.Food Chem., 2003, vol. 51, p. 2288-2294.

¹²⁷STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Betacyanin in fruits from red-purple pitaya. En: Food Chem., 2013, vol 77, p. 101-106.

realizó un estudio en diferentes especies de cactus y concluyó que los frutos de *Opuntia stricta* tienen mayor concentración de betalaínas (80,1mg/100gfruto fresco) en comparación con los frutos de *Opuntia ficus indica*-púrpura (40,6mg/100gfruto fresco) y *Opuntia undulata* (42,4mg/100gfruto fresco). Sin embargo, los extractos de *Opuntia ficus indica*-purpura presentaron mayor capacidad antirradical frente al ABTS y DPPH con 6,70µmol Trolox/g fruto fresco y 5,22µmol Trolox/g fruto fresco respectivamente¹²⁸.

En cuanto a la extracción, se han realizado estudios en la India para la optimización de la extracción tradicional con solventes de los pigmentos tipo betalaínas en los frutos de *Opuntia*. Se usó un diseño experimental Box- Behken y se estudió el efecto de variables como la temperatura, tiempo, masa de fruto y pH, sobre concentración de las betalaínas de los extractos. Las condiciones óptimas de extracción encontradas fueron 42°C, tiempo de extracción 115 minutos, 1,2 g de fruto y un pH de 6,9. Obteniendo valores de 41,54 mg betalaínas/100g de fruto¹²⁹. Por otro lado, Zafra evaluó los efectos del ultrasonido en el jugo de los frutos de *Opuntia ficus-indica* purpura, concluyendo que el tratamiento con ondas de ultrasonido en un período de entre 15-25 minutos reduce significativamente el contenido microbiano, sin afectar las propiedades antioxidantes y cualitativas del jugo rico en betalaínas¹³⁰.

Más adelante en 2014, Vergara¹³¹ desarrolló la técnica de micro encapsulación, con el fin de estabilizar las betalaínas de los extractos obtenidos de la pulpa de *Opuntia stricta*. Se usó microfiltración y se concluyó que el extracto estabilizado es una solución clarificada con contenido de betalaínas similar a la pulpa, pero con menor cantidad de azúcares. Se tuvo en cuenta la temperatura como factor significativo sobre la eficiencia de encapsulación de BC y BX, así todos los procesos optimizados tuvieron rendimientos superiores al 96%. En este estudio también se investigó sobre la degradación térmica de betalaínas, demostrando que el proceso degradativo sigue una cinética de primer orden¹³².

En el grupo de investigación GIPIB (Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica) de la Universidad de Nariño se han desarrollado estudios sobre la capacidad antioxidante in vitro y contenido de betalaínas en especies como pitaya (*Selenicereus megalanthus*)¹³³, ulluco (*Ullucus tuberosus*)¹³⁴ y los

¹²⁸FERNANDEZ, José; et al. Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. En: Plant Foods Hum Nutr., 2010, vol. 65, no 3., p. 253-259.

¹²⁹PRAKASH, Maran. Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus Indica* using BoxBehnken desing with desirability funtion. En: Ind. Crop. Pro., 2013, vol. 49, p. 304-311.

¹³⁰ZAFRA, Quinatzin; et al. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice. En: Ultrasonics Sonochemistry. 2013, vol.20, p. 1283-1288

¹³¹VERGARA, Cristina; SABEDRA, Jorge and SAENZ, Carmen. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactur pear extracts and betanin stability during starage. Food Chem., 2014, vol. 157, p. 246-251.

¹³². Ibid., p.248.

¹³³ DELGADO. 2015. Op. Cit., p.23.

¹³⁴ MOSQUERA. Op. Cit., p. 47

frutos de *Opuntia dillenii*¹³⁵, encontrando resultados significativos para posibles usos industriales de las betalaínas.

Con respecto al uso de las betalaínas, en México Rodríguez y colaboradores, usaron las betaxantinas extraídas del fruto de *Stenocereus pruinosus* en gelatinas y bebidas, y se logró concluir que las BX son más estables en gelatinas que en los jugos y que la retención del color en los alimentos se mejora cuanto estos son almacenados en la oscuridad y a bajas temperaturas¹³⁶.

En general se han investigado los pigmentos betalaínicos en diferentes fuentes naturales y se han encontrado resultados importantes, pero son escasos los estudios sobre la estabilidad usando colorimetría triestímulo en estos pigmentos, lo que revela la relevancia de este trabajo en la especie estudiada. En una especie similar (*Opuntia dillenii*) Cejudo et al¹³⁷, evaluaron la estabilidad del color en extractos de los frutos, analizaron el efecto de la temperatura (4,25 y 80°C) y el pH (4,5 y 6) y concluyeron que las condiciones de almacenamiento en frío (4 ° C) fueron óptimas para mantener el color rojo inicial y el contenido de betalaínas independientemente del pH¹³⁸.

¹³⁵ BETANCOUR. Op. cit., p.

¹³⁶ RODRIGUEZ, Juan. Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus*: Stability and use in food. En: Food Res. Int., 2017, vol. 93, p. 67-71.

¹³⁷ CEJUDO-BASANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson and HEREDIA, Francisco. Potential use of new Colombian sources of betalains. Colorimetric study of red prickly pear (*Opuntia dillenii*) extracts under different technological conditions. En: Food Res. Int., 2015, vol. 71, p. 91-95.

¹³⁸ OTALORA, Maria; et al. Encapsulated betalains as natural colorants: Gummy candies. En: Food Sci. Techn., 2009, vol.113, p. 222-227.

3. METODOLOGÍA.

3.1 MUESTREO Y CLASIFICACIÓN DEL FRUTO.

La recolección del material vegetal se realizó en el departamento de Nariño, municipio Taminango, corregimiento Remolino, vereda Lecheral, con ubicación geográfica de 1°, 65', 15,2" de latitud y 77°, 32', 55" de longitud a 989m.s.n.m y con temperatura promedio de 23°C¹³⁹. El muestreo de los frutos se hizo de forma aleatoria teniendo en cuenta características visuales como uniformidad de color, ausencia de aparente daño físico y tamaño similar.

La clasificación taxonómica fue realizada con un ejemplar de la especie en el Herbario Nacional colombiano (COL) de la Universidad Nacional (Anexo A).

Figura 15. Muestreo frutos de cactácea en municipio de Taminango



Fuente: Esta investigación

3.2. CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS DEL FRUTO

Se determinaron algunas características visuales de los frutos como: color, forma, textura y tamaño.

¹³⁹ CORPORACION AUTONOMA REGIONAL DE NARIÑO. Diagnóstico biofísico y socioeconómico municipio Taminango. Taminango. En: Gobernación de Nariño, 2008.

También se determinó el pH del extracto líquido acuoso, realizando tres mediciones con un pH-metro OAKLON 2700.

El porcentaje de humedad fue determinado por liofilización. Los frutos previamente pesados (M_1) y congelados fueron liofilizados durante 16 horas en un equipo freeze dryer 18 N, a temperatura ambiente y protegiendo de la luz. Posteriormente se registró la masa del material vegetal seco (M_2) y se calculó el porcentaje de humedad (%H) con la ecuación 3¹⁴⁰.

$$\%H = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

3.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se pesaron alrededor de 1250 g de frutos frescos, los cuales se lavaron, secaron, se cortaron en partes pequeñas y congelaron en oscuridad para luego ser liofilizados. Los frutos secos se separaron manualmente de las semillas y almacenaron a 4°C para posteriormente realizar la extracción de los pigmentos.

3.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS

3.4.1 Extracción por Maceración Química (EMQ)

Usando como referencia la metodología de extracción de Sánchez et al¹⁴¹, los frutos (pulpa y cáscara) previamente liofilizados y secos se pusieron en contacto con metanol acidificado con HCl 1%, en proporción 95:5. Se realizaron extracciones cambiando el solvente hasta decoloración de la muestra. Se obtuvo una solución de color anaranjado que se dispuso en el rota-evaporador para luego ser liofilizada, obteniendo un sólido brillante correspondiente al extracto crudo por maceración ECM, el cual se almacenó a 4°C para posteriores análisis. Todos los procedimientos se realizaron a temperaturas menores a los 40°C y protegiendo de la luz. La extracción se realizó por triplicado.

¹⁴⁰ VARGAS, Diana. Efecto de la liofilización sobre propiedades fisicoquímicas y vida útil de cocona (*Solanum sessiliflorum Dunal*) en polvo. Tesis de maestría. Palmira, Colombia: Universidad de Colombia.2015. p.46.

¹⁴¹ SANCHEZ, 2013. Op. cit., p. 79

Figura 16. Proceso de obtención de ECM



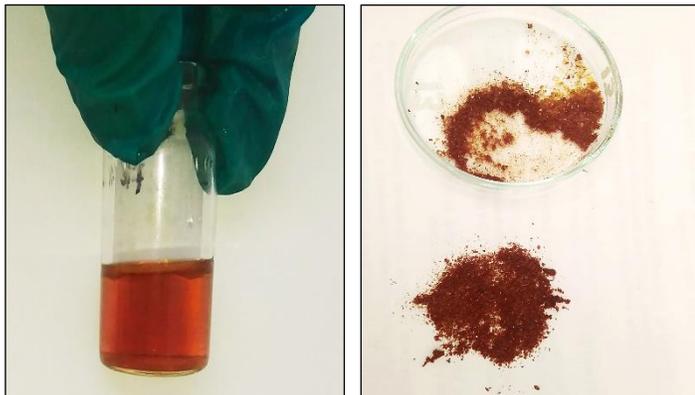
Fuente: esta investigación

3.4.2. Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU)

Se usó la metodología de Corona¹⁴², con algunas modificaciones, el material vegetal previamente liofilizado junto con el solvente de extracción (metanol: HCl 1% 95:5) fue tratado por ultrasonido. Empleando un sonicador KLX1500 a 1500 W, una frecuencia constante de 7MHz y temperatura ambiente; se realizaron ciclos de 10 minutos cambiando el disolvente en cada ciclo, repitiendo el procedimiento hasta decoloración de los frutos. El extracto líquido se concentró con rotaevaporación y liofilizó para conseguir un sólido rojizo (figura 17) correspondiente al extracto crudo por ultrasonido ECU que se almacenó en oscuridad y a 4°C.

¹⁴² CORONA. Op. cit., p. 67.

Figura 17. Apariencia de ECU



Fuente: esta investigación

3.4.3. Ensayos Preliminares y Elección del Método de Extracción

Para confirmar la presencia de betalaínas se tomó los espectros de absorción UV-Vis de soluciones acuosas de los EC, en el rango de 200 a 700nm en un espectrofotómetro UV-Vis HP8453 y se determinaron las absorbancias máximas.

Con el fin de encontrar el mejor método de extracción, se realizó un diseño simple donde la maceración química y el proceso de extracción asistida por ultrasonido representan cada nivel. Para el análisis de los datos se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurión XVI.I. Se realizaron tres réplicas por cada experimento utilizando como variable respuesta el contenido total de betalaínas expresado en mg B/100g de fruto fresco.

3.5. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO BETALAÍNICO.

Se empleó el método espectrofotométrico¹⁴², se prepararon disoluciones de ECM y ECU en agua tipo II y usando un espectrofotómetro Prove Merck 300 se determinaron las absorbancias, comprobando que éstas se encuentren en el rango óptimo de análisis ($0,8 < A < 1$). Para estimar la concentración de pigmentos [B] en miligramo por gramo de material vegetal, se midieron las absorbancias a 538 nm para betacianinas y a 480 nm para betaxantinas y usó la ecuación 4¹⁴³. Las medidas se realizaron por triplicado.

$$[B] \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A \cdot D_F \cdot V \cdot MW}{m \cdot \epsilon \cdot L} \quad \text{Ecuación 4}$$

Dónde, A =absorbancia; D_F =factor de dilución (para este caso: 2); V= volumen final de cada extracto (mL); MW =peso molecular para betacianinas (betanina 550

¹⁴² STINTZING. 2004. Op. cit., p. 7732

¹⁴³ STINTZING. 2003. Op. cit., p. 303-311.

g/mol) y para betaxantinas (408g/mol indicaxantina); m =masa fruto (g) usado para generar extracto; ϵ = coeficiente de extinción molar (60000 L/ (mol.cm) para betanina en agua y 48000 L/ (mol.cm) para indicaxantina en agua) y L= longitud de la celda.

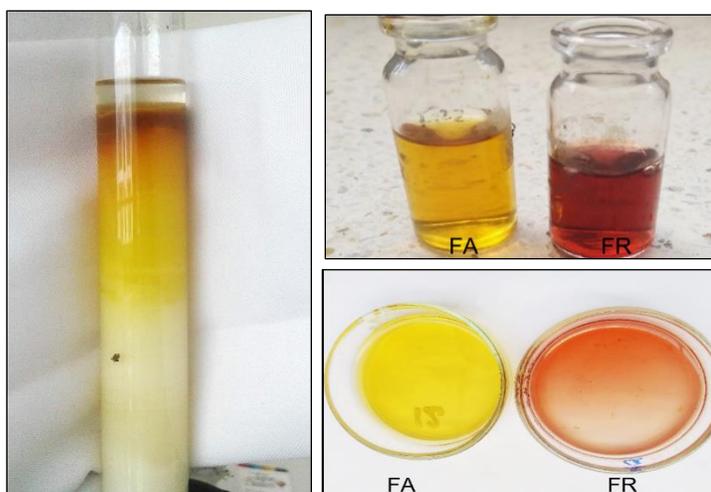
3.6. PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE BETAXANTINAS Y BETACIANINAS

Para la eliminación de hidrocoloides y proteínas se siguió la metodología de Stintzing *et al*¹⁴⁴, con algunas modificaciones, así: el extracto crudo con mayor contenido de betalaínas se disolvió en agua tipo II (1 g extracto/10mL agua), luego se adicionó etanol al 96% en proporción 2:1 de etanol: extracto. Se dejó en reposo durante 30 minutos y centrifugó a 6000rpm en 3 ciclos de 20 minutos. El sobrenadante se concentró y secó hasta obtener un sólido correspondiente al extracto purificado.

3.6.1 Fraccionamiento del Extracto Purificado.

El extracto purificado se sometió a una retención selectiva en una columna de 30cm de largo y 2cm de diámetro interno, empacada hasta 25 cm de altura con silica C18. Inicialmente se activó la resina con 3 volúmenes de metanol y fue acondicionada con 3 volúmenes de agua acidificada a pH 3 con ácido fórmico (Stintzing *et al* 2002)¹⁴⁵. Para la separación de las dos clases de betalaínas se cargó el extracto purificado, previamente disuelto en una mínima cantidad del disolvente inicial, la fracción amarilla (FA) se eluyó con agua acidificada pH 3 y la fracción enriquecida de pigmentos rojos (FR) fue eluída con una mezcla de metanol: agua acidificada pH 3 en proporción 95:5. Finalmente las dos fracciones recolectadas se concentraron mediante rota-evaporación y secaron hasta obtener los sólidos denominados FA y FR.

Figura 18. Separación de betalaínas usando cromatografía de columna



Fuente: esta investigación

¹⁴⁴ STINTZING. 2002b. Op. cit., p. 2303.

¹⁴⁵ *Ibíd.*, p. 2303.

3.7. ANÁLISIS DE BETALAINAS POR HPLC-ANALÍTICA

El extracto purificado y las fracciones (FA y FR) fueron analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia de acuerdo a la metodología Wybraniec et al ¹⁴⁶. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo HPLC Waters Breeze acoplado a un detector de arreglo de diodos (PDA 2998), con un sistema de bombas binario (Waters 1525) y una columna XTerra-MS C18 (150 x 4,6mm d.i. x 3,5µm d.p.). Para el análisis se usaron dos fases móviles, A: ácido fórmico 2% y B: acetonitrilo: agua acidificada 80:20 (agua: ácido fórmico 90: 10). Las muestras se disolvieron en la fase móvil A y se filtraron en un cartucho con 0,45 µm de diámetro de poro. El volumen de inyección fue de 20 µL y se empleó una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La corrida cromatográfica se realizó de acuerdo al gradiente de la tabla 1, la temperatura del horno se programó a 30°C y las principales longitudes de onda monitoreadas fueron 538nm y 480nm.

Tabla 1. Gradiente de elución para extracto purificado y fracciones

| | Tiempo | %A | %B |
|---|---------------|-----------|-----------|
| 1 | 0.01 | 93.0 | 7.0 |
| 2 | 35.00 | 80.0 | 20.0 |
| 3 | 40.00 | 93.0 | 7.0 |
| 4 | 43.00 | 93.0 | 7.0 |

Fuente: este estudio

3.8. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO TOTAL (CFT)

El contenido de fenoles totales de los extractos y fracciones se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Se mezclaron 0,1 mL de las muestras (previamente disueltas en etanol al 96%) con 0,5mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,5 mL de carbonato de sodio Na₂CO₃ 20% m/v y las mezclas de reacción se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua tipo II¹⁴⁷. Se dejaron en reposo en oscuridad y temperatura ambiente durante 2 horas y posteriormente a las soluciones azules resultantes (ver anexo B) se les tomó las absorbancias a 765nm en un espectrofotómetro Prove-300. El contenido fenólico se calculó con una curva de calibración usando soluciones de ácido gálico (AG) a 25, 50, 100,250 y 500 ppm y los resultados se expresaron como mg de AG por gramo de muestra seca. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los parámetros estadísticos se calcularon con el programa STATGRAPHIC Centurion XVI.I

3.9. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

La evaluación de la capacidad antioxidante in vitro se hizo usando tres métodos

¹⁴⁶ WYBRANIEC. 2009. Op. cit., p. 6892.

¹⁴⁷ NACHUN, OCK, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidantrich US foods. En: J. Food Compos. Anal., 2011, vol. 24, no 7., p.1043-1045.

espectrofotométricos: TEAC, DPPH y FRAP. Las lecturas de todas las absorbancias se hicieron en un espectrofotómetro Prove Merck-300, todas las muestras se analizaron por triplicado y los parámetros estadísticos se determinaron con STATGRAPHIC Centurion XVI.I.

3.9.1. Método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox).

Se siguió la metodología propuesta por Re et al¹⁴⁸ para evaluar la capacidad de reducir el radical ABTS⁺. La formación del radical se llevó a cabo mezclando ABTS 7mM con persulfato de potasio K₂S₂O₇ 2,5 mM (concentraciones de reactivos corresponden a concentraciones finales en la solución) y se dejó en reposo, en oscuridad y temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente una alícuota de esta solución se diluyó en un tampón fosfato salino PBS pH 7,4, hasta tener una absorbancia menor a 1 a 734nm.

Para la reacción se adicionaron 30 µL de las muestras (previamente disueltas en metanol 50%) a 3mL de solución ABTS⁺ diluida, se agitó en vortex durante 1 minuto, dejó en reposo por 6 minutos, observándose la coloración azul verdosa característica (Anexo C) y finalmente, se midieron las absorbancias a 734 nm. Siguiendo la metodología descrita se construyó una curva estándar con soluciones metanólicas de Trolox (0,1, 0,5, 1, 1,5, y 2 mM), así, los resultados se expresaron en mmol de Trolox por g de muestra seca. Para evaluar la efectividad del método se siguió el mismo procedimiento usando ácido ascórbico como antioxidante.

3.9.2. Método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

Siguiendo el protocolo reportado por Cai¹⁴⁹, con algunas modificaciones, se estudió la capacidad antirradical de las muestras frente al DPPH•. Se preparó una solución etanólica (en etanol al 80%) de DPPH• 0,1 mM, en el anexo D se observa la coloración violeta de dicho radical. Para la reacción, se añadieron alícuotas de 3,9mL de la solución DPPH• a 0,1mL de las muestras (extractos o fracciones disueltas en etanol al 80%) a diferentes concentraciones, se agitó y dejó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego se midió la disminución de la absorbancia a 515 nm, se usó etanol al 80% como blanco.

La actividad antioxidante de los extractos se expresó usando el parámetro de actividad

¹⁴⁸ RE, Roberta, et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. En: Free Radic. Biol. Med., 1999, vol. 26, no 9., p. 1231-1237/147

¹⁴⁹ CAI. Op. Cit., p. 2288

de eliminación de radicales EC₅₀ (concentración de antioxidante requerida para una disminución del 50% en la absorbancia de los radicales libres DPPH•). Para cada muestra se construyó una curva estándar (dosis-respuesta) graficando porcentaje de inhibición de DPPH (calculado con la ecuación 5) frente a la concentración de antioxidante, con el fin de obtener, por interpolación el parámetro EC₅₀

$$\% \text{ inhibición de DPPH} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{control}}} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde la absorbancia control (A_{control}) es la solución de DPPH + 0,1 mL de etanol 80% y la absorbancia test (A_{test}) es la absorbancia de la prueba (solución de DPPH + 0,1 mL de muestra). La funcionalidad del método se evaluó con un estándar de ácido ascórbico (A.A) en el rango de concentraciones: 1,50- 6,25µg Á.A/ mL. Por su parte, las concentraciones de las muestras (concentraciones corresponden a concentraciones finales en la solución) se prepararon de acuerdo a ensayos preliminares, que permitieron establecer que los siguientes rangos de concentración: ECM (37,5-80µg/mL), EPM (20-120 µg/mL), FA (37,5-150µg/mL) y FR (1-50 µg/mL), fueron adecuados para obtener el término EC₅₀ en un t=30 min y bajo las condiciones anteriormente descritas.

3.9.3. Método FRAP (Poder Antioxidante en la Reducción Férrica)

La capacidad reductora frente a los iones férricos se evaluó siguiendo la metodología de Ciappin et al¹⁵⁰: Inicialmente se preparó una solución de trabajo FRAP mezclando 0,5 ml de solución de K₃Fe (CN)₆ al 1% y 0,5 ml de buffer fosfato 0,2M pH 6,6. A la solución de trabajo se adicionaron 0,5mL de muestra (extractos, fracciones y agua tipo II, en el caso del blanco), agitó e incubó a 30°C durante 20 minutos y luego se adicionó 1mL de TCA 10%. Posteriormente se tomó 1mL de la solución resultante y mezcló con 1 ml de agua tipo II y 0,2mL de FeCl₃ 0,1% y por último, se realizó la lectura de absorbancias de soluciones coloreadas (ver anexo E) a 700 nm.

La capacidad reductora se expresó en mg de ácido ascórbico equivalente (AA) por gramo de muestra seca, para ello fue necesario construir una curva de calibración, siguiendo los pasos descritos anteriormente y usando ácido ascórbico en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ppm.

3.10. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR MEDIANTE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

¹⁵⁰ CIAPPIN, María, et al. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. En: Rev. Cienc. Tecno., 2013, vol. 19., p. 45-51.

El extracto crudo con mayor contenido de betalaínas y su correspondiente extracto purificado, se sometieron a diferentes condiciones de pH (3, 5,7) y temperatura (4°C, 80°C y temperatura ambiente) con el fin de determinar la estabilidad del color durante el almacenamiento. El pH de las muestras se ajustó con soluciones de HCl 1% y NaOH 5%. El seguimiento a 4°C y temperatura ambiente se realizó a diario hasta completar 60 días de almacenamiento y a 80°C de 1-50 minutos de calentamiento. La evaluación del color se basó en la medición espectrofotométrica del espectro de absorción en la región visible (350–780 nm) utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Pharo Merck. Los parámetros de color se obtuvieron mediante el método de ordenadas ponderadas ($\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$) usando el software CromaLab®, el cual permitió determinar los parámetros CIELab siguiendo las recomendaciones de la comisión internacional de iluminación¹⁵¹ (CIE, 2004): correspondiente al observador estándar y el iluminante estándar, correspondiente a la luz natural y realizando mediciones de referencia en blanco con agua destilada. Los resultados de color se expresaron como parámetros CIELab de luminosidad (L^*), eje rojo-verde (a^*) y eje amarillo-azul (b^*), a partir de los cuales se determinó la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) y calculó ángulo de tono (h_{ab}) y croma (C^*_{ab}) como características cualitativa y cuantitativa del color.

¹⁵¹ HEREDIA. Francisco, et al. CromaLab®, análisis de color. Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04. Sevilla, 2004.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS INICIALES DEL FRUTO

Un cladodio de la planta colectada en la vereda Lecheral (municipio de Taminango) se clasificó taxonómicamente en el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional sede Bogotá, como *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. perteneciente a la familia Cactaceae y quedó registrado con el código de inclusión COL No. 604533.

En la tabla 2 se registran algunas características fisicoquímicas de los frutos. Usualmente el valor de pH de los frutos de cactus se encuentra entre 5,3 y 6,5 dependiendo de la especie y variedad, sin embargo, el jugo acuoso de las tunas fuente de esta investigación tiene un mayor carácter ácido. El pH del jugo acuoso (4,60) es menor al valor 6,3 que menciona Stintzing¹⁵², otros autores como Gurrieri¹⁵³ y Zafra¹⁵⁴ han reportado valores de pH de 5,27 y 5,09, respectivamente. En cuanto al valor del porcentaje de humedad es cercano al 80,6% reportado por Repo¹⁵⁵ para tunas de color rojo y el 85,99 % al que hace referencia Rodríguez¹⁵⁶ en la pitaya.

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los frutos

| Característica | Descripción |
|-----------------------|---|
| Color | Frutos maduros presentan cascara y pulpa del mismo color (anaranjada 20*) |
| Forma y Tamaño | Elipsoide de 6 a 8 cm de largo y 4 a 6 cm de ancho |
| Textura | Corteza firme y con espinas y pulpa blanda jugosa |
| Porcentaje de Humedad | 82,77 ± 3,080 |
| pH | 4,600 ± 0,060 |

*Corresponde al color asignado de acuerdo a la Tabla de Colores de la Real Sociedad de Horticultura (RHS Colour Chart).

4.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE BETALAÍNAS

Investigaciones previas han demostrado que la coloración en los frutos de las cactáceas se debe a la presencia de betalaínas^{157, 158}. Esto se evidenció, mediante

¹⁵²STINTZING. 2005. Op. Cit., p.445

¹⁵³ GURRIERI, Sergio, et al. Chemical Characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) and Perspectives for the Storage of Its Juice. En: J. Agric. Food Chem., 2000, vol, 48, p. 5424-5431.

¹⁵⁴ ZAFRA.2013. Op. Cit., p. 1285.

¹⁵⁵REPO, Ritva y ENCINA, René. Determinación de la Capacidad Antioxidante y Compuestos Bioactivos de Frutas Nativas Peruanas. *Rev Soc Quím Perú*. 2008, vol. 74, p. 108-124.

¹⁵⁶ CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA. En: Memorias. Veracruz, México: Colegio Mexicano de Ingenieros bioquímicos. 2016, p.1211.

Una prueba cualitativa con NaOH, que ayudó a discriminar la presencia de antocianinas¹⁵⁹ y fue una primera aproximación para determinar la presencia de pigmentos betaláinicos en los frutos de *Opuntia ficus indica*. En la (figura 19) se observa variación del color del extracto crudo acuoso después de ser tratado con NaOH, hay un cambio de color de anaranjado a amarillo al variar el pH, debido a que en medio alcalino las betaláinas presentan ruptura del enlace imina produciéndose ácido betalámico de color amarillo y ciclo dopa (incolores) en el caso de las BC y aminoácidos, (también incolores) cuando hay BX¹⁶⁰.

Figura 19. Prueba cualitativa para confirmar presencia de betaláinas



Del lado izquierdo color extracto del fruto de *O. Ficus indica*,
A la derecha el cambio de color al adicionar NaOH. Fuente: esta investigación

Adicionalmente los espectros de absorción UV-Vis de los ECM y ECU tomados al pH de la fuente natural (ácido) y también en medio básico confirmaron la presencia de betaláinas y permitieron descartar la existencia de antocianinas y pigmentos carotenoides. Como se esperaba, de acuerdo al color de los frutos (anaranjados), los extractos crudos a pH ácido (figura 20(a) y (b)) presentan máximos de absorción cercanos a 480nm, característico de betaxantinas, pero, no se observó de manera clara hombros característicos de las betacianinas a 280nm y 540nm, posiblemente porque se encuentran en menor concentración. Cuando los extractos se sometieron a un medio básico (figura 20(c) y (d)) se evidenció la pérdida de la banda característica de las BX y la formación de un hombro a 430nm debido al ácido betalámico, producto de la hidrólisis alcalina de las betaláinas¹⁶¹.

¹⁵⁷ HARRIS. .2012. Op, Cit., p 2.

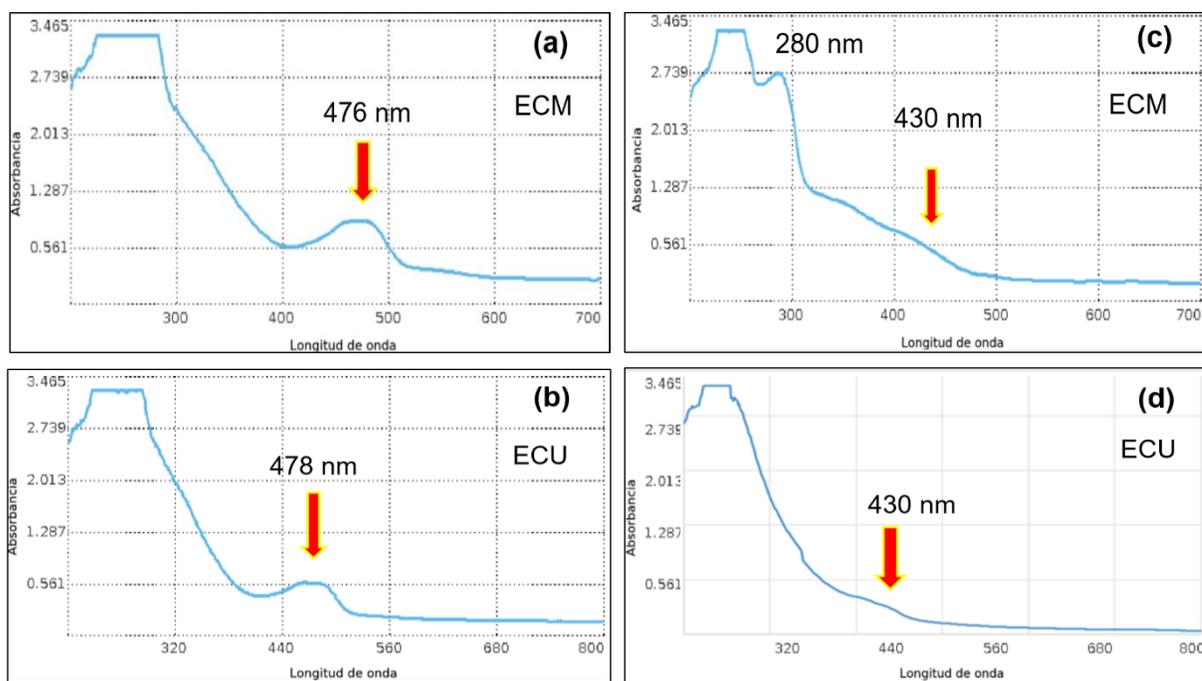
¹⁵⁸ BROCKINGTON. Op Cit., p 854.

¹⁵⁹ DELGADO-VARGAS. 2000. Op. cit., p. 202-204.

¹⁶⁰ HERBACH. 2006. Op. cit., p. R42 153

¹⁶¹ AZEREDO. Op. cit., p. 2366

Figura 20. Espectros de absorción ECM en medio ácido (a) y básico (c) y ECU a pH ácido (b) y básico (d).



Fuente. Esta investigación.

4.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS Y CUANTIFICACIÓN

Mediante el proceso de EMQ, extracción por maceración química (apartado 3.4.1) se obtuvo el ECM correspondiente al 7,520% de la masa total de los frutos frescos procesados y usando la EAU, extracción asistida con ultrasonido (sección 3.4.2) se determinó que los frutos frescos contienen 12,30% de ECU. De esta manera, la extracción por ultrasonido indicaría tener mejor rendimiento para aislar pigmentos betalaínicos en los frutos estudiados.

Después de obtener los extractos ECM y ECU y con el propósito de valorar los métodos de extracción y tomando como factor de respuesta el contenido total de betalaínas, se procedió a determinar esta propiedad en las muestras.

4.3.1. Cuantificación de Betalaínas

El contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) se cuantificó de la manera descrita anteriormente (sección 3.5) y los valores obtenidos se registran en la tabla 3.

En los dos extractos crudos el contenido de BX es tres veces mayor que el de BC, dicha proporción está en correspondencia con el color de los frutos.

Tabla 3. Contenido de betacianinas y betaxantinas en los extractos crudos.

| Muestra | Betaxantinas (BX)^a | Betacianinas (BC)^b | Betalainas totales^c |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| ECM* | 0,3877 ± 0,007 | 0,1270 ± 0,040 | 0,5147 ± 0,022 |
| ECU* | 0,2900 ± 0,006 | 0,1015 ± 0,008 | 0,3915 ± 0,004 |

^amg indicaxantina/g fruto fresco, ^bmg betanina/g fruto fresco, ^cmg betanina + mg indicaxantina/g fruto fresco. * Medias calculadas de tres réplicas. Fuente: Esta investigación

Los valores para el ECM son cercanos a los encontrados por García et al¹⁶² de 0,36 mg de BX y 0,13mg de BC por gramo de fruto fresco. En el ECM el contenido de BX es mayor al reportado por Fernández et al¹⁶³ (0,30mg/g) y Catellanos¹⁶⁴ (0,33mg BX/g) y menor al que menciona García¹⁶⁵ (0,45g BX/g) en los frutos de *Opuntia*. También se resalta que el contenido total de betalainas en el ECU es cercano al reportado por Melgar et al¹⁶⁶ en los frutos de *Opuntia engelmannii*, quien usando extracción asistida por ultrasonido encontró un valor de 0,40mg de betalainas/g de fruto fresco.

En comparación con otras fuentes naturales, los frutos estudiados tienen un contenido de betalainas similar al que reporta Gasztonyi¹⁶⁷ (0,4-0,5 mg de betalainas/g) para 5 variedades de remolacha roja y también está dentro del rango reportado por Fernández¹⁶⁸ en diferentes especies de *Opuntia* y que va desde 0,42 hasta 0,80 mg /g fruto fresco.

4.3.2. Valoración estadística del Contenido de Betalainas bajo los dos Métodos de Extracción

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) que descompone la varianza de los valores del contenido total de betalainas bajo los dos métodos de extracción. La tabla 4 muestra el valor $p < 0,05$, por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido total de betalainas de los extractos crudos obtenidos con un método de extracción u otro.

¹⁶² GARCIA, Tomás, et al. Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear tissues. En: J. Food Compos. Anal., 2019, vol.76, p. 1-13.

¹⁶³ FERNANDEZ, Jose and ALMELA, Luis. Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. En: J.Chromatogr. A. 2001, vol. 913, p. 415-420.

¹⁶⁴ CASTELLANOS, Elena and YAHIA, Elhadi. Identification and Quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by High- Performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. En: J. Agric.Food Chem., 2008, vol. 56., p. 5758-5764.

¹⁶⁵ GARCIA Op. cit., p.9.

¹⁶⁶ MELGAR, Bruno, et al. Ultrasound and Microwave Assisted Extraction of *Opuntia* Fruit Biocompounds. En: Molecules, 2019, vol. 24, p.3618.

¹⁶⁷ GASZTONYI, Magdolna, et al. Comparison of red beet (*Beta vulgarisvarconditiva*) varieties on the basis of their pigment components. En: J. Sci. Food Agric., 2001, vol. 81, no 9., p. 932-933.

¹⁶⁸ FERNANDEZ, 2010. Op. cit., p. 256.

Tabla 4. Análisis de varianza para contenido total de betalaínas por método de extracción

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Entre grupos | 227,723 | 1 | 227,723 | 218,27 | 0,0001 |
| Intra grupos | 4,17331 | 4 | 1,04333 | | |
| Total (Corr.) | 231,897 | 5 | | | |

En la tabla 5 se muestran las medias del contenido de betalaínas (mg B/100g fruto fresco) para los extractos crudos según su método de extracción y su respectivo error estándar, los cuales indican la variabilidad debida a las réplicas. También se muestra un intervalo alrededor de cada media con un 95,0% de confianza. El ECM obtuvo el valor medio más alto del contenido total de betalaínas y tiene alrededor de 12 mg más que el ECU por cada 100g del material vegetal fresco, teniendo en cuenta esta diferencia y que el valor $p < 0,05$, con una confianza del 95% se concluye que existen diferencias significativas en el contenido de betalaínas totales al usar el método de extracción por maceración química o la extracción asistida con ultrasonido.

Tabla 5. Tabla de Medias para contenido total de betalaínas por método de extracción con intervalos de confianza del 95,0%

| Nivel | Casos | Media | Error Est. (s agrupada) | Límite Inferior | Límite Superior |
|--------------|--------------|--------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| ECM | 3 | 51,470 | 0,589725 | 50,3123 | 52,6279 |
| ECU | 3 | 39,149 | 0,597285 | 37,9910 | 40,3066 |
| Total | 6 | 45,309 | | | |

En un apartado anterior (4.3) se indicó que el método de extracción con ultrasonido tuvo mayor rendimiento en la extracción cuando se compara con la EMQ. Esto porque, en la EAU se puede mejorar la tasa de extracción y su rendimiento debido posiblemente a que se mejora la penetración del solvente en la muestra e intensifica la transferencia de masa y efectos capilares¹⁶⁹, sin embargo, fue en el ECM que se logró cuantificar mayor contenido betalaínico. Estos resultados indican que, en este caso, la EAU resulta ser más eficiente pero menos selectiva que la EMQ para aislar betalaínas de los frutos en la variedad estudiada de *Opuntia ficus indica* (L) Mill.

4.4 PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS

Puesto que los métodos de extracción no son selectivos para los pigmentos de interés y debido a la naturaleza de los frutos, se puede esperar la co-extracción de sustancias

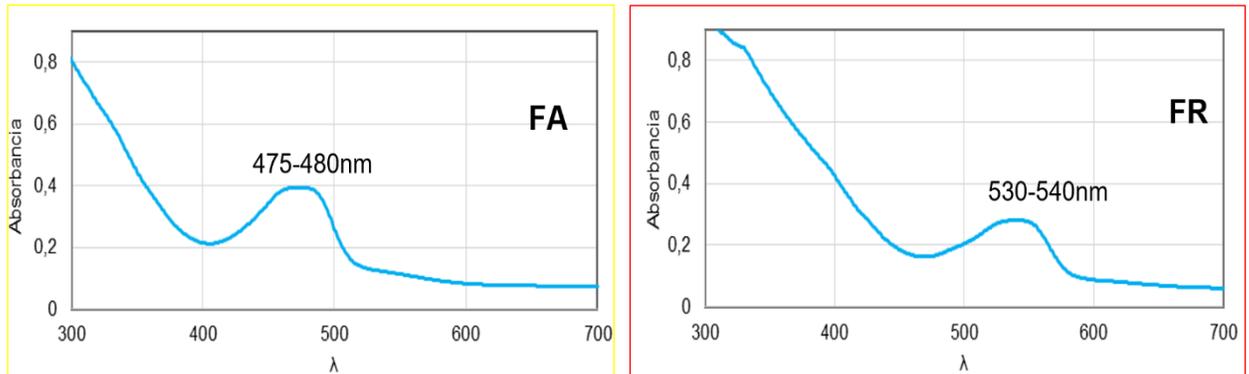
¹⁶⁹ CORONA. Op. cit., p. 67.

como proteínas, algunos minerales, carbohidratos, fibra y especialmente polisacáridos conocidos como mucilagos, así, como lo reporta Guzmán et al¹⁷⁰.

El extracto crudo con mayor contenido de betalaínas, ECM se purificó, se separaron los mucilagos al adicionar etanol a la muestra (previamente disuelta en agua tipo II), de esta forma se disminuyó la polaridad del medio y como consecuencia se redujo el grado de hidratación de los grupos iónicos de los carbohidratos que forman los mucilagos, generando su precipitación y facilitando su posterior separación por centrifugación. Se obtuvo 4,245% (respecto a los frutos frescos) de extracto puro por maceración **EPM** y se determinó el contenido de betalaínas totales en el EPM correspondiente a **68,36 mgB/100g fruto fresco**, que es mayor al valor del contenido betalaínico en el ECM (51,47 mgB/100g fruto), de esta manera se comprueba la eficiencia del proceso de purificación.

La separación de las betaxantinas y las betacianinas a partir del EPM se realizó como se describe en la sección 3.6. Se obtuvo 23,19% de la fracción amarilla (FA) y 2,410% de la fracción roja (FR) (porcentajes de recuperación respecto a masa total del ECM procesado). Esta separación se hace posible por las diferentes características de retención (dependientes del pH) de las betalaínas¹⁷¹. En el proceso se observó que la FR se retuvo en la sílica C-18, que es una resina de carácter apolar, mientras que la FA eluyó rápidamente al utilizar como fase móvil agua acidificada. En la (figura 21) se muestran los espectros de absorción de las dos fracciones, donde se evidencia una banda de absorción característica de las BX en la fracción amarilla y una representativa de las BC en la fracción roja. Se comprueba así, que la fracción enriquecida en betaxantinas, de color amarillo es más polar que la fracción de color rojo enriquecida en betacianinas.

Figura 21. Espectros de absorción UV-vis de fracciones, **FA** y **FR**



Fuente: esta investigación

¹⁷⁰ GUZMAN, Salvador, et al. Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruits cactus species produced in central Mexico. En: Food Chem., 2010, vol. 121, p. 381-386.

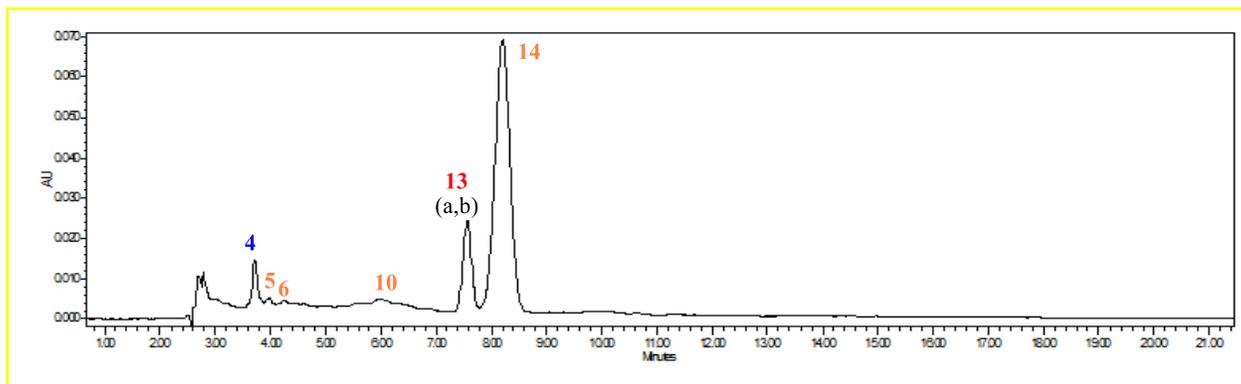
¹⁷¹ STINTZING. 2002b. Op. cit., p. 2303.

4.5 ANÁLISIS GENERAL DE BETALAÍNAS POR HPLC ANALÍTICA

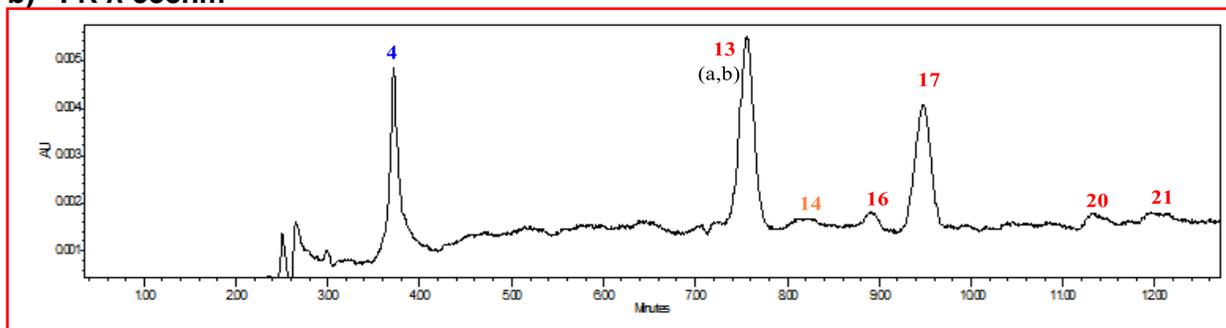
El análisis por HPLC-PDA del extracto purificado (EPM) y las fracciones (FA y FR) se realizó utilizando una columna XTerra-C18, compuesta por partículas de sílice unidas a cadenas alifáticas de octadecil-silano y su estructura tiene uno de cada tres silanoles sustituido por un grupo metilo, por tanto, actúa como adsorbente apolar¹⁷², por eso las betalaínas más polares tuvieron una menor fuerza de absorción y el orden de elución es de mayor a menor polaridad. Por su estructura química, las betaxantinas son más polares y eluyen más rápido, es decir presentaron tiempos de retención (t_R) menores que las betacianinas¹⁷³.

Figura 22. Cromatogramas HPLC-PDA de FA y FR

a) FA λ :480nm



b) FR λ :538nm

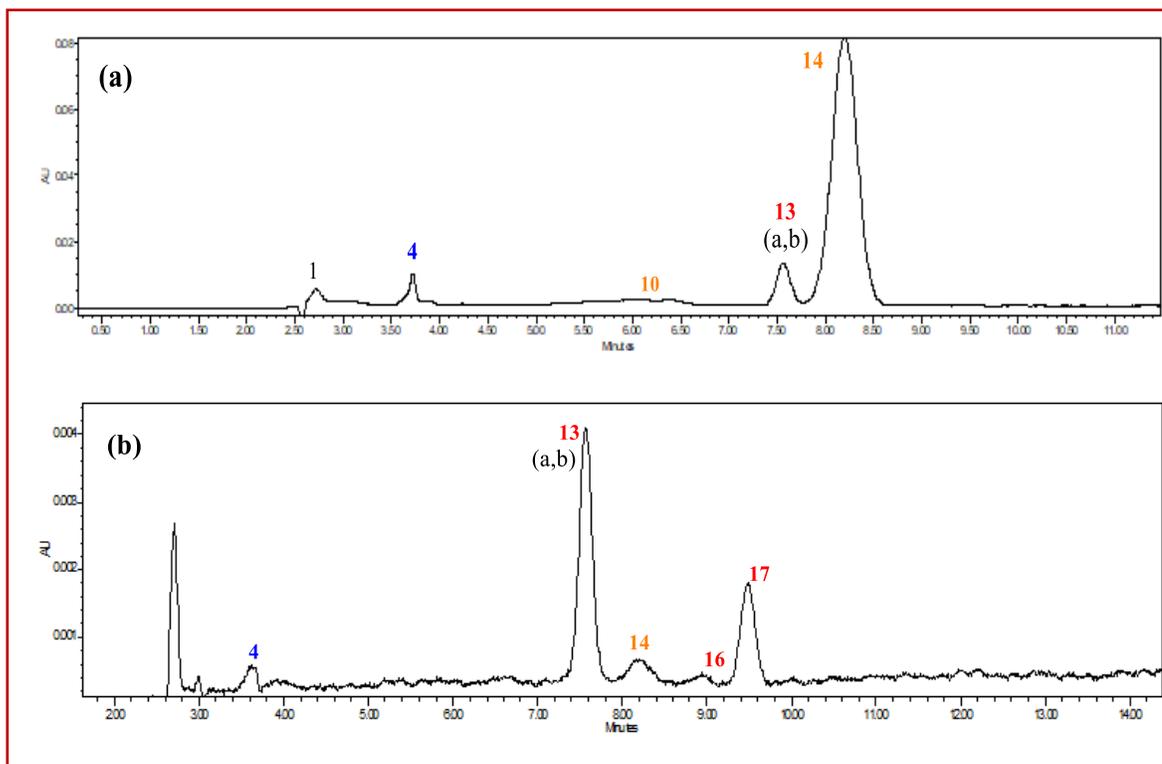


*El pico 13 se ha anotado con las letras a y b como indicativo de la posible coelución de dos compuestos.

¹⁷² WATERS CORPORATION U.S.A. The most succesful Column in Over 30 Years of Stationary Phase Technology. En: XTerra Columns. [15 abril 2021]. Disponible en: <<http://waters.com/xterra>>

¹⁷³ PIRES GONÇALVES. Op. cit., p. 236.

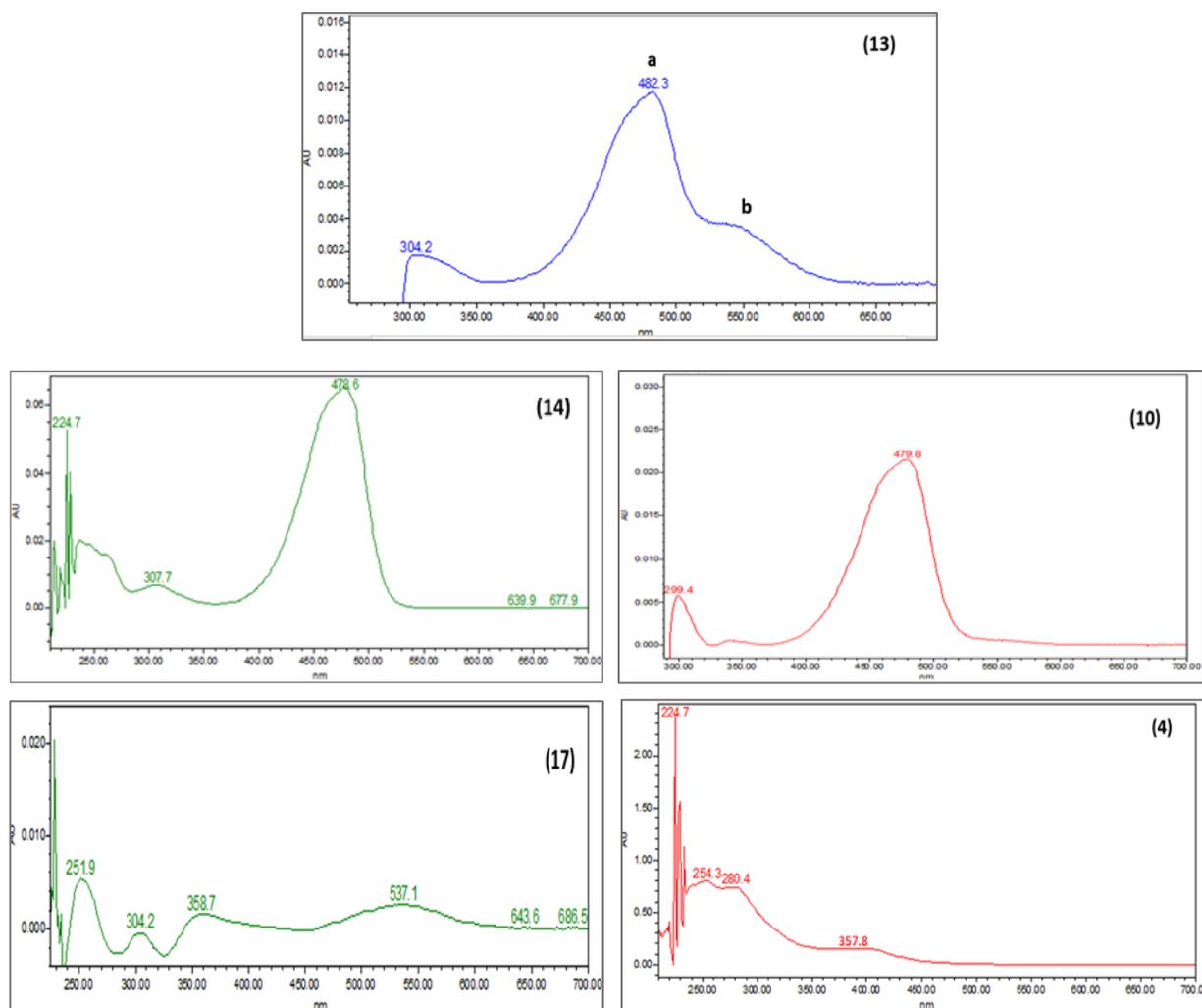
Figura 23. Perfiles cromatográficos del EPM a 480nm (a) y 538nm (b)



Fuente esta investigación.

En la (figura 22) se presentan los perfiles cromatográficos de las dos fracciones: **FA** a 480nm y **FR** a 538 nm, al compararlos, en la FA se observa mayor número de picos con tiempos de retención menores a 9min, sugiriendo la presencia de betaxantinas, mientras que la mayoría de los compuestos más retenidos ($t_R > 9$ minutos) se detectaron en la FR, es decir la fracción de color rojo estaría enriquecida de pigmentos tipo betacianinas. Al analizar los cromatogramas del EPM (figura 23.), también se sugiere que la fracción amarilla está enriquecida en BX y la roja es rica en BC, porque picos como el **16**($t_R = 8,92$ min) y **17**($t_R = 9,49$ min) solo se detectaron a 538nm y el pico **10**($t_R = 6,24$ min) solo está presente a 480nm y con ayuda de sus espectros de absorción (figura 24) se reveló que corresponden a dos betacianinas y una betaxantina, respectivamente.

Figura 24. Espectros UV-Vis on-line de algunos picos cromatográficos del extracto purificado EPM y las fracciones.



*Las letras a y b indican la presencia de dos compuestos cuyas $\lambda_{\text{máx}}$ están alrededor de 480 y 538nm, respectivamente. Fuente: Esta investigación.

En la (figura 24) se observan los espectros de absorción de los compuestos más representativos de los perfiles cromatográficos del EPM (a 480 y 538 nm), los picos **13**, **17**, **10**, **4** y el pico **14** ($t_R = 8,21$ min) que además de ser la betaxantina mayoritaria es un ejemplo de un compuesto que absorbe a 480 nm, pero tiene un t_R mayor a 8min.

Los espectros de absorción en la región visible de cada pico mostraron que, aún después del minuto 8, hay un compuesto (pico **14**) que absorbe con mayor intensidad en el perfil a 480 nm sin bandas de absorción a 538nm, además la intensidad de este pico es mucho mayor en el perfil cromatográfico de la FA como también en el cromatograma del EPM a 480nm, indicando que es una BX con A_{max} a 478,6nm.

Con respecto al pico **13** ($t_R = 7,57$ min), muestra mayor intensidad en la FR y en el EPM a 538nm, pero también se detectó en el perfil 480nm, su espectro evidencia una BX con A_{max} a 479,8nm y un hombro alrededor de 540nm y teniendo en cuenta que las betaxantinas no presentan absorbancia a 538 nm, se infiere que en el pico **13** posiblemente han coeluído, una BX y una BC de polaridad similar o con características de retención similares. El pico **4** ($t_R = 3,72$ min) se logró detectar tanto en el perfil del EPM y en las dos fracciones, siendo más intenso en la FR, su espectro de absorción muestra una banda cercana a 350nm, es decir no tiene bandas características de BX ni BC y por sus características espectrales y tiempo de retención se sugiere la presencia de ácidos orgánicos, que son un tipo de compuestos que se han detectado anteriormente en frutos de cactáceas, tal como lo reportan Teles¹⁷⁴ y Betancourt.¹⁷⁵

La información cromatográfica y los espectros mostrados anteriormente permitieron confirmar la presencia de compuestos con características de BX en la fracción amarilla y de BC en la fracción de color rojo. Se observa que el compuesto mayoritario (mayor área, ver Anexo F) en los extractos es el **14**, que de acuerdo a su longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{máx} = 478,6$ nm) es una betaxantina. Los resultados obtenidos con HPLC-PDA no son suficientes para identificar las betaxantinas y betacianinas presentes en los frutos de *Opuntia ficus-indica* del departamento de Nariño, por lo tanto, no es posible comparar la composición de los extractos pigmentados con estudios previos. Sin embargo, al relacionar los espectros UV-Vis de las betaxantinas más comunes que se reportan en la literatura científica con las características del pico **14**, se evidencia que este posiblemente corresponde a la indicaxantina (prolina-betaxantina), que es la BX mayoritaria en los frutos de *Opuntia* en las variedades amarillas y anaranjadas^{176, 177}. Este compuesto también se ha encontrado en los frutos de *Opuntia dillenii*, Betancourt¹⁷⁸, usando la misma metodología y el mismo equipo usado en esta investigación en HPLC-analítica, y también con ayuda del HPLC-MS, logro caracterizar la indicaxantina, que tuvo características espectrales ($\lambda_{máx} = 479$) y de retención ($t_R = 8,3$ minutos) similares al compuesto del pico **14**.

4.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT)

Teniendo en cuenta que los frutos de cactáceas contienen compuestos fenólicos y que el uso de técnicas para determinar el contenido de fenoles de matrices de origen natural es ampliamente utilizado para determinar su correlación con la actividad antioxidante, se empleó el método Folin-Ciocalteu y cuantificó el CFT de las muestras

¹⁷⁴ TELES, Feitosa, et al. Amino and organic acids of the prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* L.). En: J.Sci. Food Agric., 1984, vol. 35, no 4., p.421-425.

¹⁷⁵ BETANCOURT. Op, cit., p. 96-97

¹⁷⁶ STINTZING. 2002b. Op. cit., p. 2303

¹⁷⁷ CEJUDO-BASANTE, María Jesús, et al. Betalain Profile, Phenolic Content, and Color Characterization of Different Parts and Varieties of *Opuntia ficus-indica*. En: J. Agric. Food Chem., 2014, vol. 62, no 33., p. 8491-8499.

¹⁷⁸ BETANCOURT. Op, cit., p. 96-97.

En la tabla 6 se presentan los valores de absorbancia promedio y las desviaciones estándar (D.E) con los cuales se construyó la recta de calibrado usando ácido gálico (AG) como patrón. Mediante el método de los mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de correlación 6, donde A es la absorbancia medida a 765 nm y C la concentración de A.G en mg/L, la representación gráfica de la recta se muestra en la (figura 25).

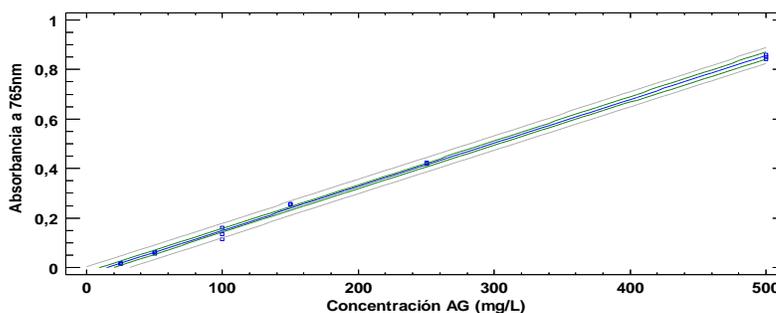
$$A = -0,0263 + 0,0018*[C] \text{ mg/L Ecuación 6}$$

Tabla 6. Datos para construcción de la recta de calibrado para CFT con patrón de ácido gálico

| Concentración de AG (mg/L) | Absorbancia* ± DE ^a |
|----------------------------|--------------------------------|
| 25 | 0,016 ± 0,002 |
| 50 | 0,060 ± 0,003 |
| 100 | 0,137 ± 0,024 |
| 150 | 0,255 ± 0,002 |
| 250 | 0,420 ± 0,003 |
| 500 | 0,851 ± 0,009 |

*Promedio de 3 mediciones, ^a Desviación estándar de tres réplicas (n = 3)

Figura 25. Curva de calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales



Fuente: esta investigación

Se observa que en el rango evaluado (25-500mg/L) existe alto grado de linealidad, que se corrobora con los valores cercanos a 1 del coeficiente de correlación (r) y determinación (r²) mostrados en la tabla 7. El valor r indica que existe una correlación directa y relativamente fuerte entre las variables, lo cual se considera estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95,0% (p<0,05). Los parámetros estadísticos, registrados permiten inferir que el modelo lineal establecido para la recta de calibración es adecuado y puede ser utilizado para estimar por interpolación la concentración fenólica de las muestras. Los valores del CFT se registran en la tabla 8, expresados

como mg de ácido gálico por gramo de extracto o fracción seca (mg AG/ g muestra)

Tabla 7 Estadísticas de la regresión lineal del método de Folin-Ciocalteu

| Parámetro | Estimado |
|---|-------------------------------|
| Intercepto (a) | -0,0263 ± 0,0047 ^a |
| Pendiente (b) | 0,0018 ± 0,0003 ^b |
| Coefficiente de correlación (r) | 0,9990 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | 0,9980 |

^{a, b} Desviación estándar con n=3

Tabla 8. Contenido fenólico total en los extractos y fracciones de *Opuntia ficus-indica* (L) Mill.

| Muestra | CFT^a mg AG* /g muestra seca |
|----------------|---|
| ECM | 34,43 ± 0,4390 |
| EPM | 24,79 ± 0,5020 |
| FA | 14,71 ± 0,1790 |
| FR | 235,03 ± 7,628 |
| ECU | 19,28 ± 0,3400 |

^a Datos con ± DE de tres replicas, * ácido gálico

El análisis estadístico, con la prueba de múltiples rangos, que compara las muestras y designa los grupos homogéneos alineando la "X" en la misma columna (tabla 9), y la gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Anexo G) indican que existen diferencias estadísticamente significativas entre el CFT de la mayoría de las muestras, a excepción de ECU-EPM y ECU-FA. Se destaca que la fracción roja (FR) es quien tiene el mayor contenido de compuestos fenólicos (235,03 mg AG/g muestra) seguido del ECM (34,43 mg AG/ g muestra) y la fracción amarilla (FA) es quien presenta el menor CFT. El mayor valor del contenido fenólico de la FR está en concordancia con lo publicado en la literatura^{179, 180} ya que esta fracción está enriquecida en betacianinas las cuales presentan en su estructura varios grupos hidroxilo sobre estructuras aromáticas, que como se sabe aportan positivamente a esta prueba¹⁸¹. Es importante resaltar también que el contenido fenólico del EPM es menor a encontrado en el ECM, es decir que en el proceso de purificación se eliminaron compuestos que pueden aportar significativamente al contenido de fenoles totales. Por su parte el ECM tiene un valor del CFT dos veces mayor que el ECU, esto indica que el proceso de extracción por maceración favorece no solo la concentración de

¹⁷⁹ BUTERA. Op. cit., p. 6895-6901.

¹⁸⁰ ESCRIBANO. Op. cit., p. 124-127.

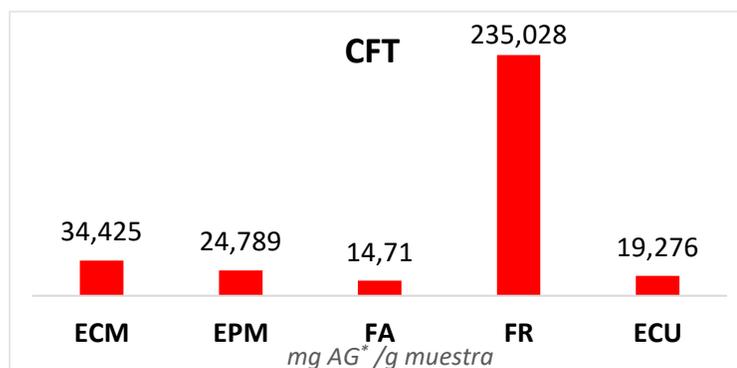
¹⁸¹ ROVER. Op. cit., p. 367

pigmentos betalaínicos sino también el contenido fenólico total, reiterando que la EMQ resulta ser mejor para aislar extractos ricos en betalaínas en las tunas fuente de esta investigación. Los resultados del CFT se representan mejor en el diagrama de barras de la (figura 26), evidenciándose el siguiente orden decreciente FR>ECM>EPM>ECU>FA.

Tabla.9. Prueba de múltiples rangos para CFT

| Muestra | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|---------|-------|---------|-------------------|
| FA | 3 | 14,7105 | X |
| ECU | 3 | 19,276 | XX |
| EPM | 3 | 24,7889 | X |
| ECM | 3 | 34,4253 | X |
| FR | 3 | 235,028 | X |

Figura 26. Diagrama de barras del CFT en extractos y fracciones



Fuente: esta investigación

Con el propósito de comparar los resultados de esta investigación con datos publicados en la literatura, en la tabla 10 se observa el CFT en otras fuentes de betalaínas. Se evidencia que el CFT de los extractos crudos de *Opuntia ficus indica* (L) Mill., es mucho mayor al de pitaya (*Hylocereus Undatus*) de 17,250 mgAG/100g y menor al reportado por Betancourt en las tunas de *O.dillenii*. Las diferencias observadas en los valores del CFT de las tunas de este estudio en comparación con las investigaciones previas pueden deberse a las diferencias en las condiciones de extracción de las muestras, por ejemplo: distintos tiempos de extracción, composición y cantidad de solvente empleado y también a variaciones en los mismos ensayos para determinar el CFT, que al final pueden influir en los valores de contenido fenólico reportado.

Tabla 10. Comparación del contenido fenólico total en diferentes frutos de cactáceas

| Muestra | CFT (mg AG/100g frutos fresco) | Método de extracción | Solvente de extracción | Referencia |
|--|---------------------------------------|-----------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>O. ficus indica (L.) Mill</i> | 258,190 | Maceración | Metanol : HCl 1%(95:5 v/v) | Esta investigación |
| | 237,095 | Ultrasonido | | |
| Pitaya <i>Hylocereus Undatus (Haw.)</i> | 17,250 | Maceración | Etanol : agua(50:50 v/v) | Chen et al. ¹⁸² |
| Fruta de dragón <i>H. undatus</i> | 20,14 | Maceración | Etanol: agua (50:50 v/v) | Wee y Wee ¹⁸³ |
| <i>O. Ficus-indica (purpura)</i> | 89,23 | Maceración | Etanol: ácido fórmico : agua(50:5:45 v/v/v) | Albano et al. ¹⁸⁴ |
| <i>O. undulata</i> | 164,60 | Maceración | Agua | Fernández, et al. ¹⁸⁵ |
| <i>O. stricta</i> | 204,4 | Maceración | Agua | Fernández, et al. |
| <i>O. Ficus-indica M. cv.Reyna</i> | 209,1 | ultrasonido | Metanol: agua (80:20v/v) | Corral-Aguayo et al. ¹⁸⁶ |
| <i>O.dillenii</i> | 311,61 | Maceración | agua | Betancourt. ¹⁸⁷ |

4.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

4.6.1 Método TEAC

Se determinó la actividad antioxidante de las muestras ECM (4112ppm), EPM (9050ppm), FA (19462ppm), FR (3825ppm) y ECU (16212ppm) mediante el método

¹⁸² CHEN, Guan-Lin, et al. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestión. En: Indust. Crops Prod., 2014, vol. 57, p.150-157.

¹⁸³WEE, Sim Choo and Wee, King Yong. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits .En: Adv.Appl.Sci.Res., 2011, vol. 2, p.418-425.

¹⁸⁴ALBANO, Clara, et al. Betalains, Phenols and Antioxidant Capacity in Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] Fruits from Apulia. En: Antioxidants, 2015, vol 4., p. 269-280.

¹⁸⁵ FERNANDEZ. 2010. Op. cit., p. 256

¹⁸⁶ CORRAL-AGUAYO, Rene, et al. Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. En: J. Agric. Food Chem., 2008, vol. 56, p. 10498-10504.

¹⁸⁷ BETANCOURT. Op. cit., p. 77.

TEAC de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.9.1. Usando los datos obtenidos con el patrón de Trolox (tabla 11) se construyó una curva de calibración que se observa en la (figura 27). La ecuación de la recta resultante (ecuación 7) tiene una pendiente negativa (-0,4316) que indica la decoloración que sufre el catión radical ABTS⁺ al reaccionar con el antioxidante. Los parámetros estadísticos (anexo H) del modelo de regresión lineal indican que este es aplicable dentro del rango de concentraciones evaluado (0,1-2,0mM) y por tanto se puede utilizar para predecir por interpolación la capacidad antioxidante de las muestras. El coeficiente de correlación negativo y cercano a 1 ($r=-0,997$) muestra una correlación relativamente fuerte e inversa entre las variables y el coeficiente de determinación ($r^2= 0,994$) indica que el ajuste del modelo lineal es bueno.

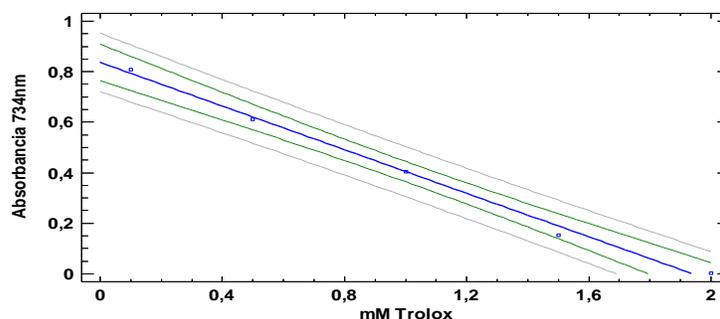
$$y(A)= 0,8361-0,4316x \text{ (mM) Ecuación 7}$$

Tabla 11. Datos para método TEAC con patrón de Trolox

| TROLOX mM | Absorbancia* ± DE^a |
|------------------|--------------------------------------|
| 0,1 | 0,809 ± 0,011 |
| 0,5 | 0,612 ± 0,001 |
| 1 | 0,404 ± 0,002 |
| 1,5 | 0,153 ± 0,002 |
| 2 | 0,001 ± 0,001 |

*Promedio de tres mediciones, ^a desviación estándar n=3

Figura 27. Recta de calibración con Trolox para método TEAC.



Fuente: esta investigación.

Con el propósito de verificar la funcionalidad del método se determinó la eficiencia antirradical de un antioxidante de referencia (ácido ascórbico A.A.), este presentó un valor TEAC de $1,013 \pm 0,062$ mmol Trolox/mmol A.A, que es cercano al reportado por Re¹⁸⁸ ($1,05 \pm 0,02$ mmol Trolox/mmol A.A) con un porcentaje de error de 3,52%.

¹⁸⁸ RE. Op. cit., p. 1231-1237.

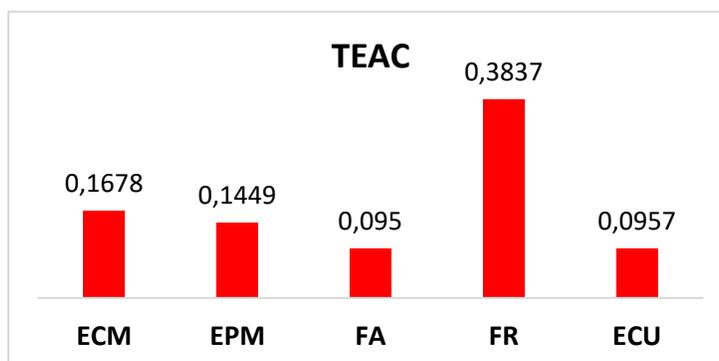
En la tabla 12 se presentan los valores promedio de la capacidad antioxidante TEAC para las muestras y se expresaron en mmol de trolox por cada gramo de extracto o fracción usada (mmol Trolox/ g muestra). El análisis estadístico (ver anexo I) muestra que existen diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza al 95%, $p < 0,05$) entre las muestras, excepto entre el ECU y la FA, que fueron las muestras con menor actividad antirradical y tienen valores TEAC casi cuatro veces menores que la FR que presentó el valor TEAC más alto (0,3837 mmol Trolox/ g muestra). En la (figura 28) se observa que la capacidad para capturar el radical libre ABTS^{•+} tiene un comportamiento similar y sigue la misma tendencia al encontrado en el CFT (FR>ECM>EPM>ECU>FA). También se logró evidenciar que existe una satisfactoria correlación entre el contenido fenólico total (CFT) y la actividad antirradical TEAC de los extractos y fracciones de *O. ficus-indica*, en este caso se encontró un $r^2=0,9817$ como se puede ver en la (figura 29).

Tabla. 12. Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox en los extractos y fracciones

| Muestra | TEAC^a mmolTrolox/g muestra seca |
|----------------|---|
| ECM | 0,1678 ± 0,0086 |
| EPM | 0,1449 ± 0,0005 |
| FA | 0,0950 ± 0,0002 |
| FR | 0,3837 ± 0,0015 |
| ECU | 0,0957 ± 0,0005 |

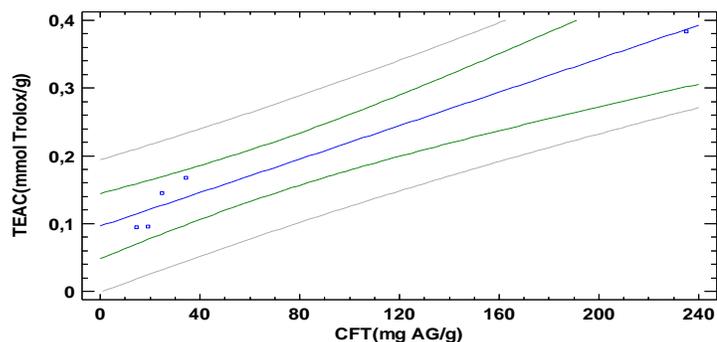
^a Datos con ± DE tres replicas

Figura 28. Diagrama de barras de valores de TEAC (mmol TROLOX / g muestra)



Fuente: esta investigación

Figura 29. Gráfica de correlación entre el CFT y la actividad antioxidante TEAC.



Fuente: esta investigación

La capacidad para capturar radicales ABTS de las muestras analizadas es significativa con respecto a los resultados reportados por otros autores y que se presentan en la tabla 13, donde se muestra los valores TEAC (respecto a los gramos de fruto fresco procesado) de diferentes frutos del género *Opuntia* y se puede evidenciar que los valores encontrados tanto para el ECM y ECU son menores solo en comparación con los de *O. dillenii* y *O. streptacantha*.

Tabla 13. Valores TEAC en frutos del género *Opuntia*

| Muestra | | TEAC* | Referencia |
|--|-----|--------------|------------------------------------|
| <i>O. ficus-indica</i> (L.)Mill | ECM | 1,262 | Esta investigación |
| | ECU | 1,177 | |
| <i>Tuna M. cv.Reyna</i> | | 0,650 | Corral-Aguayo et al ¹⁸⁹ |
| <i>O. streptacantha</i> (tuna Cardona) | | 4,311 | Cardador ¹⁹⁰ |
| <i>O. ficus-indica</i> (purpura) | | 0,610 | Albano et al. ¹⁹¹ |
| <i>O. robusta</i> Wendl | | 0,816 | Stintzing et al ¹⁹² |
| <i>O. stricta</i> | | 0,518 | Fernández, et al. ¹⁹³ |
| <i>O. undulata</i> | | 0,158 | Fernández, et al. |
| <i>O. dillenii</i> | | 3,53 | Betancourt ¹⁹⁴ |

* mmol trolox /100g fruto fresco

¹⁸⁹ CORRAL-AGUAYO. Op. cit., p 10501

¹⁹⁰ CARDADOR, Anaberta, et al. Revalorization of cactus pear (*Opuntia spp.*) wastes as a source of antioxidants. En: Fod Sci. Technol., 2011, vol. 31, no 3.

¹⁹¹ ALBANO. Op. cit., p 276

¹⁹² STINTZING.2005. Op. cit., p 444

¹⁹³ FERNANDEZ.2010. Op. cit., p. 256

¹⁹⁴ BETANCOURT. Op. cit., p. 101

5.6.2 Método DPPH

La metodología utilizada para calcular la actividad antioxidante para el radical DPPH• se describe con anterioridad. Este radical presenta una absorbancia característica a 515 nm y en presencia de un compuesto antioxidante su color cambia de violeta a amarillo y su absorbancia disminuye. La actividad antirradical se calculó a partir de curvas estándar (dosis-respuesta) que relacionan el % de inhibición de DPPH Vs la concentración de antioxidante (Anexo J). En la (figura 30) se muestran los datos con los cuales se construyó la curva dosis-respuesta para el ECM y las ecuaciones de correlación encontradas para las demás muestras evaluadas se indican en la tabla 14, donde también se muestra los datos obtenidos para el ácido ascórbico usado como patrón positivo (Anexo K) y que es un antioxidante catalogado con una buena eficiencia anti-radical. Los parámetros estadísticos r^2 muy cercanos a la unidad, demuestran que existe una correlación muy fuerte entre las variables y hay alto grado de linealidad, por tanto, las predicciones realizadas a partir de estos modelos son confiables.

Figura 30. Curva dosis-respuesta del ECM para método DPPH

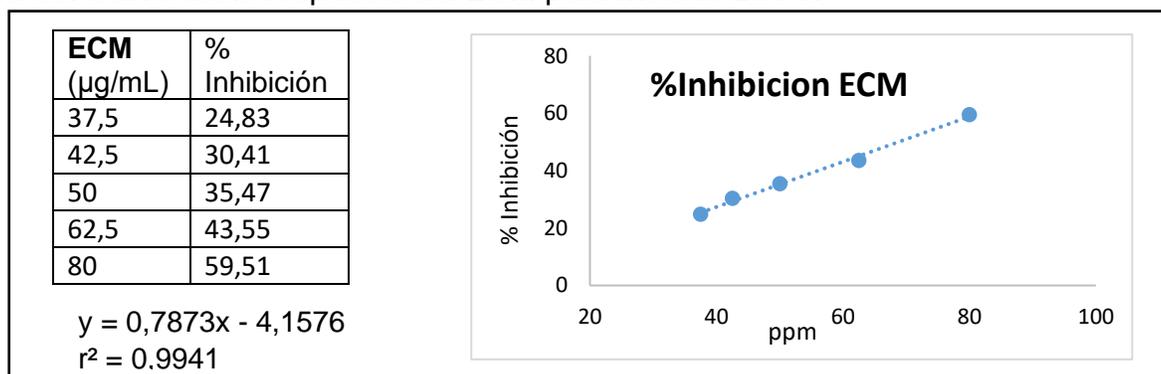


Tabla 14. Ecuaciones de correlación para el método DPPH

| Muestra | Ecuación de correlación | r^2 |
|---|-------------------------|--------|
| ECM | $y = 0,7873x - 4,1576$ | 0,9941 |
| EPM | $y = 0,5255x - 2,0865$ | 0,9943 |
| FA | $y = 0,6002x - 15,808$ | 0,9981 |
| FR | $y = 1,366 x + 11,026$ | 0,9907 |
| Ácido Ascórbico(Control Positivo) | $y = 17,13 x - 20,043$ | 0,9964 |

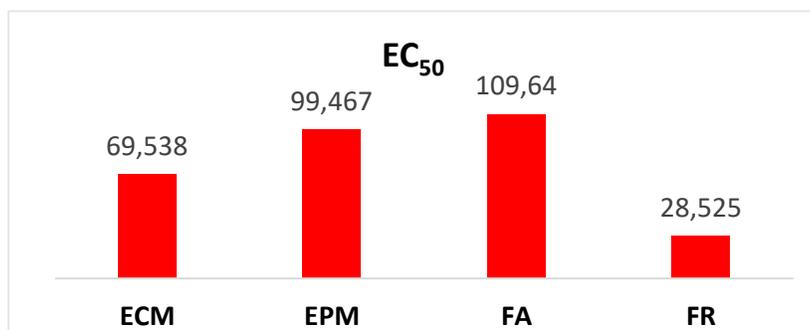
Los resultados de la capacidad antioxidante generalmente se expresan en términos de EC_{50} , definido como la concentración de antioxidante necesario para disminuir la concentración del radical DPPH• en un 50%. Los valores EC_{50} obtenidos por el cálculo del estimado x_0 a partir de las ecuaciones de las rectas de cada muestra, se registran en la tabla 15 y se representan gráficamente en la (figura 31). Entre menor sea el valor EC_{50} , mayor es la capacidad antioxidante frente al radical DPPH•, por tanto, la fracción rica en betacianinas (FR) fue la muestra que presentó la mayor capacidad de reducir la concentración inicial del radical. Cabe destacar que para el ácido ascórbico se obtuvo un valor de EC_{50} de $4,088 \pm 0,202 \mu\text{g}/\text{mL}$, similar al publicado por Lee et al¹⁹⁵ ($3,2 \mu\text{g}/\text{mL}$). Por otro lado, el análisis estadístico (ver Anexo L) indicó que entre todas las muestras existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% y se sigue la misma tendencia (FR>ECM>EPM>FA) que en los métodos del CFT y TEAC, siendo la FR la de mayor contenido fenólico y mayor capacidad antirradical y la FA la que presenta valores más bajos en todos los casos.

Tabla 15. EC_{50} de extractos y fracciones de *O. ficus-indica* (L.) Mill

| Muestra | $EC_{50} \pm DE$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
|------------------------|---|
| ECM | $68,79 \pm 0,548$ |
| EPM | $99,12 \pm 0,979$ |
| FA | $109,64 \pm 0,923$ |
| FR | $28,53 \pm 0,608$ |
| Ácido ascórbico | $4,088 \pm 0,202$ |

*Datos con \pm DE tres réplicas

Figura 31. Diagrama de barras de valores de EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de extractos y fracciones



Fuente: esta investigación

¹⁹⁵ LEE, Jeong-Chae, et al. Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. En: J. Agric. Food Chem., 2002, vol. 50, p. 6490–6496.

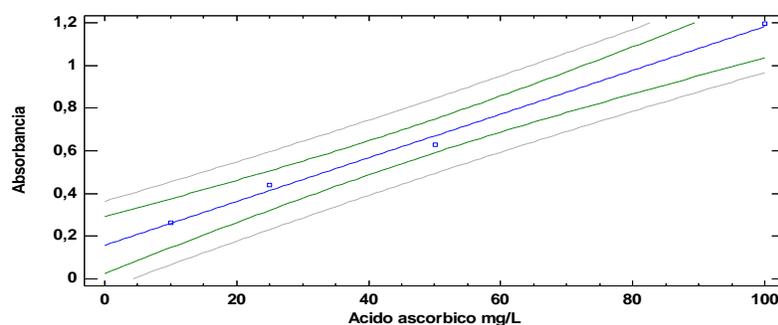
Realizando una comparación de la capacidad antioxidante frente al radical DPPH•, los extractos de los frutos de cactáceas presentan valores EC₅₀ mayores a los reportados en antioxidantes comunes como el ácido ascórbico (3,2µg/mL), conocido por tener muy alta eficiencia antirradical que relaciona la concentración y el tiempo para estabilizar el radical DPPH•.¹⁹⁶ También el valor EC₅₀ de los extractos de frutos de *O. ficus-indica* (L.) Mill resulta ser mayor al reportado por Lee et al de 9,3 µg/mL¹⁹⁷ en la fruta de dragón roja (*O. ficus-indica* var. *Saboten*).

4.6.3 Método FRAP

Otro método espectrofotométrico para medir la capacidad antirradical de extractos naturales es el método FRAP que determina el poder reductor total de las muestras, la metodología empleada se describe en la sección 3.9.3. El poder antioxidante en la reducción férrica se midió en el ECM, EPM, FA y FR, para ello se construyó una curva de calibrado (figura 32) a partir del promedio de datos obtenidos con patrón de ácido ascórbico. La ecuación de la recta resultante (ecuación 8), con coeficiente de correlación ($r=0,997$) y coeficiente de determinación ($r^2=0,995$) cercanos a la unidad demuestran una fuerte relación entre las variables (con significancia del 95%) y alto grado de linealidad y el valor de la pendiente ($b=0,0103$) indica una buena sensibilidad de la recta en el rango estudiado (10-100mg/L)

$$y=0,1568 + 0,0103x \text{ (mg/L) Ecuación 8}$$

Figura 32. Recta de calibrado con ácido ascórbico para método FRAP



Fuente: esta investigación

Los valores del poder reductor que se obtuvieron de la recta de regresión se expresaron en mg de ácido ascórbico por cada gramo de extracto o fracción seca (mg AA/g), se muestran en la tabla 16 y se representan gráficamente en la (figura 33).

¹⁹⁶ SÁNCHEZ-MORENO, Concepción; LARRAURI, Jose and SAURA, Fulgencio. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. En: J. Sci. Food Agric., 1998, vol. 76, no. 2, p. 270-276.

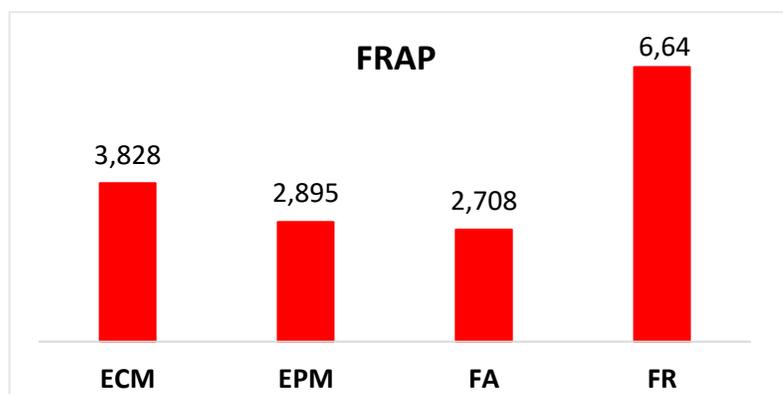
¹⁹⁷ LEE, et al. Op. cit., p. 6492

Tabla 16. Poder antioxidante en la reducción férrica de los extractos y fracciones de *O. ficus-indica* (L.) Mill.

| Muestra | FRAP^a mg AA* /g muestra seca |
|----------------|--|
| ECM | 3,828 ± 0,075 |
| EPM | 2,895 ± 0,277 |
| FA | 2,708 ± 0,059 |
| FR | 6,640 ± 0,052 |

^a Datos con ± DE con n= 3, * ácido ascórbico

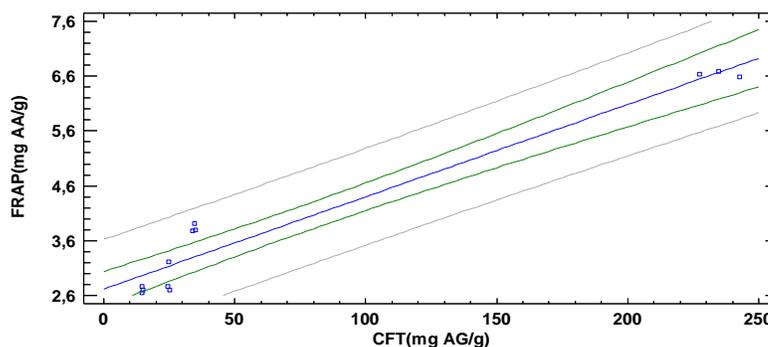
Figura 33. Diagrama de barras de valores FRAP (mgAAE/g muestra)



Fuente: esta investigación

El análisis de los datos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y la prueba de múltiples rangos (ver anexo M) permitió establecer que existen diferencias significativas ($p < 0.05$, nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores FRAP de las muestras, excepto entre el EPM y FA, que presentaron los valores más bajos del poder reductor y se destaca que la FR es la más antioxidante ($6,640 \pm 0,052$ mgAAE/g) con el doble del poder reductor respecto a las demás muestras evaluadas. Se evidencia que los valores FRAP siguen con la misma tendencia decreciente ($FR > ECM > EPM > FA$) que en los métodos TEAC y DPPH y también se logró demostrar la fuerte correlación que existe entre el contenido fenólico de cada muestra y el poder reductor, tal como se muestra en la (figura 34) con un coeficiente de correlación cercano a la unidad ($r = 0,997$).

Figura 34. Correlación entre el contenido fenólico y el poder reductor FRAP



Fuente: esta investigación

Al comparar los valores FRAP de las tunas de *O. ficus-indica* con otras fuentes de la familia de cactáceas se evidencia que el poder reductor del extracto crudo obtenido por maceración ECM es mayor (1,263mg AA/g fruto seco) al reportado por Li et al¹⁹⁸ en *A. hypochondriacus* (0,722mgAA/g fruto seco), pero menor al valor FRAP que menciona el mismo autor en la especie *A. caudatus* (1,744mgAAE/g fruto seco).

En la tabla 17 se presenta un consolidado de los resultados obtenidos para las metodologías CFT, TEAC, DPPH y FRAP desarrolladas en las diferentes muestras aisladas de *O. ficus-indica* (L.) Mill.

Tabla 17. Contenido fenólico total, TEAC, DPPH y FRAP para muestras de los frutos de *O. ficus-indica*.

| Muestra | CFT* mgAG/g muestra | TEAC* (mmol trolox/g muestra) | DPPH EC50 (µg/mL) | FRAP* (mg AA/g muestra) |
|----------------|------------------------------------|--|------------------------------|--|
| ECM | 34,425 ± 0,439 | 0,1678 ± 0,0086 | 69,538 ± 0,548 | 3,828 ± 0,075 |
| ECU | 19,276 ± 0,340 | 0,0957 ± 0,0005 | --- | --- |
| EPM | 24,789 ± 0,502 | 0,1449 ± 0,0005 | 99,467 ± 0,979 | 2,895 ± 0,277 |
| FA | 14,710 ± 0,179 | 0,0950 ± 0,0002 | 109,643 ± 0,923 | 2,708 ± 0,059 |
| FR | 235,028± 7,628 | 0,3837 ± 0,0015 | 28,525 ± 0,608 | 6,640 ± 0,052 |

*Promedio de tres replicas

¹⁹⁸ LI, Hongyan, et al. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. En: J. Food Compos. Anal., 2015, vol.37, p. 75-81.

Como se observa la FR, enriquecida de betacianinas presenta la mayor capacidad antirradical por los tres métodos evaluados y también es la que contiene mayor contenido fenólico, así se concluye que la fracción menos polar (de color rojo) es la que aportan con mayor significancia a la capacidad antioxidante de los extractos en los frutos estudiados. Se evidencia que los valores TEAC y CFT del ECU son menores a los encontrados en el ECM, de esta forma se comprueba que el método de extracción tradicional por maceración en este caso, mejora no solo el aislamiento de pigmentos betalaínicos sino también el poder antirradical y contenido fenólico, en comparación con el extracto obtenido por ultrasonido en los frutos de *O. ficus-indica* del departamento de Nariño.

Es importante mencionar que los métodos ABTS, DPPH y FRAP son ensayos simples que dan una idea aproximada de lo que puede suceder en situaciones complejas *in vivo* y a pesar, de que en estas pruebas no se usan radicales fisiológicos, son muy útiles para hacer una estimación del poder antirradical de extractos vegetales, sin embargo, se debe considerar que estos ensayos no son específicos y que la capacidad antioxidante de las muestras se puede deber a la presencia de otros compuestos fenólicos y/o a efectos sinérgicos del medio.

También se resalta la importancia de usar varios métodos para medir la actividad antioxidante total de manera *in-vitro*, pues a través de cada uno se puede hacer un aproximado del mecanismo de acción de los antioxidantes presentes en los extractos aislados de los frutos. Por un lado, el método TEAC permite medir la actividad antirradical frente al ABTS* mediante el mecanismo de transferencia electrónica (figura 11) del antioxidante al radical para estabilizarlo; de igual manera el método FRAP permite determinar el poder reductor total de los extractos mediante la transferencia electrónica que hace la muestra y reduce el ión férrico¹⁹⁹. Por el contrario, el método DPPH es una técnica que ayuda a medir la actividad antioxidante mediante el mecanismo de transferencia de hidrogeno^{200,201}, estabilizando el radical DPPH•. De esta manera, al evaluar los tres métodos anteriores se hace un mejor acercamiento del poder antirradical total que pueden tener los extractos y sus beneficios nutracéuticos si estos son usados como aditivos en la industria.

4.7 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR POR COLORIMETRÍA TRIESTIMULO.

4.7.1 Análisis Preliminar

¹⁹⁹ HUET, Cristina. Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Trabajo de grado Farmacia. España: Universidad Complutense, 2017. 20 p.

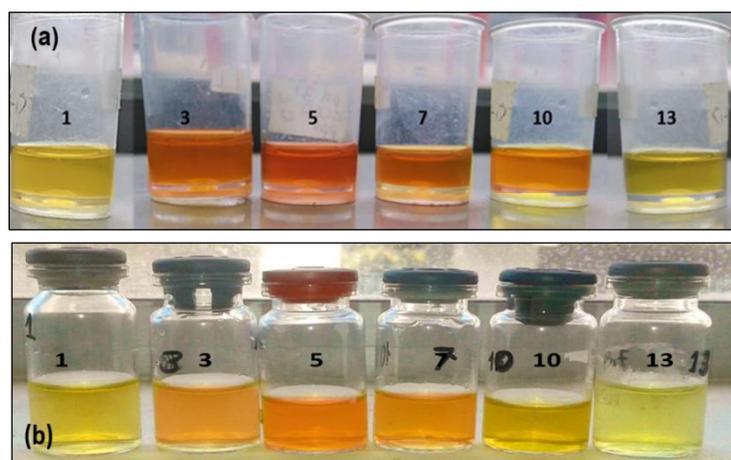
²⁰⁰ GOUPY, Pascale, et al. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. En: J. Agric. Food Chem. 2003, vol. 51, p. 615-622.

²⁰¹ GUIJA-POMA, Emilio et al. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. En: Horiz Med. 2015, vol. 15, p. 57-60.

Se llevó a cabo un seguimiento de la estabilidad del color de los extractos ECM y EPM (extractos con mayor contenido de betalaínas) aislados de los frutos de *Opuntia ficus-indica*, con el fin de reproducir las posibles condiciones en las que podrían encontrarse las muestras al ser usadas como colorantes naturales en la industria. Inicialmente se seleccionaron las condiciones de análisis, se eligió las temperaturas de 4°C, 80°C y temperatura ambiente, las cuales se escogieron con el fin de cubrir y reflejar condiciones que puede sufrir un producto durante y luego de su procesamiento, como por ejemplo los productos de la industria alimenticia.

En cuanto al pH, las muestras se sometieron a diferentes valores: 1, 3, 5, 7, 10 y 13. En la (figura 35) se muestra los cambios de color de extractos al variar su pH, se observa que a pH 1 y valores de pH básicos (10 y 13), se presentan las variaciones de color más intensas en comparación al color inicial del extracto (pH=5). También se tomaron los espectros de absorción del ECM y EPM a los diferentes valores de pH y a temperatura ambiente, y se pudo confirmar cambios en los máximos de absorción característicos de las betalaínas. En la (figura 36) se puede evidenciar que a pH 5 se presentan los máximos de absorción tanto para ECM como para el EPM, y que hay desplazamientos y disminución de la absorbancia en las bandas características, a valores de pH muy ácidos (1) y básicos (10 y 13), esto debido a que las betalaínas pueden sufrir cambios estructurales como la escisión del enlace imino, isomerización y descarboxilaciones a consecuencias de las variaciones de pH y esto se evidencia en cambios en sus espectros de absorción^{202, 203}.

Figura 35. Variaciones de color de los extractos ECM y EPM a diferentes valores de pH

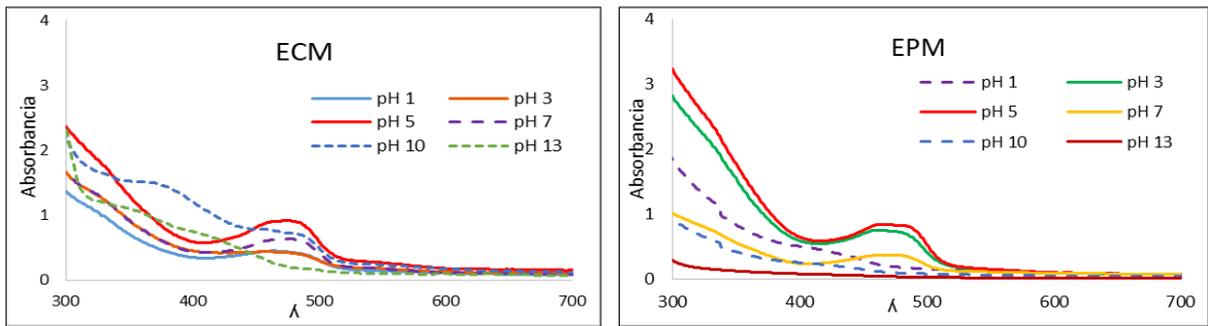


*En (a) ECM y en (b) EPM
Fuente: esta investigación

²⁰² SOCACIU. Op. Cit., p. 286

²⁰³ AZEREDO. Op. Cit., p. 2365

Figura 36. Cambios en los espectros de absorción para ECM y EPM a diferentes condiciones de pH y temperatura ambiente



Fuente: esta investigación

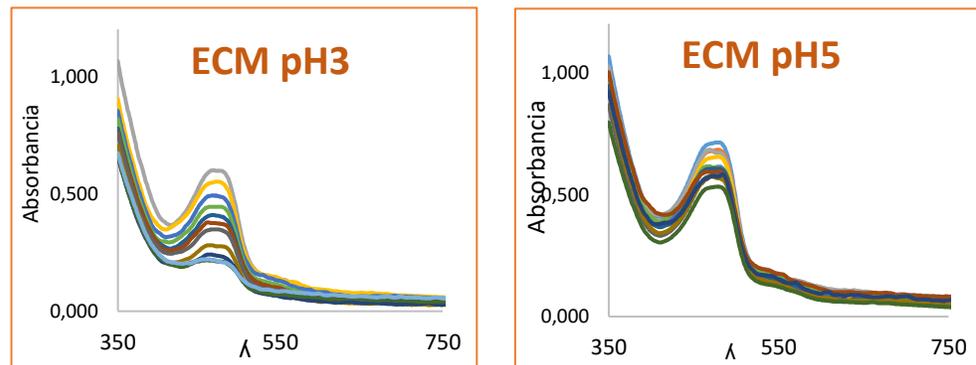
Considerando lo anterior, para la evaluación de la estabilidad del color del ECM y EPM se decidieron las condiciones de pH y temperatura que se muestran en la tabla 18, escogiendo los valores donde las betalaínas son más estables (pH: 3,5 y 7).

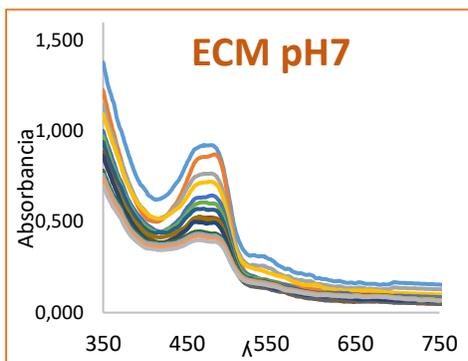
Tabla 18. Condiciones usadas para estudio de estabilidad del color.

| Muestra | Temperatura °C | pH | Tiempo |
|---------|----------------|-------|------------|
| ECM | 4 | 3,5,7 | 50 Días |
| | 15-20 | 3,5,7 | 50 Días |
| | 80 | 3,5,7 | 50 Minutos |
| EPM | 4 | 3,5,7 | 60 Días |
| | 15-20 | 3,5,7 | 50 Días |
| | 80 | 3,5,7 | 55 minutos |

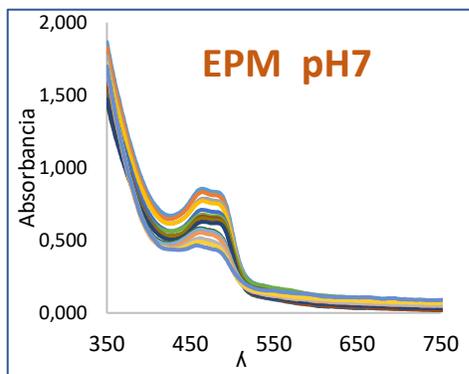
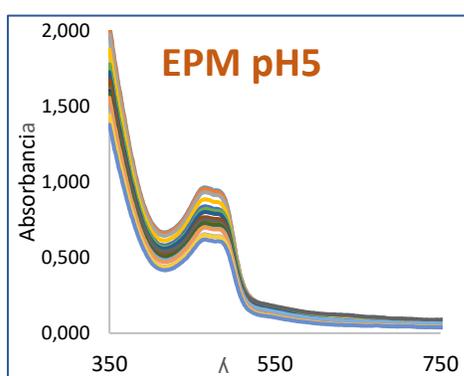
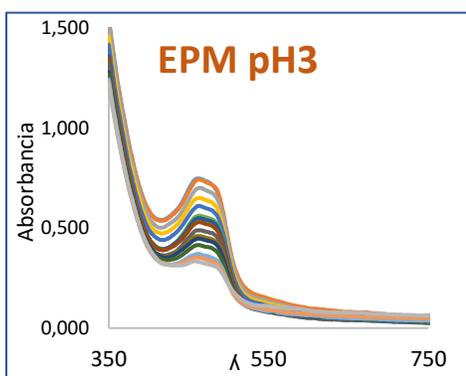
En las gráficas de la (figura 37) se muestra el comportamiento en el tiempo de los espectros de absorción de los extractos almacenados a 4°C y a los diferentes valores de pH estudiados y en el anexo N se puede ver la variación a temperatura ambiente y a 80°C. En todos los casos, se presenta disminución en los máximos de absorción característicos de las betalaínas durante el almacenamiento o calentamiento.

Figura 37. Comportamiento de ECM y EPM durante el almacenamiento a 4°C y diferentes condiciones de pH





(a)



(b)

* En (a): ECM a 4°C y en (b) EPM a 4°C.
Fuente: esta investigación

4.7.2 Características colorimétricas de ECM y EPM.

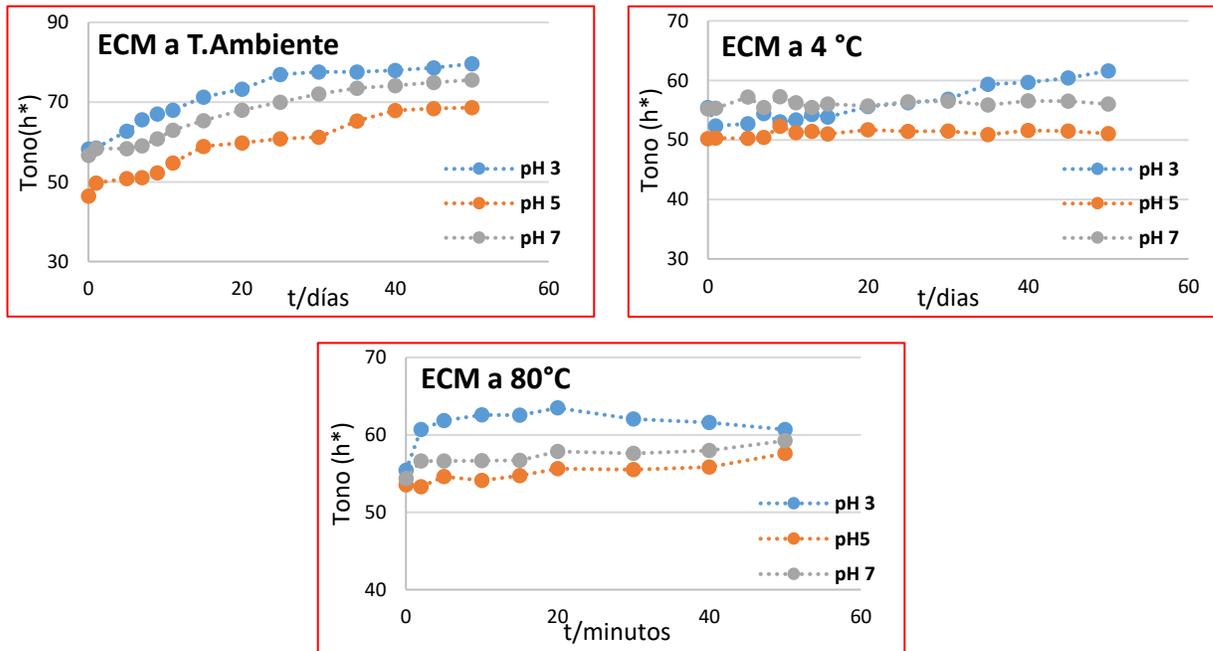
Se analizó el efecto de la temperatura y el pH sobre el color del extracto crudo y purificado obtenidos por maceración y se estudió las variaciones en los parámetros del espacio CIELab: L*(luminosidad), a*(eje rojo-verde) y b*(eje amarillo-azul), a partir de los cuales se determinó la diferencia de color (ΔE^*_{ab}) y calculó ángulo de tono (h_{ab}) y croma (C^*_{ab}) como características colorimétricas, para ello se siguió la metodología

descrita en el apartado 3.10 y los resultados se muestran a continuación.

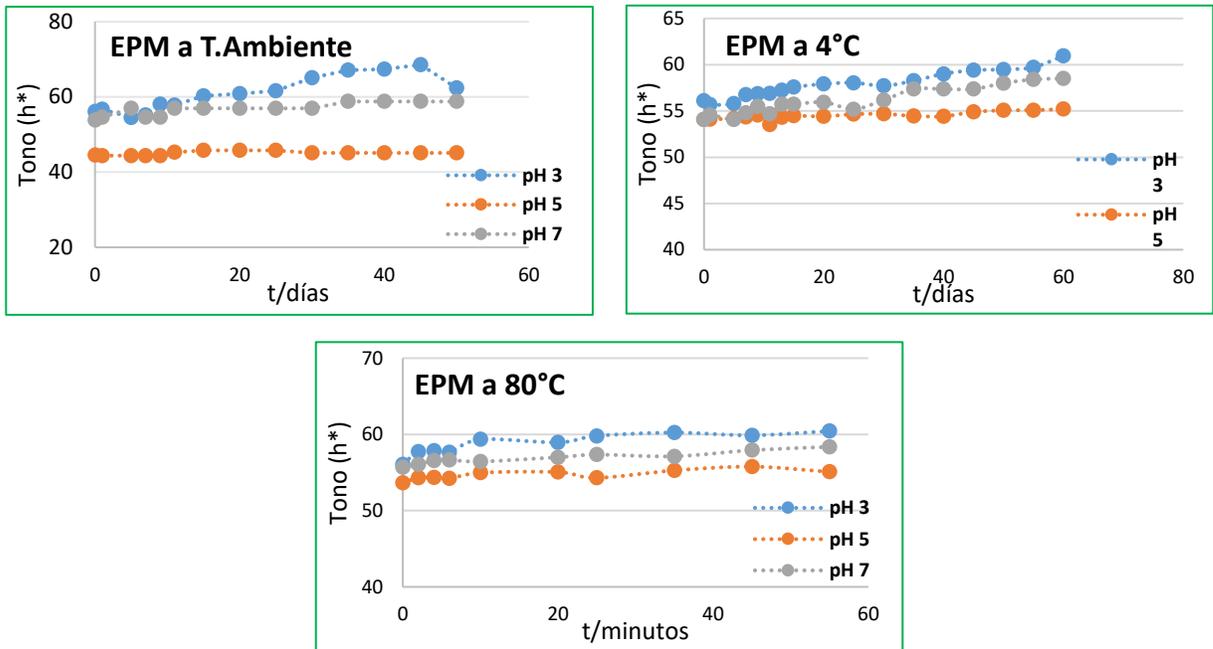
Cuando se analiza la variación del tono o matiz en los extractos acuosos de ECM (figura 38 y tabla 19) se evidencia que en el tiempo cero (t_0) las soluciones, independientemente del valor de pH o temperatura tienen una tonalidad cercana a 50, que corresponde a un color anaranjado, siendo a pH 5 donde el color es más rojizo (menor h^*_{ab}). En la tabla 19 se aprecia que después del almacenamiento o calentamiento los extractos a pH 5 presentan menor variación del h^*_{ab} y a pH 3 existe mayor cambio del matiz (mayor Δh^*_{ab}) a las tres temperaturas estudiadas, pasando de un tono anaranjado a tonalidades más amarillas con valores de h^*_{ab} mayores a 60. También se comprueba que a la temperatura de 4°C están los menores cambios del tono para el ECM.

En la figura 38(b) se observa que en el tiempo cero (t_0) el tono del EPM tiene menor valor a temperatura ambiente y pH 5, correspondiente a un color anaranjado-rojizo (45), y a las demás condiciones de pH y temperatura, las soluciones se tornan ligeramente más amarillas (mayor h^*_{ab}). En el EPM, de manera similar que en el ECM, a pH 5 se manifiestan las menores variaciones de h^*_{ab} , en la tabla 20 se aprecia que a este pH el tono permanece prácticamente constante en el tiempo a las tres temperaturas estudiadas y a pH 3 se presentan los cambios más grandes de esta característica colorimétrica en las muestras de EPM, aumentando el valor del h^*_{ab} y por tanto se obtuvo valores más altos de Δh^*_{ab} .

Figura 38. Variación del tono o matiz en ECM y EPM



(a)



(b)

Fuente: esta investigación

Tabla 19. Variaciones en los parámetros del color del ECM

| | T.A | | | 4°C | | | 80°C | | |
|-------------------|---------|---------|---------|--------|---------|--------|--------|-------------|--------|
| | pH3 | pH5 | pH7 | pH3 | pH5 | pH7 | pH3 | pH5 | pH7 |
| Δh^*_{ab} | 21,378 | 12,206 | 18,887 | 4,1899 | 0,8294 | 0,8294 | 5,2813 | 4,0603 | 4,885 |
| ΔL^* | 3,6500 | 2,0834 | -0,056 | 11,367 | -0,5308 | 1,9719 | 7,4877 | 4,1863 0 | 3,619 |
| ΔC^*_{ab} | -34,051 | -35,299 | -20,736 | - | - | - | - | -10,934 | - |
| | | | | 37,341 | 11,206 | 17,206 | 39,960 | | 11,578 |

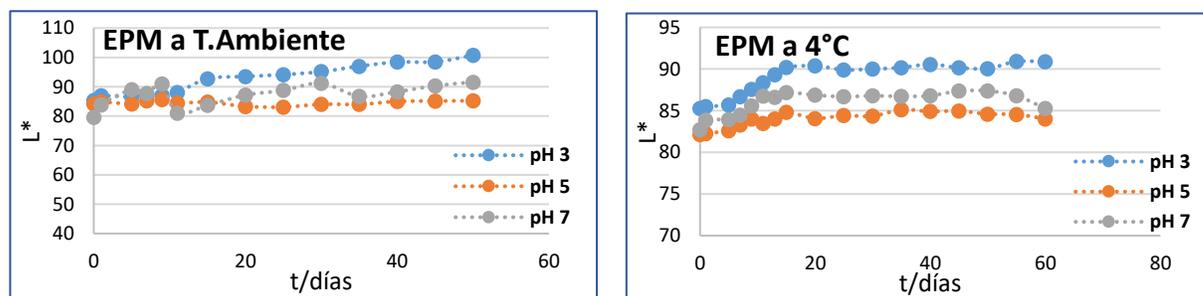
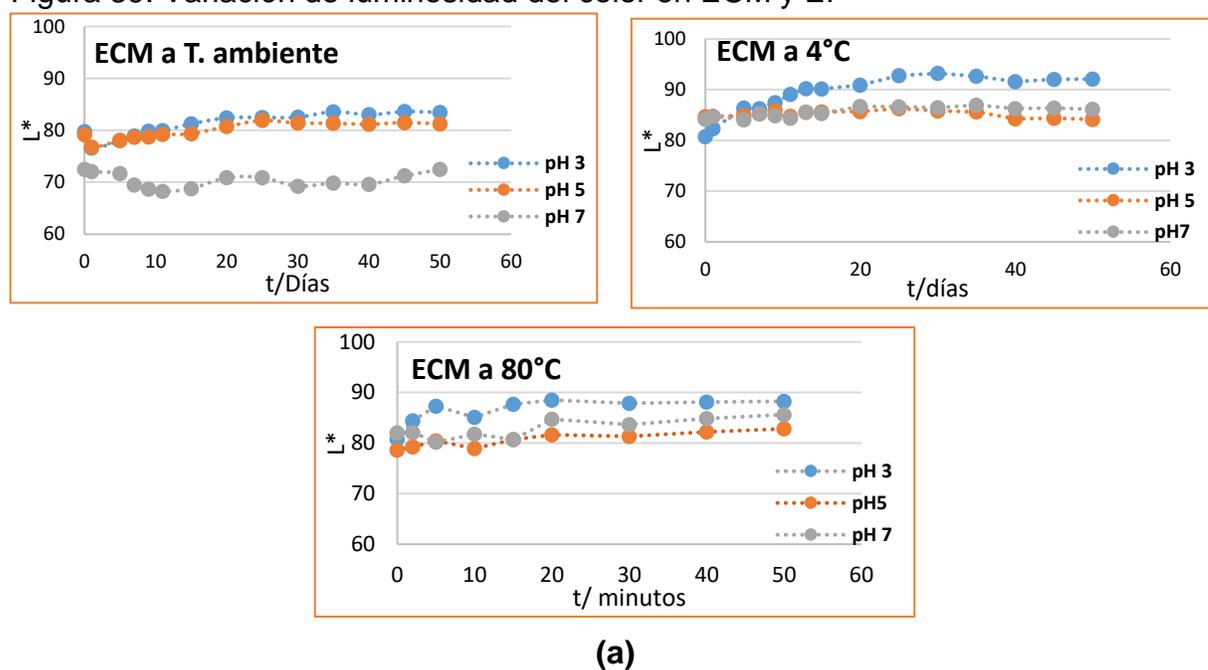
Tabla 20. Variaciones en los parámetros del color del EPM

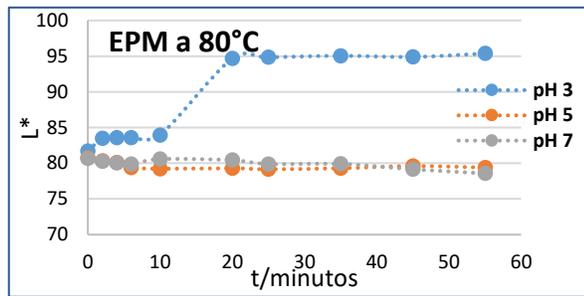
| | T.A | | | 4°C | | | 80°C | | |
|-------------------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|
| | pH3 | pH5 | pH7 | pH3 | pH5 | pH7 | pH3 | pH5 | pH7 |
| Δh^*_{ab} | 6,266 | 0,569 | 4,969 | 4,829 | 1,124 | 4,415 | 4,354 | 1,422 | 2,671 |
| ΔL^* | 15,445 | 1,121 | 3,013 | 5,594 | 1,862 | 2,575 | 13,678 | -1,374 | -2,079 |
| ΔC^*_{ab} | -27,154 | -12,335 | -13,907 | - | -16,678 | -25,704 | - | - | - |
| | | | | 34,031 | | | 31,285 | 11,806 | 12,445 |

De forma similar con la variación del tono, los cambios en la luminosidad (L^*) pueden apreciarse en la (figura 39) y los valores de los ΔL^* se muestran en la tabla 19 para ECM y tabla 20 para EPM. Se comprueba que para el ECM no hay grandes

cambios en L^* cuando se almacena a temperatura ambiente, independientemente del pH. A las temperaturas de 4°C y 80°C, hay ligeras variaciones de la luminosidad a pH 5 y 7, sin embargo pH 3 se aprecian los cambios mas significativos, las soluciones pasaron de tonos más oscuros en el tiempo cero (t_0) a colores mas claros (mayor L^*) despues del almacenameinto. En el caso del EPM a temperatura ambiente y a 4°C, la luminosidad de las soluciones no presenta cambios significativos a los valores de pH 5 y 7, pero si se evidencia aumento de L^* a pH 3. A 80°C hay un aumento en la luminosidad a pH 3 despues de 10 minutos de calentameinto, pero a pH 7 y pH 5, las soluciones se tornan ligeramente más oscuras (menor L^*) en comparación con la luminosidad de las soluciones iniciales, por eso se observa valores ΔL^* negativos.

Figura 39. Variación de luminosidad del color en ECM y EP



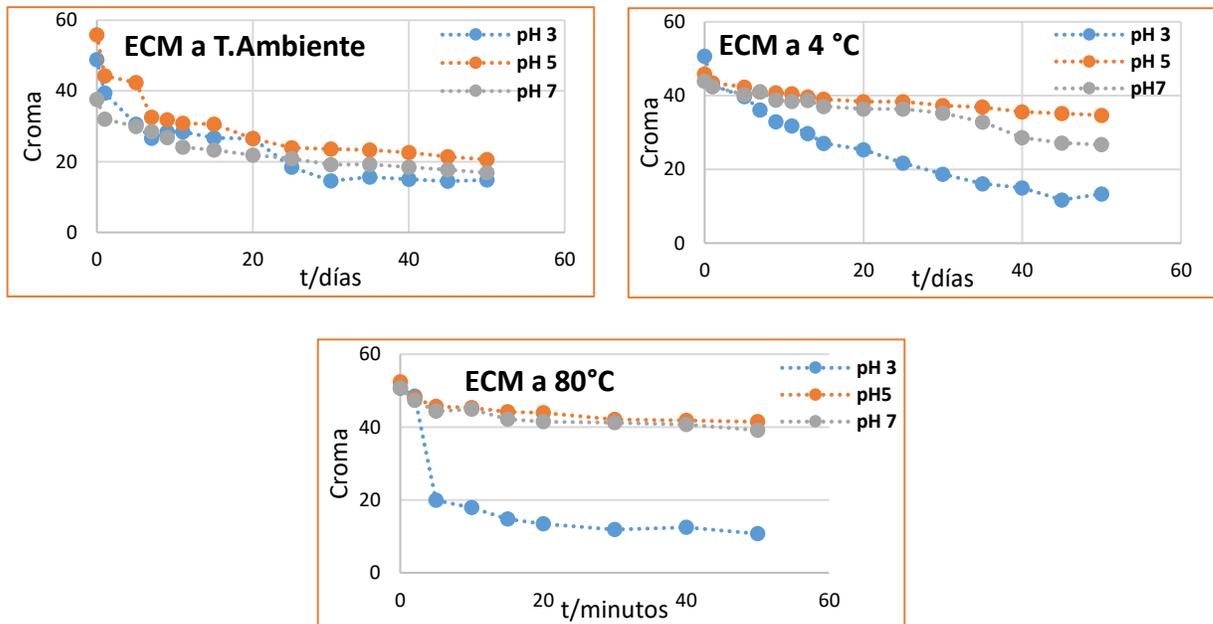


(b)

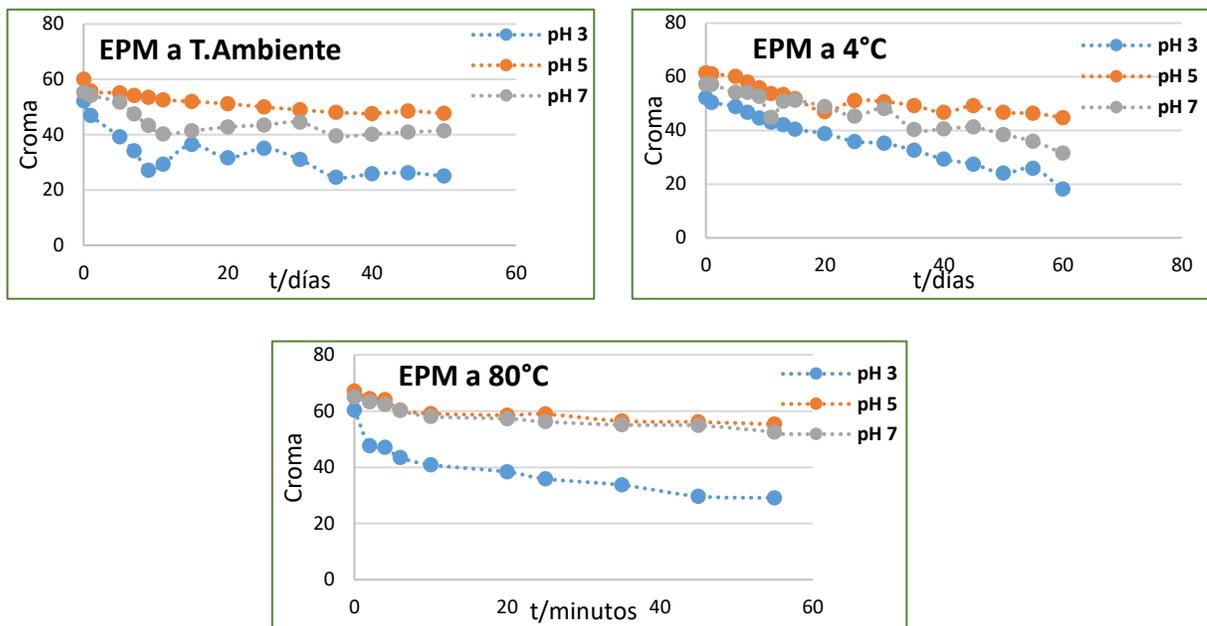
Fuente: esta investigación

En cuanto al croma C^*_{ab} o saturación del color, se observa (figura 40) que tanto para el ECM como para EPM este parámetro disminuye en el tiempo, es decir las soluciones perdieron brillo o pureza en su coloración. En el tiempo cero la mayor intensidad del color la presentan las soluciones a pH 5 independientemente de la temperatura, y a este valor de pH se presentan los cambios menos significativos de C^*_{ab} (menores valores de ΔC^*_{ab}) y por el contrario a pH 3 existe mayor variación del croma en el color de los extractos ECM y EPM a las tres temperaturas estudiadas.

Figura 40. Variación de croma C^*_{ab} en ECM y EPM



(a)



(b)

Fuente: esta investigación

Los cambios en las características del color de los dos extractos analizados (ECM y EPM) siguen una tendencia similar. Las soluciones iniciales evidencian la estabilidad del color de las muestras en todo el rango de pH examinado, ya que en el tiempo cero (t_0) los parámetros de color son cercanos entre todas las muestras al variar el pH. Se aprecia que antes del almacenamiento el ECM y EPM tienen coloración anaranjado-rojizo y de manera general, después del almacenamiento el cromata disminuye y la luminosidad y el tono aumentan ligeramente en todas las soluciones, obteniéndose al final colores menos brillantes (menor C^*_{ab}), más claros (mayor L^*) y con tonalidades más amarillas (mayor h^*_{ab}).

Los cambios de color de las soluciones se hicieron cuantificables calculando la diferencia de color ΔE^*_{ab} (ecuación 2), los cuales se muestran en las tablas 21 y 22. De acuerdo a lo mencionado por Sharma (2005), el delta E se mide en una escala de 0 a 100, donde 0 representa la menor diferencia y 100 una distorsión completa del color, cuando ΔE^*_{ab} es mayor a 2,0 el cambio en el color es apreciable por el ojo humano²⁰⁴. Considerando lo anterior, cuando el ECM se almacena a temperatura ambiente y pH 5 no se evidencian cambios perceptibles durante los primeros 20 días ($\Delta E^*_{ab} < 2$), cuando las condiciones de pH son más ácidas, hay cambios visualmente apreciables después de los primeros 5 días ($\Delta E^*_{ab} = 10,5$) y a pH 7 se logra percibir variación del color solo hasta el día 11 del almacenamiento ($\Delta E^*_{ab} = 6,18$). A 4°C el extracto crudo ECM tuvo menor variación del color en los primeros días, solo se percibe el cambio después del día 20 a los valores de pH 5 y 7, por el contrario a pH 3 se

²⁰⁴SHARMA, Gaurav; WU, Werncheng and Dalal, Edul. The CIEDE2000 Color-Difference Formula: Implementation Notes, Supplementary Test Data, and Mathematical Observations. En: Color Research & Application. 2005, vol. 30 (1), p. 21 - 30.

hace evidente la variación del color después del día 11 ($\Delta E^*_{ab}=2,38$). A alta temperatura la muestra presentó cambio en su coloración a pH 3 y 7 desde el minuto 2 de calentamiento, y a pH 5 la diferencia del color del ECM se hizo evidente solo después del minuto 5.

Tabla 21. Diferencias de color para ECM a 4°C, 80°C, T ambiente a pH 3,5 y 7.

| ECM | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|------|------|------------------------------------|------|------|------|---------------------------------------|-------|------|------|
| ΔE^*_{ab} T.A. (t/días) | | | | ΔE^*_{ab} 4 °C (t/días) | | | | ΔE^*_{ab} 80°C (t/minutos) | | | |
| | pH 3 | pH 5 | pH 7 | | pH 3 | pH 5 | pH 7 | | pH 3 | pH 5 | pH 7 |
| 0-2 | 3,48 | 1,26 | 1,92 | 0-2 | 1,99 | 1,44 | 1,55 | 0-2 | 4,75 | 0,75 | 3,93 |
| 2-5 | 10,5 | 0,72 | 0,93 | 2-5 | 2,00 | 1,54 | 1,37 | 2-5 | 28,71 | 6,88 | 3,49 |
| 5-11 | 1,14 | 1,13 | 6,18 | 5-11 | 2,38 | 1,35 | 1,89 | 5-10 | 2,99 | 1,57 | 1,67 |
| 11-20 | 3,53 | 19,4 | 2,16 | 11-20 | 8,44 | 2,73 | 2,67 | 10-20 | 4,08 | 2,12 | 4,76 |
| 20-30 | 4,77 | 1,86 | 2,64 | 20-30 | 5,10 | 0,33 | 0,92 | 20-30 | 1,71 | 2,56 | 5,90 |
| 30-40 | 3,03 | 2,42 | 1,82 | 30-40 | 3,78 | 0,97 | 1,32 | 30-40 | 1,77 | 1,46 | 1,09 |
| 40-50 | 0,86 | 1,18 | 2,83 | 40-50 | 3,49 | 1,65 | 1,66 | 40-50 | 0,70 | 4,42 | 1,97 |

En cuanto al EPM, se concluye que a temperatura ambiente a los valores de pH 3 y 7, hay cambios de color perceptibles desde el quinto día de almacenamiento, siendo mayor el cambio a pH ácido, y a pH 5 solo se evidencian cambios después del día 25 ($\Delta E^*_{ab} = 5,33$). De igual manera, a pH 3 y pH 7 a 80°C se presenta variación del color después de 5 minutos de calentamiento y a pH 5 solo se observa diferencia después de 45 minutos de calentamiento. A temperatura de 4°C el EPM no presenta diferencias significativas en la coloración durante los primeros 30 días de almacenamiento independientemente del pH, siendo esta la temperatura donde el color de la solución es más estable.

Tabla 22. Diferencias de color para EPM a 4°C, 80°C y T. ambiente a pH 3,5 y 7

| EPM | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|------|------|------|---------------------------------------|------|------|------|--|------|------|------|
| ΔE^*_{ab} (t/días) T.A | | | | ΔE^*_{ab} (t/días) 4 °C | | | | ΔE^*_{ab} (t/minutos) 80°C | | | |
| | pH 3 | pH 5 | pH 7 | | pH 3 | pH 5 | pH 7 | | pH 3 | pH 5 | pH 7 |
| 0-5 | 2,28 | 1,37 | 2,76 | 0-5 | 1,79 | 0,38 | 1,26 | 0-5 | 3,60 | 0,39 | 2,96 |
| 5-7 | 7,90 | 1,41 | 13,8 | 5-7 | 1,54 | 1,05 | 1,04 | 6-10 | 12,9 | 1,05 | 0,25 |
| 7-11 | 5,18 | 1,38 | 10,6 | 7-11 | 1,48 | 1,21 | 0,86 | 10-20 | 2,89 | 1,45 | 2,23 |
| 11-15 | 7,16 | 1,42 | 3,72 | 11-20 | 1,33 | 1,27 | 1,98 | 20-25 | 11,0 | 0,60 | 0,99 |
| 15-25 | 2,39 | 5,33 | 23,3 | 20-30 | 3,77 | 2,35 | 7,99 | 25-35 | 2,58 | 1,59 | 0,64 |
| 25-35 | 8,67 | 4,43 | 2,86 | 30-40 | 1,35 | 0,97 | 6,12 | 35-45 | 2,19 | 3,62 | 1,17 |
| 35-45 | 4,91 | 3,53 | 3,79 | 40-50 | 1,89 | 1,72 | 0,68 | 45-55 | 4,08 | 0,89 | 1,62 |
| 45-50 | 3,55 | 2,79 | 1,72 | 50-60 | 1,63 | 4,96 | 2,39 | | | | |

Es indudable que la temperatura y el pH afectan la estabilidad del color de las soluciones acuosas de ECM y EPM durante el almacenamiento. De acuerdo a los datos registrados anteriormente se deduce que a pH 5 el color de los extractos no tienen diferencias visibles al ojo humano durante los primeros 20 a 30 días del almacenamiento a temperatura ambiente y a 4°C; estos resultados revelan mayor estabilidad en el color de los extractos a pH cercano al valor de pH de los frutos (pH 4,6) y son concordantes con los hallazgos previos de Cai et al. (2001) y Mobhammer et al (2005), que proporcionan evidencia de la máxima estabilidad de las betalaínas a valores de pH cercanos a los valores del pH de la respectiva fuente natural^{205, 206}. También se resalta que a pH 3 es donde se presenta mayor variación del color a las temperaturas evaluadas, concluyendo que las betalaínas mayoritarias en los extractos (betaxantinas) son más estables a valores de pH neutro y de baja acidez posiblemente por su estructura de imina²⁰⁷.

Por otro lado, la temperatura más adecuada para almacenar las muestras es 4°C, donde la variación del color no es apreciable entre los primeros 20-30 días de almacenamiento y donde se presenta menor estabilidad del color es 80°C, debido a que se favorece la degradación de los pigmentos por tratamiento térmico, cuyos cambios estructurales más comunes son las isomerizaciones, pérdida de sustituyentes glicosilados, descarboxilaciones en los carbonos C19, C20 y el grupo carboxilo unido al C2 y las deshidrogenaciones que se presentan generalmente en los enlaces entre C2/C3 y C14/C15²⁰⁸

También se pudo evidenciar que en el EPM se experimenta menor variación en los parámetros del color analizados (L^* , C^*_{ab} y h^*_{ab}) y menores variaciones en el color (ΔE^*_{ab}) en comparación con el ECM, esto podría deberse al mayor contenido de betalaínas en el extracto purificado (sección 4.3 y 4.4) y a posibles efectos de la matriz, ya que en el EPM se han eliminado principalmente azúcares y mucilagos que podrían desestabilizar los pigmentos. Los presentes resultados apoyan los hallazgos de Cai et al. (2001), donde se menciona que la presencia de betalainas ayuda a estabilizar el color del extracto y que la mayor estabilidad del color se obtiene cuando hay mayor contenido betalaínico²⁰⁹.

²⁰⁵ CAI, Yizhong, et al. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. En: *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, p. 4429-4435. ²⁰⁵ *Ibid.*, p. 4429-4435

²⁰⁶ MOBHAMMER, Maria; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus cacti* and betalain-containing model solutions derived therefrom. En: *Food Res. Int.*, 2005, vol. 38, p. 975-982.

²⁰⁷ STINTZING. 2004. *Op. cit.*, p. 2305

²⁰⁸ SOCACIU. *Op. Cit.*, p. 286

²⁰⁹ CAI. *Op. Cit.*, p. 4429-4435.

5. CONCLUSIONES

Mediante el uso de la extracción por maceración química y la extracción asistida con ultrasonido fue posible aislar extractos ricos en betalaínas de los frutos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Se obtuvo mejor rendimiento en la extracción asistida con ultrasonido (12,30% ECU) pues el porcentaje de recuperación del ECU fue mayor en comparación con la extracción por maceración (7,52%) y se determinó mayor contenido de betalaínas totales en el extracto por maceración (51,47mg/100g), por tanto, para el caso de los frutos estudiados, la maceración química resultó ser más selectiva para aislar pigmentos betalaínicos en las condiciones de análisis.

La coloración anaranjada de los frutos se debe a la composición rica en pigmentos tipo betaxantinas y betacianinas, los cuales se lograron separar mediante el uso de técnicas cromatográficas usando la CC con sílice C₁₈, se obtuvo una fracción amarilla FA correspondiente al 23,18% del ECM y una fracción de color rojo FR que representa solo el 2,41% de la masa del ECM. La fracción menos polar se encuentra enriquecida en pigmentos tipo betacianinas (FR) y la fracción más polar, que presentó tiempos de retención menores esta enriquecida en betaxantinas (FA).

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos (ECM y ECU), purificado (EPM) y las dos fracciones (FA y FR) frente a los radicales ABTS y DPPH demostró que la fracción con mayor contenido de betacianinas (FR) fue la más activa para capturar radicales libres, seguido por la ECM, EPM, ECU y FA. La fracción roja también se caracterizó por presentar la mayor capacidad de reducir los iones Fe⁺³ mediante el método FRAP. Adicionalmente se logró determinar fuerte correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante in vitro. Los valores más altos encontrados para la FR se atribuyen a su composición química, comprobando que la betacianinas son los compuestos que aportan con mayor significancia a la actividad antioxidante total frente a las betaxantinas.

El color inicial del ECM y EPM no tuvo variaciones significativas en el rango de pH evaluado, porque en el tiempo cero las muestras presentaron valores prácticamente iguales en las características colorimétricas (L*, C* y h). Sin embargo, después del almacenamiento, el pH si fue significativo en la estabilidad del color, presentándose

mayor variación en los parámetros para las muestras a pH 3 y menor cambio en las soluciones a pH 5.

En general después del almacenamiento o calentamiento los extractos cambiaron su coloración, pasando de anaranjado a colores más amarillos (con mayor h^*), menos vivos (menor C^*) y más claros (mayor L^*), pero estas variaciones solo se hacen perceptibles al ojo humano después de 20 a 30 días de almacenamiento cuando las muestras se mantienen a pH 5 y pH 7. A condiciones de pH más ácidas, las muestras evidencian cambios en un menor tiempo (5-10 días de almacenamiento).

Las condiciones de almacenamiento más adecuadas para conservar el color anaranjado inicial de las soluciones tanto para el ECM como para el EPM son pH 5 y temperatura de 4°C, se comprobó que el EPM resulta tener mayor estabilidad del color, variando su color solo después del día 30 de almacenamiento y el ECM lo hace a los 20 días.

RECOMENDACIONES

A partir del conocimiento generado en este estudio, se recomienda profundizar en la caracterización de las betalaínas, es importante realizar la elucidación de los compuestos presentes en el fruto estudiado.

Se recomienda la exploración toxicológica de los extractos de *O. ficus-indica* (L.) Mill para sus posibles usos en la industria alimentaria.

Finalmente, se recomienda la exploración de los diversos usos potenciales de la especie estudiada, como el uso de su contenido mucilaginoso, que podría servir incluso como agente encapsulante y estabilizar los extractos.

BIBLIOGRAFÍA

ALAM, Nur; JAHAN, Nusrat and RAFIQUZZAMAN, Md. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. En: Saudi Pharm. J., 2013, vol. 21, no.2., p.143-152.

ALBANO, Clara, et al. Betalains, Phenols and Antioxidant Capacity in Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] Fruits from Apulia. En: Antioxidants, 2015, vol 4., p. 269-280.

ANDERSEN, Oyvind and MARKHAM Kenneth. The anthocyanins. En: Flavonoids: Chemistry, biochemistry and application. New York: Taylor & Francis Group, 2006. p.1050.

AZEREDO, Henriette. Betalains: properties, sources, applications, and stability-a review. En: Int. J. Food Sci.Techn., 2009, vol. 44, no. 12., p. 2367.

BENZIE Iris and STRAIN, Jorget. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. En: Anal. Biochem., 1996.vol 239, p. 70-76.

BERNS, Roy; BILLMEYER, Robert and SALTZMAN'S, Sam. Principles of Color Technology. 2 ed. New York: Wiley, 1981. 272 p. ISBN: 978-1-119-36668-3

BETANCOURT, Omaira. Aislamiento, caracterización, estabilidad del color y capacidad antioxidante in vitro de los pigmentos tipo betalainas del fruto de *Opuntia dillenii*. Trabajo de grado Química. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2015. 112 p.

BÖHM, Halm and RINK, Erick. Betalains, En: Cell cultura and somatic cell genetics of plants. New York: Academic Press., 1988, vol. 5., p. 449-463.

BOROSKY, Yelena. Chlorophyll breakdown during pepper fruit ripenin in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the scesence-inducible stay-green gene. En: Theor. Appl. Genet., 2008, vol. 117., p. 235-240.

BRAND-WILLIAM, Mery; CUVELIER, Erik and BERSET, Carl. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: LWT-Food Sci. Techn., 1995, vol. 28, no. 1., p. 25-30.

BROCKINGTON, Samuel, et al. Complexpigment evolution in the Caryophyllales. En: New Phytologist., 2011, vol.190, no. 4., p.854-864.

BUTERA, Daniela, et al. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. En: J. Agric. Food Chem., 2002, vol. 50, no. 23., p. 6895-6901.

CAI, Yizhong, et al. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. En: J. Agric. Food Chem., 2001, vol. 49, p. 4429-4435.

CAI, Yizhong; SUN, Mei and CORKE, Harold. Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. En: J. Agric. Food Chem., 2003, vol. 51, no. 8., p. 2288-2294.

CAI, Yizhong; SUN, Mei and CORKE, Harold. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in *Amaranthacea*. En: J. Agric. Food Chem., 2001, vol. 49, p. 1971-1978.

CARDADOR, Anaberta, et al. Revalorization of cactus pear (*Opuntia spp.*) wastes as a source of antioxidants. En: Food Sci. Technol., 2011, vol. 31, no 3

CARRASCO, Enrique, et al. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). En: Food Chem., 2013, vol. 120., p.128-133.

CASTELLANOS, Elena and YAHIA, Elhadi. Identification and Quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by High- Performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. En: J. Agric. Food Chem., 2008, vol. 56., p. 5758-5764.

CEJUDO-BASANTE, María Jesús, et al. Betalain Profile, Phenolic Content, and Color Characterization of Different Parts and Varieties of *Opuntia ficus-indica*. En: J. Agric. Food Chem., 2014, vol. 62, no 33., p. 8491-8499.

CEJUDO-BASANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson and HEREDIA, Francisco. Potential use of new Colombian sources of betalains. Colorimetric study of red prickly pear (*Opuntia dillenii*) extracts under different technological conditions. En: Food Res. Int., 2015, vol. 71, p. 91-95.

CHEN, Guan-Lin, et al. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestión. En: Indust. Crops Prod., 2014, vol. 57, p.150-157.

CIAPPIN, María, et al. Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en mieles de tréboles, eucalipto y alfalfa. En: Rev. Cienc. Tecno., 2013, vol. 19., p. 45-51.

CONGRESO COLOMBIANO DE BOTÁNICA. Las cactáceas de Colombia, una familia de plantas promisorias poco estudiada. En: Libro de Resúmenes III Congreso Colombiano de Botánica. Popayán, Colombia: Ramírez-Padilla, Eds. Universidad del Cauca. 2004. p. 318-319.

CONGRESO NACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA. En: Memorias. Veracruz, México: Colegio Mexicano de Ingenieros bioquímicos. 2016, p.1211.

- CORONA, Edith, et al. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chía (*Salvia hispánica* L.) y su actividad antioxidante. En: *Agrociencia*, 2016, vol.50, no.4., p.67.
- CORPORACION AUTONOMA REGIONAL DE NARIÑO. Diagnóstico biofísico y socioeconómico municipio Taminango. Taminango. En: Gobernación de Nariño, 2008.
- CORRAL-AGUAYO, Rene, et al. Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. En: *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, p. 10498-10504.
- CRAFT, Brian, et al. Phenol-based Antioxidants and the *In vitro* Methods Used for Their Assessment. En: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, vol. 11, no 2., p. 161.
- DAVIS, Kevin. Annual plant reviews. En: *Plant, pigment and their manipulation*. New York: John Wiley & Sons, 2009, vol. 14, p. 328-331.
- DELGADO, Angélica. Betalaínas del fruto de pitaya amarilla Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante *in vitro*. Trabajo de grado Química. Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de química, 2015. 120 p.
- DELGADO, Francisco, and PAREDES, Octavio. The color phenomenon. En: *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 28-29
- DELGADO, Francisco; JIMÉNEZ, Alfredo and PAREDES, Octavio. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. En: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2000, vol. 40, no. 3., p. 176.
- DOWNHAM, Alison and COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. En: *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2000, vol 35, p. 5-22.
- EDER, Reinhard. Pigments. En: NOLLET, Leo M.L. *Food analysis by HPLC*. 2 Ed. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 2012. 826 p.
- ESATBEYOGLU, Tuba, et al. Betanin A food colorant with biological activity. En: *Mol. Nutr. Food Res.*, 2015, vol. 59, no. 1., p.36.
- ESCRIBANO, Josefa, et al. Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. En: *Phytochem. Anal.*, 1998, vol. 9, no. 3., p. 124-127.
- ESQUIVEL, Patricia. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. En: *Agronomía Mesoamericana.*, 2001, vol.15, no 2., p.215-219.
- FENNEMA, Owen. *Química de los alimentos*. 2 Ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1995. 1126 p. ISBN: 978-84-200-1250-6

FERNANDEZ, Jose and ALMELA, Luis. Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. En: J.Chromatogr. A. 2001, vol. 913, p. 415-420.

FERNANDEZ, José; et al. Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. En: Plant Foods Hum Nutr., 2010, vol. 65, no 3., p. 253-259.

FOLIN, Otto and CIOCALTEU, Vintila. Tyrosine and Tryptophan determination in proteins. En: J. Biol. Chem., 1927, vol. 73, p. 637-650.

GARCIA, Tomás, et al. Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear tissues. En: J. Food Compos. Anal., 2019, vol.76, p. 1-13.

GARCÍA, Verónica. Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia Stricta*. Trabajo de grado Ingeniera Química. Cartagena: Universidad Politécnica de Cartagena, 2008. 132 p.

GASZTONYI, Magdolna, et al. Comparison of red beet (*Beta vulgarisvarconditiva*) varieties on the basis of their pigment components. En: J. Sci. Food Agric., 2001, vol. 81, no 9., p. 932-933.

GENGATHARAN, Ashwini; DYKES, Gary and CHOO, Wee. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. En: LWT-Food Sci. Techn., 2015, vol. 64, no. 2., p. 645-649.

GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A.; SZYMUSIAK, H. and MALINOWSKA, P., Betanin, the main pigment of red beet: molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. En: Food Addit. Contam., 2006, vol. 23, p. 1079-1087.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. En: Wiersema J H. [En línea]. 2019. [10 marzo de 2020]. Disponible en: <<https://www.gbif.org/es/species/101339208>>

GONZALEZ, Álvaro. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. España: El Sevier, 2010.p 25.

GOUPY, Pascale, et al. Quantitative Kinetic Analysis of Hydrogen Transfer Reactions from Dietary Polyphenols to the DPPH Radical. En: J. Agric. Food Chem. 2003, vol. 51, p. 615-622.

GUIJA-POMA, Emilio.et al. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. En: Horiz Med. 2015, vol. 15, p. 57-60.

GURRIERI, Sergio, et al. Chemical Characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) and Perspectives for the Storage of Its Juice. En: J. Agric. Food Chem., 2000, vol, 48, p. 5424–5431.

GUZMAN, Salvador, et al. Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruits cactus species produced in central Mexico. En: Food Chem., 2010, vol. 121, p. 381-386.

HARRIS, Nilangani, et al. Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. En: BMC plant biology, 2012, vol. 12, no. 1, p. 2.

HAYEK, Saeed and IBRAHIM, Salam. Antimicrobial activity of xocostle pears (*Opuntia matudae*) against escherichia coli. Laboratory medium. En: Int. J. Microbiol., 2012, vol. 2012.

HERBACH, Kirsten; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. En: J. Food Sci., 2006, vol. 71, no. 4.

HERBACH, Kirsten; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. En: J. Food Sci., Agosto, 2004b, vol. 69, no. 6, p. C491-C498

HERBACH, Kirsten; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. En: Eur. Food Res. Techn., septiembre, 2004a, vol. 219, no. 4, p. 377-385.

HEREDIA, Francisco, et al. CromaLab®, análisis de color. Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04. Sevilla, 2004.

HERNANDEZ, Mateo. Colombia en el mundo - Los Andes secos. [En línea]. 2013. [10 de marzo de 2020]. Disponible en: <<http://biodiversidadyconservacion.blogspot.com/2013/12/colombia-en-elmundo-los-andes-secos.htm>>

HINNEBURG, Iris; DORMAN, Damien and HILTUNEN, Raino. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. En: J. Agric. Food Chem., 2006, vol. 97, p. 122-129.

HUET, Cristina. Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Trabajo de grado Farmacia. España: Universidad Complutense, 2017. 20 p.

JUDD, Deane and WYSZECKI, Gunther. Colour in Business, Science and Industry, 3 Ed. New York: Wiley. 1975. 856 p. ISBN: 978-0471452126

- KAIMAINEN, Mika. Stability of Natural Colorants of Plant Origin. Tesis Doctoral en Ciencias de los Alimentos. Turku: University of Turku. Food Chemistry and Food Development. Department of Biochemistry, 2014. p. 3.
- KHAN, Mohammad and GIRIDHAR, Parvatam. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: Phytochemistry, 2015, vol. 117, p. 267-295.
- KHAN, Mohammad. Stabilization of betalains: A review. En: Food Chem., 2016, vol. 197, p. 1281-1282.
- KOBAYASHI, Naoko, et al. Betalains from Christmas cactus. En: Phytochemistry, 2000 vol. 54, p. 419-426.
- KOBAYASHI, Naoko, et al. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. En: Phytochemistry, 2011, vol. 56, no. 5., p. 429-436.
- KUNIN, Robert. The use of macroreticular polymeric adsorbents for the treatment of waste effluents. En: Macromol. Chem. Phys., 1975, vol. 11, p. 206.
- LAQUI-VILCA, Cesar, et al. Ultrasound-assisted optimal extraction and thermal stability of betalains from colored quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) hulls. Ind. Crops Prod., 2018, vol. 111, p. 606-614.
- LEE, Jeong-Chae, et al. Antioxidant Property of an Ethanol Extract of the Stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. En: J. Agric. Food Chem., 2002, vol. 50, p. 6490-6496.
- LI, Hongyan, et al. Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three *Amaranthus* species. En: J. Food Compos. Anal., 2015, vol.37, p. 75-81.
- MARTINEZ, Joaquin, et al. Experimentación Química general. 5 ed. Madrid: Thomson ediciones, 2009, 172 p. ISBN: 9788497324250
- MELGAR, Bruno, et al. Ultrasound and Microwave Assisted Extraction of *Opuntia* Fruit Biocompounds. En: Molecules, 2019, vol. 24, p.3618.
- MOSQUERA, Natalia. Contenido De Betalaínas y Actividad Antioxidante In Vitro Del Ulluco (*Ullucus Tuberosus*). Trabajo de grado Química. Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2016. 128 p.
- MOßHAMMER, Maria; STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom. En: Food Res. Int., 2005, vol. 38, p. 975-982.
- NACHUN, OCK, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. En: J. Food Compos. Anal., 2011, vol. 24, no 7., p.1043-1045.

- NAMIKI M. Antioxidants/antimutagens in food. En: Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1990, vol. 29, no 4., p. 273-300.
- NEELWARNE, Bhagyalakshmi, et al. Red Beet: An Overview Red Beet Biotechnology. En: Food Pharm. Appl., 2013, vol 55, p. 5-18.
- NEMZER, Boris, et al. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. En: Food Chem., 2011, vol. 127, p. 42-53.
- OBÓN, Concepción and RIVERA, Diego. Plant Pigments and their manipulation. En: Economic Botany, 2006, vol. 60, no. 1, p. 92-92
- ORNELA-PAZ, Jose. Changes in external and internal color during postharvest ripening of manila and ataulfo mango fruit with flavonoid content determined by liquid chromatography-mass spectrometry. En: Postharvest Boil. Tech, 2008, vol. 50, p.145-152.
- OTALORA, Maria; et al. Encapsulated betalains as natural colorants: Gummy candies. En: Food Sci. Techn., 2009, vol.113, p. 222-227.
- PHEBE, Ding, et al. Red-fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit colour and betacyanin content depend on maturity. En: Int. Food Res. J., 2009, vol. 16, p. 233-242.
- PIRES, Leticia, et al. A comparative study of the purification of betanin. En: Food Chem., 2012, vol. 131, no. 1, p. 234.
- POMPELLA, Alfonso, et al. The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. En: Nutrition, 2014, vol. 30, no. 7, p. 791-793.
- PRAKASH, Maran. Modeling and optimization of betalain extraction from *OpuntiaFicus Indica* using BoxBehnken desing with desirability funtion. En: Ind. Crop. Pro., 2013, vol. 49, p. 304-311.
- PRIOR, Ronald; WU, Xianli and SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. En: J. Agric.Food Chem., 2005, vol. 53, p. 4297.
- RE, Roberta, et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. En: Free Radic. Biol. Med., 1999, vol. 26, no 9., p. 1231-1237
- REPO, Ritva y ENCINA, René. Determinación de la Capacidad Antioxidante y Compuestos Bioactivos de Frutas Nativas Peruanas. En: Rev. Soc. Quím. Perú. 2008, vol. 74, p. 108-124.
- RODRIGUEZ, Delia. Natural food pigments and colorants. En: Curr. Opin. Food Sci., 2016, vol. 7, p. 20.

- RODRIGUEZ, Juan. Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus*: Stability and use in food. En: Food Res. Int., 2017, vol. 93, p. 67-71.
- ROSERO, Johanna. Extracción y Caracterización de los Principios Activos Fenólicos con Actividad Antioxidante a partir de Residuos de Aguacate: Epicarpio y Semilla (*Persea americana*). Trabajo de grado Química. Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2017. 153 p.
- ROVER, Marjorie and BROWN, Robert. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. En: J. Anal. Appl. Pyrolysis, 2013, vol. 104, p. 367.
- RUIZ, Rosalba. Distribución, Variación Morfológica y Correlaciones Ecológicas de *Opuntia Miller (Cactaceae)* en Colombia. Trabajo de grado Bióloga. Montería. Colombia: Universidad de Córdoba. Departamento de Biología, 2013. 112 p.
- SAKUTA, Masaaki. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. En: Plant biotechnol. Rep., 2014, vol. 8, no. 1, p. 41.
- SANCHEZ, Noe, et al. Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia jacoconostle* cv. using response surface methodology. En: J. Agric. Food Chem., 2013, vol. 61, no. 49, p. 11995- 12004.
- SANCHEZ, Noé. Extracción y caracterización de los principales compuestos de *Opuntia xococonostle*, Tesis maestría. México: Centro de investigación en ciencias aplicadas y tecnología avanzada. Instituto Politécnico Nacional, 2006.p. 107.
- SÁNCHEZ-MORENO, Concepción; LARRAURI, Jose and SAURA, Fulgencio. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. En: J. Sci. Food Agric., 1998, vol. 76, no. 2, p. 270-276.
- SANT'ANNA, Voltaire, et al. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods A review. En: Dyes and Pigments, 2013, vol. 98, p. 601-608.
- SCHANDA, J. Colorimetry: Understanding the CIE system. 2 Ed. New York: Wiley. Wyszecchi G and Stiles WS, 1982. 408 p. ISBN: 978-0-470-04904-4
- SEEJA, N., et al. Investigation of total phenolic contents, antioxidant activities and analyses of active compounds in some sweet peppers (*Capsicum annum* L.). En: NU Sci. J., 2014, vol. 11, no. 1, p. 40.
- SHARMA, Vinita; MCKONE, Harold and MARKOW, Peter. Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic Food Dyes. En: J. Chem. Educ., 2011, vol 88, no 1., p. 24-28.
- SINGER, J y VON ELBE, J. Degradation rates of vulgaxanthine I. En: J. Food Sci., 1980, vol.45, no. 3, p. 489-491.

SOCACIU, Carmen. Food Colorants. Chemical and Functional Properties. FL: CRC Press, New York: Taylor & Francis Group.2008, p. 286.

SPORNA, Aneta, et al. Liquid chromatographic techniques in separation of betacyanins and their derivatives from red beet roots. En: Chall. Mod.Technol., 2010, vol. 10, p. 19-22.

STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. Betacyanin in fruits from red-purple pitaya. En: Food Chem., 2013, vol 77, p. 101-106.

STINTZING, Florian C and CARLE, Reinhold. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: Trends Food Sci. Technol., 2004, vol. 15, no. 1, p. 24-34

STINTZING, Florian C. and CARLE, Reinhold. Betalains-emerging prospects for food scientists. En: Trends Food Sci. Technol., 2007, vol. 18, no. 10, p. 514-525.

STINTZING, Florian, et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones. En: J. Agric. Food Chem., 2005, vol. 53, p. 442-451.

STINTZING, Florian; SCHIEBER, Andreas and CARLE, Reinhold. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. En: Eur. Food Res. Techn., 2003.vol. 216, p. 303-311.

STINTZING, Florian; SCHIEBER, Andreas and CARLE, Reinhold. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. En: J. Agric. Food Chem., 2002b, vol. 50, no. 8, p. 2303.

STINTZING, Florian; SCHIEBER, Andreas and CARLE, Reinhold. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. En: Eur Food Res Technol, 2001, vol. 212, p.396-407.

STRACK, Dieter; VOGT, Thomas and SCHLIEMANN, Willibald. Recent advances in betalain research. En: Phytochemistry, 2003, vol.62, n. 3, p. 247-269.

SUN, Mei and CORKE, Harold. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. En: J. Agric.Food Chem., 2003, vol. 51, p. 2288-2294.

TECHNICAL GUIDES. [En línea]. 2010. [20 marzo 2021. Disponible en: <Recuperado de http://dba.med.sc.edu/price/irf/Adobe_tg/models/cielab.html>.

TELES, Feitosa, et al. Amino and organic acids of the prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* L.). En: J.Sci. Food Agric., 1984, vol. 35, no 4., p.421-425.

VARGAS, Diana. Efecto de la liofilización sobre propiedades fisicoquímicas y vida útil de cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) en polvo. Tesis de maestría. Palmira, Colombia: Universidad de Colombia.2015.p.46.

VERGARA, Cristina; SABEDRA, Jorge and SAENZ, Carmen. Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear extracts and betanin stability during storage. *Food Chem.*, 2014, vol. 157, p. 246-251.

WATERS CORPORATION U.S.A. The most successful Column in Over 30 Years of Stationary Phase Technology. En: *XTerra Columns*. [15 abril 2021]. Disponible en: <<http://waters.com/xterra>>

WEE, Sim Choo and Wee, King Yong. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. En: *Adv.Appl.Sci.Res.*, 2011, vol. 2, p.418-425.

WYSZECKI, Gunther and STILES WS. *Color Science Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae*, 2 Ed. New York: Wiley, 1982. 968 p. ISBN: 978-0-471-39918-6

YAHIA, Elhadi, et al. Chemistry, stability and biological action of carotenoids. Fruit and vegetable En: *Phytochemicals chemistry and nutritional value, and stabilit.* 2 Ed. New York: Wiley, 2010, p. 179-184. ISBN: 9780813809-397.

YEDDES, Nazzir, et al. Comparative study of antioxidant power, Polyphenols, Flavonoids and betacyanins of the peel and pulp of three *Tunisian Opuntia* Forms. En: *Antioxidants*, 2013, vol. 2, no 2., p. 37,51.

ZAFRA, Quinatzin; et al. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice. En: *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013, vol.20, p. 1283-1288

ZHU, Fan; et al. Influence of *Amaranthus* Betacyanin Pigments on the Physical Properties and Color of Wheat Flours. En: *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, p. 8212-8217.

ANEXOS

ANEXO A. Certificado de clasificación taxonómica impartido por el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 119

Bogotá D.C., 25 de abril de 2018

Señores

NELSON HURTADO

Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica.**

Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

☞ Nombre: *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.
☞ Familia: CACTACEAE
☞ No. COL: 604533
Colector: Lina María Jojoa
No. Colecta: 1
Determinó: J.L. Fernández-Alonso/2018

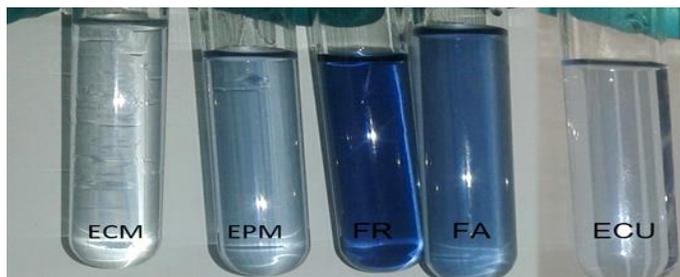
Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano –COL
Universidad Nacional de Colombia
E-mail: herbacol_fcbog@unal.edu.co

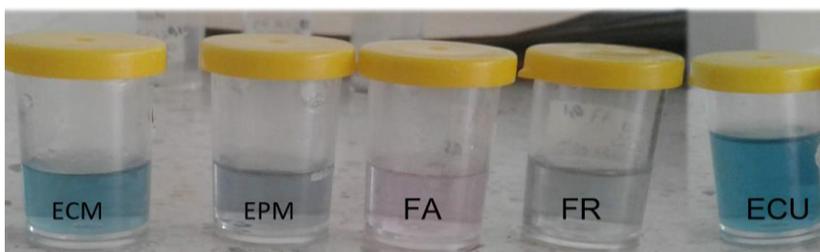
Copia: Archivo COL
Chayo Valle

Carrera 30 No. 45-03, **INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES**,
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 – 11518 Fax: 11538
Correo electrónico: herbacol_fcbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

ANEXO B. Coloración azul característica de la reacción del Método de Folin-Ciocalteu



ANEXO C. Coloración azul-verdosa característica del radical ABTS^{•+}.

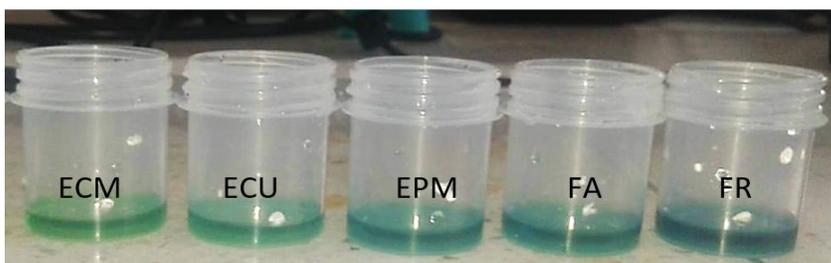


ANEXO D. Coloración violeta característica del radical DPPH



*izquierda: color del radical y derecha: color de radical con muestras.

ANEXO E. Coloración característica de la reacción FRAP



ANEXO F. Tabla de porcentaje de áreas y altura de los picos cromatográficos más representativos en el EPM

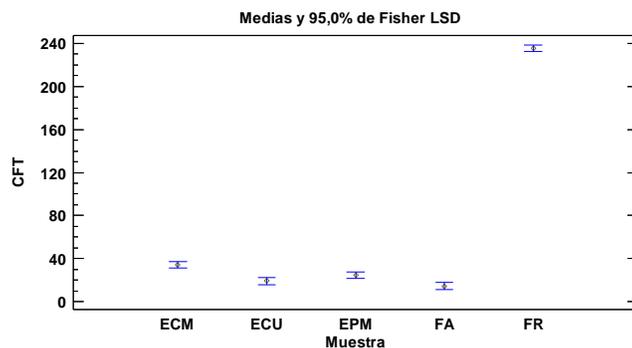
(a) EPM a 480 nm

| Name | Tiempo de retención | Área | % de área |
|------|---------------------|---------|-----------|
| 4 | 3,708 | 35161.9 | 2,38 |
| 10 | 6,236 | 13887,7 | 0,94 |
| 13 | 7,567 | 81847.4 | 5,54 |
| 14 | 8,204 | 1346493 | 91,14 |

(b) EPM a 538 nm

| Name | Tiempo de retención | Área | % de área |
|------|---------------------|-------|-----------|
| 4 | 3,719 | 2937 | 4,58 |
| 13 | 7,571 | 38488 | 60,02 |
| 14 | 8,202 | 4040 | 6,30 |
| 16 | 8,918 | 1879 | 2,93 |
| 17 | 9,463 | 16782 | 26,17 |

ANEXO G. Gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para el CFT de extractos y fracciones.



ANEXO H. Estadísticas de la regresión lineal del método TEAC.

| Parámetro | Estimado |
|---|------------------------------|
| Intercepto (a) | 0,8361 ± 0,0007 ^a |
| Pendiente (b) | -0,4316 ± 0,003 ^b |
| Coefficiente de correlación (r) | -0,9970 |
| Coefficiente de determinación (r ²) | 0,9942 |

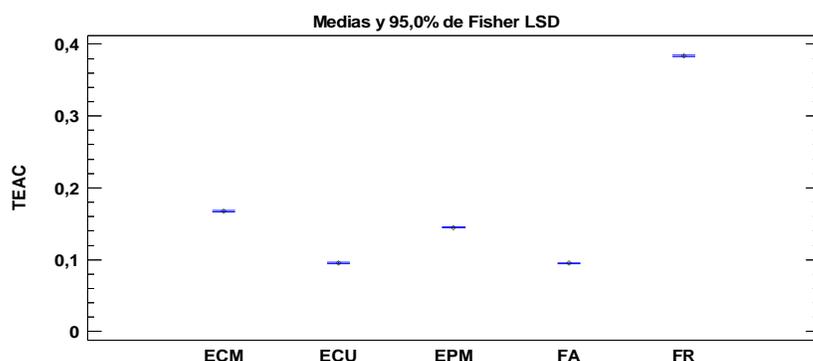
ANEXO I. Prueba de Múltiple Rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del método TEAC.

Método: 95,0 porcentaje LSD

| muestra | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|---------|-------|-----------|-------------------|
| FA | 3 | 0,0950117 | X |
| ECU | 3 | 0,0957144 | X |
| EPM | 3 | 0,144932 | X |
| ECM | 3 | 0,167761 | X |
| FR | 3 | 0,383697 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|-------------|-------------|
| ECM - ECU | * | 0,0720464 | 0,00154859 |
| ECM - EPM | * | 0,0228292 | 0,00154859 |
| ECM - FA | * | 0,0727491 | 0,00154859 |
| ECM - FR | * | -0,215936 | 0,00154859 |
| ECU - EPM | * | -0,0492172 | 0,00154859 |
| ECU - FA | | 0,000702644 | 0,00154859 |
| ECU - FR | * | -0,287982 | 0,00154859 |
| EPM - FA | * | 0,0499199 | 0,00154859 |
| EPM - FR | * | -0,238765 | 0,00154859 |
| FA - FR | * | -0,288685 | 0,00154859 |

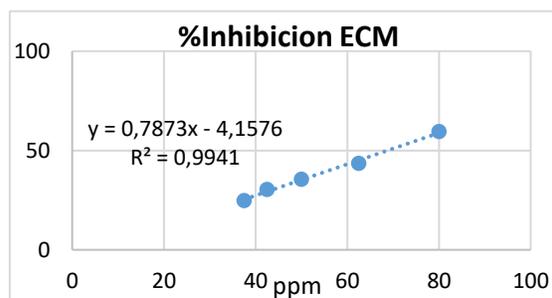
* indica una diferencia significativa.



ANEXO J. Construcción de las curvas dosis-respuesta para método DPPH de los extractos y fracciones

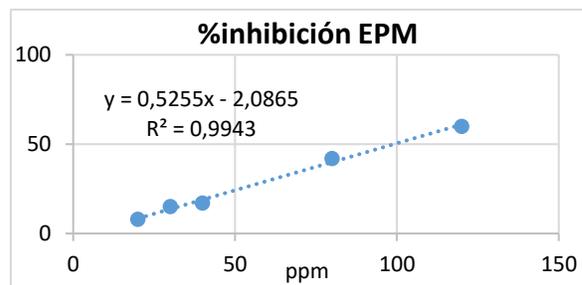
| ECM (µg/mL) | Absorbancia* ± DE | % Inhibición |
|-------------|-------------------|--------------|
| 37,5 | 0,763 ± 0,006 | 24,82758621 |
| 42,5 | 0,706 ± 0,021 | 30,41050903 |
| 50 | 0,655 ± 0,024 | 35,4679803 |
| 62,5 | 0,573 ± 0,046 | 43,54679803 |
| 80 | 0,411 ± 0,009 | 59,50738916 |

*promedio de 3 réplicas.



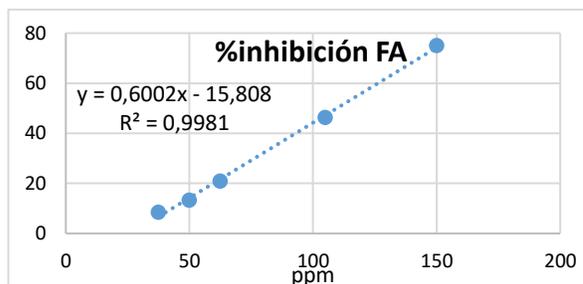
| EPM ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbancia* \pm DE | % Inhibición |
|-----------------------------|-----------------------|--------------|
| 20 | 0,934 \pm 0,004 | 7,947454844 |
| 30 | 0,863 \pm 0,010 | 15,00821018 |
| 40 | 0,842 \pm 0,007 | 17,01149425 |
| 80 | 0,589 \pm 0,006 | 42,00328407 |
| 120 | 0,406 \pm 0,003 | 60 |

*promedio de 3 réplicas.



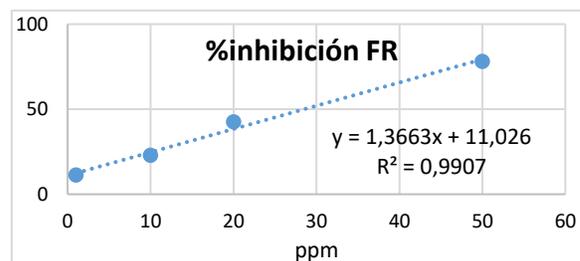
| FA ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbancia* \pm DE | % Inhibición |
|----------------------------|-----------------------|--------------|
| 37,5 | 0,929 \pm 0,006 | 8,472906404 |
| 50 | 0,880 \pm 0,020 | 13,30049261 |
| 62,5 | 0,803 \pm 0,007 | 20,88669951 |
| 105 | 0,544 \pm 0,019 | 46,37110016 |
| 150 | 0,254 \pm 0,006 | 75,00821018 |

*promedio de 3 réplicas.



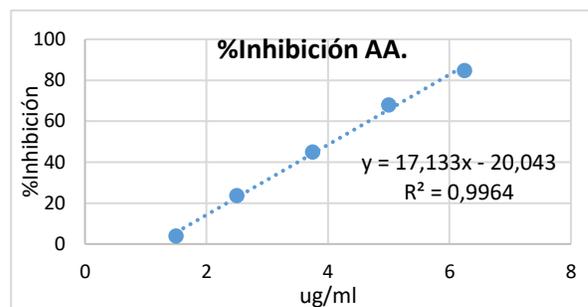
| FR ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbancia* \pm DE | % Inhibición |
|----------------------------|-----------------------|--------------|
| 1 | 0,901 \pm 0,012 | 11,23152709 |
| 10 | 0,779 \pm 0,003 | 22,95566502 |
| 20 | 0,582 \pm 0,002 | 42,56157635 |
| 50 | 0,223 \pm 0,003 | 78,02955665 |

*promedio de 3 réplicas.



ANEXO K. Curva dosis respuesta para el control ácido ascórbico usado en DPPH.

| AA. ($\mu\text{g/mL}$) | Absorbancia* \pm DE | % Inhibición |
|-----------------------------|-----------------------|--------------|
| 1,5 | 0,975 \pm 0,006 | 3,9408867 |
| 2,5 | 0,775 \pm 0,005 | 23,6453202 |
| 3,75 | 0,558 \pm 0,006 | 44,99178982 |
| 5 | 0,325 \pm 0,004 | 68,01313629 |
| 6,25 | 0,155 \pm 0,067 | 84,72906404 |



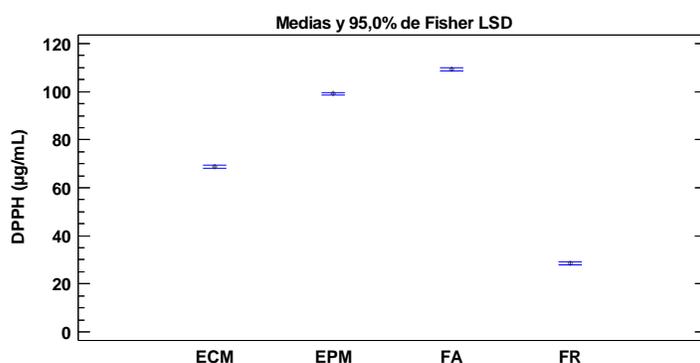
ANEXO L. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del EC50 para los extractos y fracciones.

Método: 95,0 porcentaje LSD

| Muestra | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|---------|-------|---------|-------------------|
| FR | 2 | 28,525 | X |
| ECM | 2 | 68,789 | X |
| EPM | 2 | 99,118 | X |
| FA | 2 | 109,208 | X |

| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| ECM - EPM | * | -30,329 | 1,18504 |
| ECM - FA | * | -40,419 | 1,18504 |
| ECM - FR | * | 40,264 | 1,18504 |
| EPM - FA | * | -10,09 | 1,18504 |
| EPM - FR | * | 70,593 | 1,18504 |
| FA - FR | * | 80,683 | 1,18504 |

* indica una diferencia significativa.



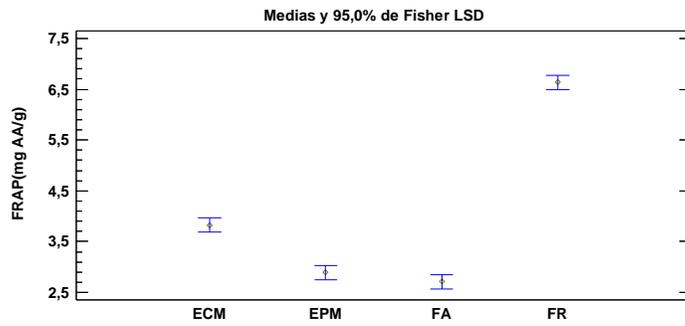
ANEXO M. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del contenido FRAP.

Método: 95,0 porcentaje LSD

| Muestra | Casos | Media | Grupos Homogéneos |
|---------|-------|---------|-------------------|
| FA | 3 | 2,70813 | X |
| EPM | 3 | 2,89549 | X |
| ECM | 3 | 3,82788 | X |
| FR | 3 | 6,64043 | X |

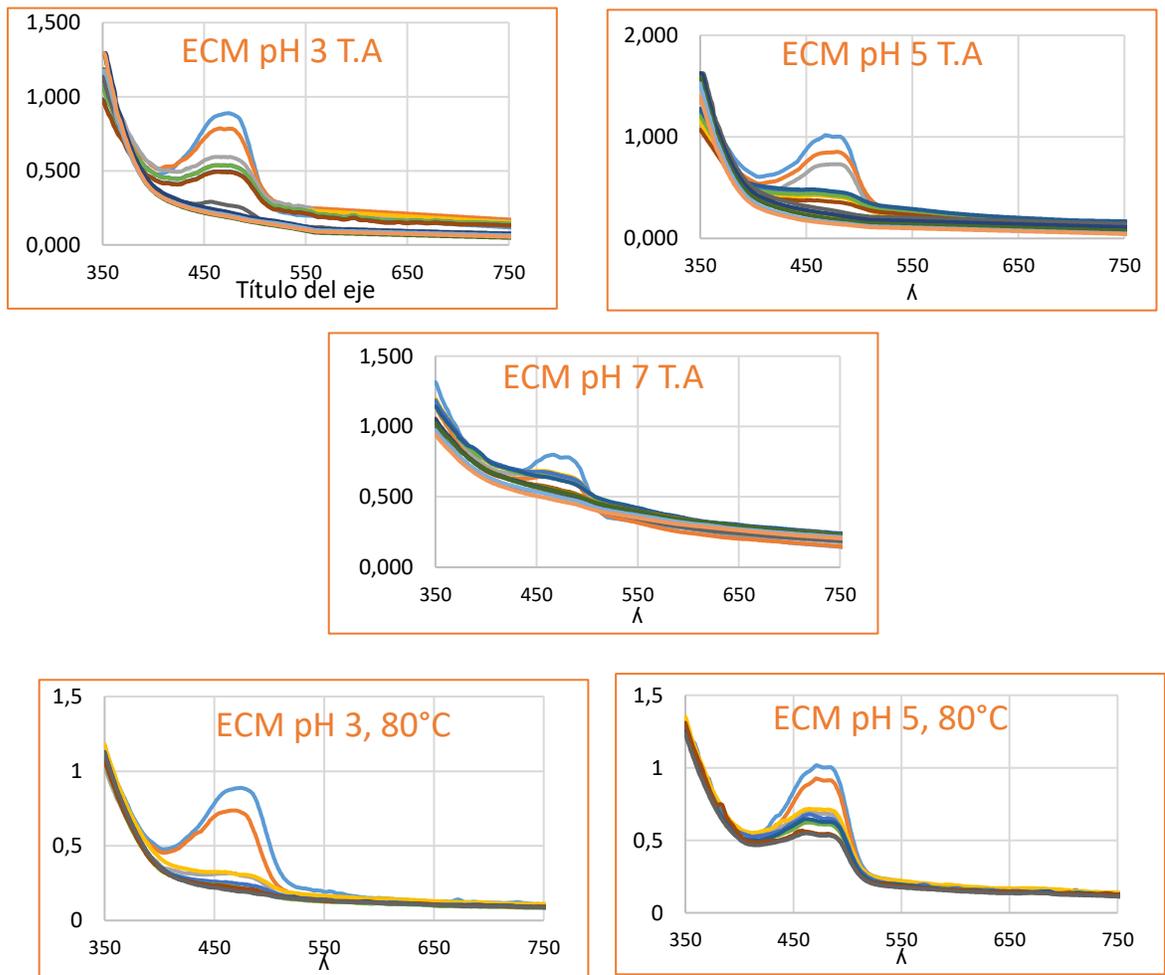
| Contraste | Sig. | Diferencia | +/- Límites |
|-----------|------|------------|-------------|
| ECM - EPM | * | 0,932385 | 0,280243 |
| ECM - FA | * | 1,11975 | 0,280243 |
| ECM - FR | * | -2,81255 | 0,280243 |
| EPM - FA | | 0,187367 | 0,280243 |
| EPM - FR | * | -3,74493 | 0,280243 |
| FA - FR | * | -3,9323 | 0,280243 |

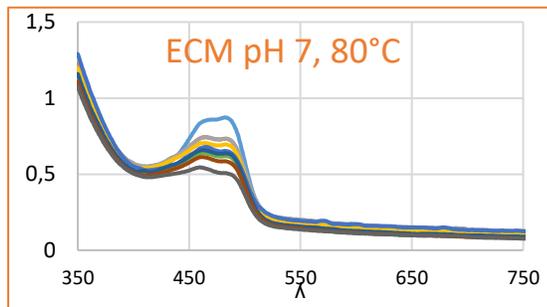
* indica una diferencia significativa.



ANEXO N. Variación en los espectros de absorción de ECM y EPM durante el almacenamiento a 80°C y T. ambiente a diferentes condiciones de pH

(a). ECM





(b) EPM

