AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD

ANTIOXIDANTE IN - VITRO DE LOS PIGMENTOS TIPO BETALAÍNAS DEL FRUTO

DE Opuntia dillenii.

OMAIRA CAROLINA BETANCOURT RAMOS

UNIVERSISDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

SAN JUAN DE PASTO

2015

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN - VITRO DE LOS PIGMENTOS TIPO BETALAÍNAS DEL FRUTO DE Opuntia dillenii.

OMAIRA CAROLINA BETANCOURT RAMOS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Químico

Asesor:

Nelson Hurtado, Ph,D. en Ciencias Químicas

UNIVERSISDAD DE NARIÑO FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES DEPARTAMENTO DE QUÍMICA SAN JUAN DE PASTO

2015

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado son Responsabilidad de los autores.

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño. Nota de Aceptación:

Firma del Presidente del Jurado

HENRY EDGARDO INSUASTY INSUASTY

Firma del Jurado

JESUS ANTONIO CABRERA MONCAYO

Firma del Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2015.

DEDICATORIA

A *DIOS* por ser mi guía espiritual, por esa fortaleza que me regalo en los momentos de quebranto. Al *ESPIRITU SANTO* por ser la luz en mi camino y el compañero en todo este trabajo.

A mis padres Roberto y Omaira por brindarme su apoyo y comprensión y siempre estar a mi lado.

A mis hijos Zara y David Alejandro porque son mi motor para seguir adelante.

A mi hermano Roberto por enseñarme a ser una persona luchadora y a lograr todo lo que uno se proponga.

RESUMEN

En Colombia existe una gran variedad de cactus con frutos, de los cuales existen muy pocos estudios químicos. La investigación en el campo de los pigmentos naturales provenientes de estas frutas, permite establecer el potencial de ellas como alimento con propiedades bifuncionales y el desarrollo de productos con valor agregado que puedan ser usados como colorantes naturales. En este trabajo se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos tipo betalaína del fruto del cactus *Opuntia dillenii*. Se obtuvieron los extractos enriquecidos en betalaínas: extracto crudo (EC), extracto purificado (EP), las fracciones enriquecidas en betacianinas (BC) y en betaxantinas (BX) por absorción selectiva sobre un soporte C_{18} del extracto etanólico de los frutos. Estos extractos se analizaron por cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos (LC-DAD) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con interfase electrospray (LC/MS-ESI). Estos análisis permitieron elucidar la estructura de los compuestos mayoritarios. El contenido de fenoles totales se evaluó mediante el método de Folin Ciocalteau y la cuantificación de las betacianinas y betaxantinas se realizó con base en el método de Stintzing *et al.*, 2004.

Los análisis realizados al fruto confirma

ron la presencia de betanina e isobetanina como compuestos mayoritarios, además de los compuestos minoritarios como descarboxibetanina y descarboxisobetanina, 5"-O-E-sinapoil-2'-O-apiosil filocactina, 2'-O-Apiosil-4-O-malonil-betanina, sinapoil-gonfrenina, sinapoil-isogofrenina, tirosina-xantina, triptofan-betexantina, prolina-betaxantina, isoarmetina-3-glucorónido, quercetina-3-O-glucosido, ácido quínico, ácido feruloil quínico.

Se encontró que el contenido de fenoles totales en el fruto es de 311.61 mg de AG/100g de fruto fresco, que difiere en el contenido de fenoles encontrados en la pulpa de otros frutos

como *Opuntia ficus indica* (52mg AG/100gFF), *Cv Reyna* (72.3mgAG/100gFF), *Opuntia ficus indica* (L)Mill (89.2mgAG/100gFF); se encontró que el extracto con mayor contenido fenólico fue el EC, seguido por el EP, BC y BX. El contenido de betalaínas totales en el fruto fue de 24,18 mg (indicaxantina + betanina)/100g FF, siendo el BC el más rico en betacianinas (16.63 \pm 0.196 mg betanina/100gFF) y el BX en betaxantinas (7.55 \pm 0.035 mg indicaxantina/100gFF).

Posteriormente se evaluó la actividad antioxidante de los cuatro extractos EC, EP, BC y BX frente a radicales libres ABTS y DPPH mediante espectroscopia UV-Vis. Se determinó que el extracto más activo frente a radicales ABTS fue el EC, seguido por el EP, BC y BX lo que está en concordancia con el contenido fenólico. El uso del DPPH permitió seguir el curso de la reacción de captura de los radicales libres por las sustancias antioxidantes presentes en los extractos, observando una disminución de los radicales libres con el tiempo (estudio cinético). Al aplicar dicho modelo cinético, se estableció que el extracto más activo frente a los radicales libres era el BC con un EC₅₀ de 1436 g/Kg DPPH, y que frente al DPPH se encontraban diferencias de actividad más significativas que frente al ABTS.

Finalmente se evaluó la estabilidad de soluciones acuosas del extracto crudo (EC) frente a variaciones de pH, en presencia de aire y presencia y ausencia de luz durante un periodo de almacenamiento de 35 días (temperatura ambiente $18 \circ C$). Se confirmó que el pH y la luz son factores que afectan significativamente el contenido de betalainas y con base en la cuantificación de los pigmentos se concluyó que el extracto más estable era el almacenado a pH 5 y en ausencia de luz, mostrando que el mayor tiempo de vida media de 96.32 días, una constante de degradación 7.2 x 10^{-3} días⁻¹. Con estos resultados se comprobó que la fruta es una fuente promisoria de pigmentos naturales, siendo más interesante el BC debido a su contenido de betalainas y actividad antioxidante.

ABSTRACT

There are a variety of cactus with fruit, of which there are very few chemical studies in Colombia. Research in the field of natural pigments from these fruits, enables them to establish the potential for food with bifunctional properties and the development of value-added products that can be used as natural dyes. In this work the qualitative and quantitative analysis of the pigments betalain type *Opuntia dillenii* cactus fruit was performed. Crude extract (CE), purified extract (EP), the enriched fractions betacyanins (BC) and betaxanthins (BX) by selective absorption on a support C_{18} ethanolic extract of the fruits: betalains enriched extracts obtained. These extracts were analyzed by liquid chromatography coupled to a diode array detector (LC-DAD) and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray interface (LC / MS-ESI). These analyzes allowed to elucidate the structure of the major compounds. The total phenolic content was evaluated by the Folin Ciocalteu and quantifying betacyanins and betaxanthins was conducted based on the method of Stintzing *et al.*, 2004.

Analyses performed to result confirmed the presence of betanin and isobetanin as majority compounds, besides minor compounds as descarboxibetanin and descarboxisobetanin, 5 "-O-E-sinapoyl-2'-O-apiosyl philocactin, 2'-O-Apiosil-4- O-malonyl-betanin, sinapoyl-gonphrenin, sinapoyl-isogophrenin, tyrosine-betexanthin tryptophan-betexanthin, proline-betaxanthin, isoarmetin-3-glucuronide, quercetin-3-O-glucoside, quinic acid, feruloyl quinic acid.

It was found that the total phenol content of the fruit is of 311.61 mg of AG / 100g of fresh fruit, which differs in content of phenols found in the pulp of other fruits such as *Opuntia ficus indica* (52mg AG / 100gFF), *Cv Reyna* (72.3mgAG / 100gFF), *Opuntia ficus indica* (L) Mill (89.2mgAG / 100gFF); It found that the extract was the higher phenolic content EC,

followed by EP, BC and BX. Total betalains content in the fruit was 24.18 mg (indicaxanthin + betanin) / 100 FF BC being the richest in betacyanins (16.63 \pm 0.196 mg betanin / 100gFF) and BX in betaxanthins (7.55 \pm 0.035 mg indicaxanthin / 100gFF).

Subsequently the antioxidant activity of extracts the four EC, EP, BC and BX was evaluated against DPPH free radical ABTS and by UV-Vis spectroscopy. It was determined that the most active extract against ABTS radical was the EC, followed by EP, BC and BX which is consistent with the phenolic content. Use of DPPH allowed to follow the course of the reaction capture free radicals by the antioxidants present in the extracts, observing a reduction of free radicals over time (kinetic study). In applying this kinetic model, it was established that the most active against free radicals extract was the BC with an EC_{50} of 1436 g / Kg DPPH and DPPH differences versus most significant activity against ABTS were.

Finally, the stability of aqueous solutions of the crude extract (EC) to variations in pH, in the presence of air and presence and absence of light was assessed during a storage period of 35 days (room temperature 18 °C). It was confirmed that the pH and light are factors that significantly affect the content of betalains and based in the quantification of the pigments was concluded that the most stable extract was stored at pH 5 and in the absence of light, showing a lifetime average 96.32 days, a constant of 7.2 x10-3días-1 degradation. With these results it was found that the fruit is a promising source of natural pigments, BC still more interesting because of its content and antioxidant activity betalains.

GLOSARIO

ABTS ácido 2,2 azino-bis-(3-etilbenzotiazolil)-6-sulfónico.

AG ácido gálico.

a_w actividad de agua.

BC Betacianinas.

BX Betaxantinas.

CIE Comisión internacional de la iluminación.

E- Ionización negativa [M-H]

E+ Ionización positiva [M+H]⁺

EC Extracto crudo.

EC₅₀ Parámetro para medir la eficiencia antiradical expresada en g de antioxidante/ kg de DPPH

EP Extracto purificado.

FF Fruto fresco.

DPPH 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo.

HPLC Cromatografía líquida de alta eficiencia.

HPLC-MS Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría masas.

LnAt logaritmo natural de la absorbancia de los días 1, 5, 10, 20, 35

LnA_o logaritmo natural de la absorbancia a tiempo primer día.

Min minutos.

MeTOH metanol.

TEAC Capacidad antioxidante equivalente a Trolox.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN
1. OBJETIVOS
1.1 Objetivo General
1.2 Objetivos Específicos
2. MARCO REFERENCIAL
2.1 Antecedentes
2.2. Marco Contextual
2.2.1 Clasificación taxonómica
2.2.2 Descripción botánica
2.3 Marco Teórico
2.3.1 Pigmentos Naturales
2.3.1.1 Betalaínas
2.3.1.2 Betacianinas pigmentos rojos
2.3.1.3 Betaxantinas pigmentos amarillos
2.3.2 Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas
2.3.2.1 El pH
2.3.2.2 Temperatura
2.3.2.3 Luz
2.3.2.4 Actividad de agua (a_w)
2.3.2.5 Oxígeno
2.3.3 Betalaínas: otras moléculas antioxidantes

2.3.4 Técnicas de análisis	45
2.3.4.1 Extracción del pigmento tipo betalaína por maceración química	45
2.3.4.2 Determinación de contenido de betalaínas	46
2.3.4.3 Separación y purificación	47
2.3.4.4 Técnicas para determinación de estructura	49
2.3.4.5 Métodos para la determinación de la actividad antioxidante	50
3. METODOLOGÍA	54
3.1 Equipos	54
3.1.1 Equipos	54
3.2. Muestreo, clasificación y características del fruto	54
3.2.1 Clasificación taxonómica	54
3.2.2 Características del fruto	54
3.3. Obtención del extracto crudo	55
3.3.1 Ensayos preliminares	56
3.4 Determinación del contenido de betalaínas	56
3.5 Separación del contenido del pigmento crudo por cromatografía de capa fina	57
3.6. Eliminación de hidrocoloides y proteínas	57
3.7 Separación betaxantinas y betacianinas	58
3.8 Análisis de betalaínas por HPLC-analítica	58
3.9 Identificación de betalaínas mayoritarias	59
3.10 Determinación de fenoles totales	60
3.11 Determinación de la capacidad antioxidante:	61
3.11.1 Método de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC)	61

3.11.2 Método DPPH [2,2-difenil-1-picrilhidrazilo]	63
3.12 Estabilidad del pigmento crudo	63
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
4.1 Clasificación del fruto	65
4.1.1 Clasificación del fruto	65
4.1.2 Características del fruto	65
4.2 Obtención del extracto crudo	66
4.3 Ensayos preliminares	66
4.4 Determinación de contenido en betalaínas	68
4.5 Identificación de betalaínas	71
4.5.1 Separación del contenido de betalaínas por cromatografía de capa fina	71
4.6 Separación betaxantinas y betacianinas	72
4.7 Determinación de fenoles totales	73
4.8 Identificación de los componentes de los extractos por espectrometría de masas (HPLC-	
DAD-ESI-MS)	78
4.8.1 Identificación de los compuestos del perfil cromatográfico a 538 nm	82
4.8.2 Identificación de los compuestos del perfil cromatográfico a 280 nm de la	
fracción roja BC obtenida de la Opuntia dillenii	86
4.9 Determinación de la capacidad antioxidante	98
4.9.1 Capacidad antioxidante método TEAC	98
4.9.2 Actividad anti-radical método DPPH	102
4.10 Estabilidad del extracto crudo	108
4.10.1 Efecto de pH y luz	111

4.10.2 Determinación del % de betanina degradada	. 113
CONCLUSIONES	. 114
RECOMENDACIONES	. 116
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	. 117
ANEXOS	. 128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura general de las betaxantinas en unión con R (aminoácidos) 26
Figura 2.	Estructura de la a) betanina b) isobetanina c) betanidina d) isobetanidina
Figura 3.	Planta de Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw
Figura 4.	Cladodio con frutos
Figura 5.	Estructuras de a) clorofilas b) flavonoides c) carotenoides d) betalaínas
Figura 6.	Estructura química de las betalaínas. a) Acido betalámico presente en todas
	las moléculas de las betalaínas. b) la estructura representa dependiendo los
	sustituyentes R1 y R2 a una betaxantina o una betacianina
Figura 7.	Biosíntesis de las betalaínas. El aminoácido tirosina, en presencia de oxígeno
	y las enzimas tirosinasa, 4,5-desoxigenasa y la betanidina-6-
	Oglucosiltransferasa hacen parte de una ruta biosintética en la formación de
	las betalaínas
Figura 8.	Estructuras resonantes del cromóforo diazaheptametinamino
Figura 9.	Estructura básica de las betacianinas más abundantes especificando R en
	posición 5
Figura 10.	A) Estructuras básica de las betaxantinas. B) vulgaxantina I si R= NH2 y II si
	R=OH. C) indicaxantina D) isoindicaxantina
Figura 11.	Esquema de algunas vías de degradación de la betanina
Figura 12.	Espectro de masas de alta resolución de la betanina
Figura 13.	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante
Figura 14.	Estructura del radical ABTS 51

Figura 15.	Maceración química5	55
Figura 16.	Extracto crudo (EC)	56
Figura 17.	Reactivo de Folin Ciocalteu en reacción con compuestos fenólicos	51
Figura 18.	Fruto Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw6	55
Figura 19.	Comportamiento del extracto crudo acuoso frente a variaciones de pH	66
Figura 20.	Esquema del cambio estructural de las betacianinas en medio básico	
	(<i>pH</i> 9-11)	55
Figura 21.	Espectro UV-Vis del extracto crudo del fruto de Opuntia dillenii	58
Figura 22.	Comparación de los contenidos de betacianinas en diferentes plantas del orden	
	Centrospermae	70
Figura 23.	Ensayos de los sistemas de separación en TLC para el extracto crudo del fruto	
	de Opuntia dillenii	72
Figura 24.	Proceso de fraccionamiento de la fracción amarilla	73
Figura 25.	Recta de calibrado de ácido gálico7	74
Figura 26.	Comparación del contenido fenólico de EC, EP, BC, BX obtenidos del fruto de	
	Opuntia dillenii	76
Figura 27.	Comparación del contenido fenólico de diferentes cactáceas	77
Figura 28.	Cromatogramas HPLC-DAD-ESI-MS del extracto crudo (EC) de Opuntia	
	dillenii detectados a longitudes de onda de a) 538nm, b)480nm, c)280nm	79
Figura 29.	Cromatogramas HPLC-DAD-ESI-MS de la fracción roja (BC) de Opuntia	
	dillenii a 538, 480, 280nm respectivamente 8	30

Figura 30.	Cromatogramas HPLC-DAD-ESI-MS de la fracción amarilla (BX) de Opuntia	
	dillenii a 480, 280nm	81
Figura 31.	Espectros UV-Vis 538nm de las señales de mayor intensidad en el extracto	
	crudo del fruto de Opuntia dillenii	82
Figura 32.	Perfil cromatográfico HPLC-ESI/MS de la fracción roja del fruto Opuntia	
	dillenii	82
Figura 33.	Espectro de masas del ion molecular m/z 551.15 de la betanina o isobetanina	
	en Opuntia dillenii	83
Figura 34.	Estructura de la betanina e isobetanina m/z 551	84
Figura 35.	Espectro de masas del ion molecular m/z 505.10 de la descarboxibetanina o	
	descaboxisobetanina en Opuntia dillenii	85
Figura 36.	Estructura de 17- descarboxibetanina	85
Figura 37.	Perfil cromatográfico HPLC-DAD-ESI-MS de la fracción roja BC obtenida de	
	la Opuntia dillenii presenta las señales de 8 a 15	86
Figura 38.	Perfil cromatográfico HPLC-DAD-ESI-MS del EC de la Opuntia dillenii	86
Figura 39.	Espectro de masas del ion molecular m/z 381.05 de triptófano-betaxantina en	
	Opuntia dillenii	87
Figura 40.	Estructura de la Triptofano-betaxantina	87
Figura 41.	Espectro de masas del ion molecular m/z 493.05 de la isoramnetina-3-	
	glucoronido en Opuntia dillenii	88
Figura 42.	Estructura de isoramnetina-3-glucoronido	88
Figura 43.	Espectro de masas del ion molecular m/z 377.07 de la portulacaxantina II en	
	Opuntia dillenii	89

Figura 44.	Estructura de la tirosina-betaxantina (portulacaxantinaII)	89
Figura 45.	Espectro de masas para el ion molecular m/z 463 de la quercetina-3-O-	
	glucosido en la Opuntia dillenii	90
Figura 46.	Estructura de quercetina-3-O-glucosido	90
Figura 47.	Espectro de masas del ion molecular con m/z 755 de la 6'-O-sinapiol-6-O-	
	gonfrenina o 6'-O-sinapiol-6-O-isogonfrenina en la Opuntia dillenii	91
Figura 48.	Estructura de a) 6'-O-sinapiol-6-O-gonfrenina y b) 6'-O-sinapiol-6-O-	
	isogonfrenina	91
Figura 49.	Espectro de masas del ion molecular con m/z 767.15 de la 2'-O-Apiosil-4-O-	
	malonil-betanina o su isómero en la Opuntia dillenii	92
Figura 50.	Estructura de a) 2'-O-Apiosil-4'-O-malonil-betanina b) 2'-O-Apiosil-4'-O-	
	malonil-isobetanina	92
Figura 51.	Espectro de masas del ion molecular con m/z 975.65 de la 5"-O-E-sinapoil-2'-	
	O-apiosil filocactina o su isómero en la Opuntia dillenii	93
Figura 52.	Estructura de a) 5"-O-E-sinapoil-2'-O-apiosil filocactina, b)	93
Figura 53.	Cromatograma HPLC-DAD-ESI-MS de la fracción amarilla (BX) en la	
	Opuntia dillenii a 480nm	94
Figura 54.	Espectro de masas del ion molecular con m/z 367 del ácido feruloil quínicoen	
	la Opuntia dillenii	94
Figura 55 .	Estructura del ácido feruloil quinico	95
Figura 56.	Espectro de masas del ion molecular con m/z 190.8 del ácido quínico en la	
	Opuntial dillenii	95
Figura 57.	Estructura del ácido quínico	95

Figura 58.	Espectro de masas del ion molecular con m/z 309 de la prolina-betaxantina
	en Opuntia dillenii
Figura 59.	Estructura de la prolina- betaxantina (indicaxantiana)96
Figura 60.	Recta de calibración para determinar la capacidad antioxidante
Figura 61.	Comparación de los valores TEAC del ECy EP del fruto de Opuntia dillenii 100
Figura 62.	Comparación de capacidad antioxidante en µmol Trolox/Kg fruto Opuntia
	dillenii con otros frutos 101
Figura 63.	Recta de calibración DPPH ⁻ 102
Figura 64.	Comportamiento de concentraciones de ácido gálico frente al radical DPPH [•] 103
Figura 65.	Curva con diferentes concentraciones de ácido gálico104
Figura 66.	Grafica que relaciona % remanente de DPPH con el tiempo para las muestras
	obtenidas del fruto de Opuntia dillenii a)EC b) EP c) BC d) BX 106
Figura 67.	Graficos de la variable $ln(A_t/A_0)$ con respecto al tiempo a) pH 3 presencia y
	ausencia de luz b)pH 5 en presencia y ausencia de luz c) a pH 7en presencia y
	ausencia de luz
Figura 68.	Tiempo de vida media Vs condiciones de almacenamiento del EC acuoso del
	fruto de Opuntia dillenii

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Betalaínas más abundantes encontradas en plantas del orden Centrospermae 38
Tabla 2.	Programa de gradiente de elución 59
Tabla 3.	Condiciones de análisis en HPLC-ESI-MS
Tabla 4.	Características iniciales del fruto de opuntia (Opuntia dillenii)
Tabla 5.	Absorbancias medidas a las longitudes de onda de máxima absorción
Tabla 6.	Contenido de betacianinas y betaxantinas para el extracto crudo en 100g de fruto
	fresco
Tabla 7	Comparación en el contenido de betalaínas entre diferentes especies o variedades 70
Tabla 8.	Resultados obtenidos del método Folin Ciocalteau con ácido gálico74
Tabla 9	Contenido fenólico para EC, EP, BC, BX
Tabla 10.	Comparación del contenido fenólico en mg ácido gálico/100g fruta de diferentes
	cactáceas77
Tabla 11.	Estructuras tentativas de los compuestos mayoritarios caracterizados por
	espectrometría de masas de EC, BC, BX97
Tabla 12	Datos de absorbancia de las muestras analizadas para el método TEAC
Tabla 13.	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox de las muestras EC, EP, y las
	fracciones: BC, y BX
Tabla 14.	Valores TEAC en otras especies
Tabla 15.	Valores EC ₅₀ para EC, EP, BC, BX y ácido gálico 107

Tabla 16.	Condiciones de almacenamiento y parámetros cinéticos de degradación de	
	betalaínas para el extracto crudo acuoso	. 111
Tabla 17.	Resultados del % de betanina degradada encontrados a las condiciones	
	establecidas.	. 113

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. GRAFICAS	. 129
ANEXO B. COMPUESTOS NO IDENTIFICADOS) POR HPLC-ESI-MS	. 131

INTRODUCCIÓN

El color es uno de los atributos más importantes de los alimentos; es considerado como un indicador de calidad que determina con frecuencia su aceptación, existiendo así aditivos para comestibles de tipo sintético, que refuerzan el color perdido durante el procesamiento de los alimentos. Sin embargo, las personas evitan cada vez con y mayor frecuencia el consumo de alimentos con colorantes sintéticos, prefiriendo pigmentos naturales, que se consideran inofensivos o incluso saludables; esto conlleva a la búsqueda de fuentes naturales de las cuales se pueda obtener compuestos que aporten en la coloración.

El fruto de las cactáceas actualmente es de gran interés investigativo debido a que se ha encontrado en diferentes especies de cactus del género *Opuntia* la presencia de pigmentos tipo betalaína, y estos son los responsables del color característico rojo-violeta, naranja y amarillo (Correa *et al.*, 2011). Las betalaínas son compuestos *N*- heterocíclicos, solubles en agua que se encuentran depositados en las vacuolas de las células. La estructura de estos compuestos se deriva del ácido betalámico y su biosíntesis se lleva a cabo a partir del aminoácido tirosina (Osorio et al., 2011).

Interesantemente el betabel (*Beta vulgaris spp*) es la fuente principal de esta clase de pigmentos y es uno de los frutos más utilizados a nivel industrial por su alto contenido de betacianinas. Sin embargo, es conveniente aprovechar otras fuentes de explotación de estos pigmentos. Stintzing y Carle (2004) consideran que las fuentes promisorias de betalaínas se encuentran en la familia *Cactaceae* principalmente del género *Opuntia*.

Las cactáceas, crecen en zonas áridas y semi-áridas y en el departamento de Nariño se ha encontrado la especie clasificada por el herbario de la Universidad de Nariño como: *Opuntia dillenii* (Ker Gawl.) Haw especie que es subexplotada; sin embargo con la información

generada en el presente trabajo se amplió su conocimiento en cuanto a composición química, propiedades bioactivas y la cinética de degradación por almacenamiento, aspectos básicos importantes para su utilización como aditivos de alimentos, que les proporcionan un valor agregado, consistente en el beneficio que comporta para la salud humana, debido a las propiedades medicinales que se han reportado, entre las que se encuentran tratamientos para diabetes, hipertensión y reducción del colesterol (Tesoriere *et al.*,2003),(Derache R,1999)

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Realizar un estudio químico de las betalaínas presentes en el fruto de *Opuntia dillenii* procedente del municipio de Chachagüi-Nariño.

1.2 Objetivos Específicos

- Extraer y cuantificar mediante la combinación de diversas técnicas de separación como: extracción sólido-líquido, cromatografía en columna, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), los pigmentos mayoritarios del fruto de *Opuntia dillenii*.
- Realizar la caracterización química de los pigmentos mayoritarios encontrados en el fruto de *Opuntia dillenii* utilizando espectrofotometría en la región UV-visible, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a masas (HPLC-MS).
- Evaluar la estabilidad del extracto crudo del fruto de *Opuntia dillenii* frente a factores como: pH y luz.
- Evaluar mediante los métodos TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), la capacidad antioxidante *in-Vitro* de los extractos EC (crudo), EP(purificado), BC(rojos), BX(amarillos) de *Opuntia dillenii*.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Antecedentes

Se han encontrado diversas publicaciones referentes a la extracción, identificación, capacidad antioxidante de betalaínas en cactus en diferentes países, especialmente, en México, China, Japón y España; y en Sri Lanka (Correa *et al.*, 2011, Osorio *et al*, 2011, Zhu *et al.*, 2010, Qui *et al.*,2002,)se desarrollaron estudios sobre la actividad microbiana en cladodios y flores. Sin embargo, no se han reportado estudios de identificación y estabilidad de la especie *Opuntia dillenii* (Ker Gawl).

A continuación se presenta algunos trabajos realizados en diferentes especies de cactus.

Stintzing y colaboradores identificaron cinco betaxantinas en remolacha amarilla (*Beta vulgaris ssp. Beta Vulgaris cv. Bejo Zaden*) y *Opuntia (Opuntia ficus-indica cv. Gialla*) por HPLC acoplado a espectroscopia de masas, encontrando betalaínas características por la unión de ácido betalámico con serina, ácido γ -aminobutírico, valina, isoleucina y fenilalanina (figura 1).



Figura 1. Estructura general de las betaxantinas en unión con R (aminoácidos)

Fuente. Este estudio

En la India fue desarrollado un modelo de optimización para la extracción de betalaínas de *Opuntia ficus-indica* mediante el diseño de Box-Behnken; en él se estudió el efecto individual e interactivo de las variables (temperatura, tiempo, masa del fruto y pH) en la concentración de betalaínas y el color del extracto obtenido. Las condiciones óptimas encontradas fueron: temperatura de extracción de 42°C, tiempo de extracción de 115 min, masa de 1,2 g y pH de 6,9. Obteniendo valores de 41,54 mg / 100 g para la concentración betalaínas y 21,35° CIE a * b * para el color respectivamente (Prakash *et al.*, 2013).

En Chile se desarrolló la técnica de microencapsulación de la pulpa del nopal (Opuntia *ficus-indica*) con el objetivo de estabilizar las betalaínas del extracto obtenido por tecnología de membranas y la pulpa de tuna, utilizando microencapsulación. Para la obtención del extracto de tuna púrpura se aplicó microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF). Con los resultados obtenidos, los autores concluyeron que el extracto UF correspondió a una solución clarificada (sin mucílago), con un contenido de betalaínas similar al de la pulpa, pero con un menor contenido de azúcares. Como agente encapsulante se utilizó capsul (C) y K4484 (K); los sistema de trabajo fueron UF y pulpa de tuna purpura (P). La temperatura del aire de entrada al secador y la relación (P ó UF)/agente encapsulante tuvieron un efecto significativo sobre la eficiencia de encapsulación (EE), la recuperación (R) de betacianinas y betaxantinas y el rendimiento del proceso. Todos los sistemas de micropartículas obtenidos bajo condiciones óptimas mostraron EE de betacianinas y betaxantinas superior al 98%. También realizaron el estudio de la cinética de degradación de betacianinas y betaxantinas, bajo condiciones óptimas, durante el almacenamiento a 30, 45 y 60°C. La degradación de betalaínas siguió una cinética de pseudoprimer orden a todas las temperaturas y sistemas estudiados. Las constantes de velocidad de degradación de la betacianinas y betaxantinas fueron significativamente mayores en el sistema P-

C respecto a P-K, UF-C y UF-K. Las recuperaciones de las betacianinas y betaxantinas alcanzaron valores entre 68,5 – 77,8 % y 79,2 - 100%, respectivamente y sobre 62% de rendimiento. Según estos resultados los autores sugieren que el mucílago o el mayor contenido de azúcar de CP incrementan la higroscopicidad de las micropartículas CP-C, lo que lleva a la degradación de la betacianina, proponiendo la hidrólisis como el mecanismo principal de la degradación de las betalaínas durante el almacenamiento con micropartículas (Vergara *et al.,* 2014).

En México, Osorio y colaboradores (2011) trabajaron con las tunas agrias, frutos conocidos con el nombre de *Opuntia joconostle*, que se cultivan en la zona central de ese país. Las frutas se analizaron como fruta entera y cada parte de las frutas, incluyendo pericarpio, mesocarpio y endocarpio; estudiaron el contenido fenólico, cuantificaron el pigmento y la actividad antioxidante por el método de DPPH de cada extracto metanólico; encontrando en el pericarpio la mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides totales y en el endocarpio se encontró la mayor concentración de betacianinas (23,03 mg betanina equivalentes / 100 g de peso fresco) que en el pericarpio y mesocarpio. Las Betacianinas que los autores identificaron mediante el análisis HPLC-PDA-MS fueron betanina, isobetanina, betanidina, isobetanidina (figura 2); y finalmente el fruto del joconostle mostró una alta actividad antioxidante principalmente en el pericarpio.



Figura 2. Estructura de la a) betanina b) isobetanina c) betanidina d) isobetanidina Fuente. Este estudio

También hay aplicaciones para evaluar la variación en el contenido de betalaínas, fenoles totales y actividad antioxidante. En México, Correa y colaboradores estudiaron la fruta de cactus (*geometrizans Myrtillocactus*), los frutos fueron tratados con caseinato de sodio (Na-Cas), un recubrimiento comestible a base de sorbitol (S) y glicerol (G), y sus contenidos fitoquímicos fueron evaluados. Los frutos fueron embalados en cajas de concha de almeja y se almacenaron a 5 ± 1 ° C durante 15 días. Los autores reportaron que los niveles de polifenoles disminuyeron más del 50% después de 7 días de almacenamiento. Por el contrario, indicaron que los niveles totales de Betalaínas se mantuvieron estables durante los 15 días de

almacenamiento. La capacidad antioxidante, medida por DPPH (1,1-difenil-2- picrilo-hidrazina), se mantuvo constante en los extractos de cactus durante el almacenamiento, determinando que los recubrimientos comestibles no tienen ningún efecto sobre la capacidad antioxidante. (Correa *et al.*, 2011)

2.2. Marco Contextual

2.2.1 Clasificación taxonómica

El fruto del cactus, pertenece a la familia de las Cactáceas, subgénero *Opuntia* crece en regiones áridas y semiáridas (Pimienta *et al.*, 2002). En el mundo se conocen aproximadamente 300 especies del género *Opuntia* que son originarias del continente americano y se encuentran distribuidas desde el norte de Canadá hasta el sur de Chile, también en Sudáfrica y países de la cuenca del Mediterráneo (Butera *et al.*, 2002). En Colombia el cactus *opuntia dillenii* (figura 3) se encuentra distribuido en los departamentos de: Santander, Boyacá, la Guajira y Nariño.



Figura 3. Planta de Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw.

Fuente. Este estudio

2.2.2 Descripción botánica

La cactácea *Opuntia dillenii* es una especie de planta arbórea de entre 3m a 6m de altura, sus ejemplares pueden ser arbustivas altas de 4 metros de alto, semiarbustivas de 1 metro de alto o rastreras, conformadas por varios cladodios espinosos de color verde- azul, que miden de 7 a 40 cm de largo y 6 a 9 cm de grosor; estos se unen uno sobre el otro formándose así la planta. Los cladodios más antiguos de la planta se recubren de una capa blanca y van tomando la forma de tallo recto que es el soporte de la misma. El fruto se caracteriza por tener una forma ovoide con un tamaño de 4 a 5 cm de largo, el color del fruto es verde cuando se está formando, y rojo-fucsia cuando madura (figura 4).



Figura 4. Cladodio con frutos

Fuente. Este estudio

2.3 Marco Teórico

2.3.1 Pigmentos Naturales

Los pigmentos naturales son los que imparten color a las plantas y animales. Un tinte es un colorante certificado por la *food and drug administration* (FDA) con cierto grado de solubilidad en agua utilizado en alimentos (Saldaña, 2004). Los pigmentos que comúnmente contribuyen al color de las frutas y las hortalizas son clasificados en cuatro grupos generales: clorofilas, carotenoides, flavonoides y betalaínas (figura 5) (Paz, *et al.*, 2008).

La clorofila es un pigmento liposoluble, que se encuentra en la naturaleza en cuatro tipos diferentes a, b, c, d. y que se diferencian por su estructura química. Las clorofilas a y b se encuentran en plantas superiores. La clorofila a es de coloración verde-amarilla, es más abundante que la clorofila b y es el pigmento fotosintético primario en las plantas verdes. La clorofila b, (verde-azul) se encuentra junto con la clorofila a en algas verdes y plantas altas en tanto que, la clorofila c y la clorofila a, se encuentran en algas cafés y diatomeas (Bjön *et al.*, 2009). La clorofila es la principal molécula que absorbe luz solar en el proceso de la fotosíntesis y da la coloración a las plantas verdes (Borovsky, *et al.*, 2008). Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos, con poca o nada solubilidad en agua, pero muy solubles en solventes orgánicos. Su estructura está formada por largas cadenas de isopreno (Yahia, *et al.*, 2010). Los flavonoides tipo antocianina, proporcionan los colores azul rojo y violeta a los frutos, flores y hojas en una gran variedad de plantas; las betalaínas por su parte tienen coloraciones que van del rojo al amarillo.



Figura 5. Estructuras de a) clorofilas b) flavonoides c) carotenoides d) betalaínas

Fuente: Paz, et al., 2008

2.3.1.1 Betalaínas

Las plantas que contienen estos pigmentos se limitan a diez familias del orden *Centrospermae* las cuales son: Chenopodiaceae, Amaranthaceae, *Portulacaceae*, Nyctaginaceae, Phytolacaceae, Stegnospemaceae, Arizoaceae, Bascallaceae, Mesembryanthemaceae, Cactaceae y Didieraceae (Villegas et al., 1983). La presencia de betalaínas en plantas es mutuamente excluyente de la presencia de antocianinas, debido a que en la biosíntesis el aminoácido precursor es diferente (Fennema, et al., 1995).

Las betalaínas son compuestos orgánicos solubles en agua, con peso molecular que oscila entre 400 y 1000g/mol. La estructura de las betalaínas es diferente a la de otros pigmentos encontrados en el reino vegetal, ya que son compuestos *N*- heterocíclicos, y abarca todos los compuestos con estructuras basadas en la formula estructural mostrada en la figura 1 (Sánchez,, 2006); por lo tanto son derivados de la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico (Piatelli, 1981). Se conocen más de 50 betalaínas, y todas tienen la misma estructura básica, en la cual R_1 y R_2 puede ser un hidrógeno o un sustituyente aromático (figura 6).



Figura 6. Estructura química de las betalaínas. a) Acido betalámico presente en todas las moléculas de las betalaínas. b) la estructura representa dependiendo los sustituyentes R1 y

R2 a una betaxantina o una betacianina.

Fuente: Böhm et al., 1988

La ruta biosintética figura (7) de las betalaínas parte del aminoácido tirosina, que se incorpora completamente a la unidad estructural de estos pigmentos, el ácido betalámico. En las betalaínas color violeta (betacianinas), se incorpora además una segunda unidad de tirosina. Sólo dos enzimas controlan la formación de esta familia de pigmentos: la dioxigenasa y la tirosinasa; una tercera; la glucosiltransferasa, cataliza la formación de derivados de las betacianinas. La condensación del ácido betalámico con aminoácidos y aminas es espontánea lo que genera gran variedad de estructuras (García *et al.*, 2015).



Figura 7. Biosíntesis de las betalaínas. El aminoácido tirosina, en presencia de oxígeno y las enzimas tirosinasa, 4,5-desoxigenasa y la betanidina-6-Oglucosiltransferasa hacen parte

de una ruta biosintética en la formación de las betalaínas

Fuente. Garcia, 2011

El color de estos pigmentos se lo atribuye a los dobles enlaces conjugados en resonancia del núcleo aromático -R substituido con el cromóforo del 1,7-diazoheptametinamino (Böhm *et al.*, 1988), (figura 8). Cuando la conjugación se extiende hasta 'R la máxima absorción de luz que presenta el compuesto es a 540nm característica de las betacianinas rojas. Por otra, parte cuando la conjugación del sistema no se extiende hasta 'R el compuesto exhibe un máximo de

absorción de luz aproximadamente a 480nm, tratándose en este caso de las betaxantinas amarillas (Sánchez, 2006).



Figura 8. Estructuras resonantes del cromóforo diazaheptametinamino

Fuente: Fennema, 1995

2.3.1.2 Betacianinas pigmentos rojos

Las betacianinas (pigmentos rojos) tienen como principal componente a la betanina; su naturaleza es altamente iónica por contener tres grupos carboxilo, dos de ellos con un pKa de 3.4 y otro de 2.0; además de un grupo fenólico con pKa de 8.5 y dos carbones asimétricos en la posición 2 y 15; siendo las betacianinas ópticamente activas porque tienen dos carbonos quirales en las posiciones C2 y C15 (Ver figura 9). Las betacianinas pueden ser glicosiladas y / o aciladas, produciendo así las 29 estructuras conocidas hasta la fecha, que debido a la estereoisomería en el carbono C15 se duplica el número de estructuras, excepto para neobetanina que no tiene un centro quiral en C-15(Stintzing *et al.*, 2001).

Las betacianinas (Rodríguez, 1985) se pueden hidrolizar con ácidos o enzimas y formar los agliconas (moléculas carentes de azúcar) llamados betacianidinas y el azúcar respectivo. Los agliconas en todas las betacianinas son diasteroisómeros y se les dio los nombres de betanina e isobetanina debido a que se encontraron por primera vez en el betabel y amarantina e isoamarantina que se encontraron en el amaranto tricolor. Las diferencias entre las betacianinas se deben a la presencia de un residuo específico en la posición 5 como lo muestra la figura 9. La
betacianina más abundante en el betabel es la betanina y se encuentra en una proporción de 75 a 95 % del total de betalaínas y es la más estudiada hasta ahora.



Figura 9. Estructura básica de las betacianinas más abundantes especificando R en

posición 5.

Fuente: Sánchez, 2006

En la familia *Cactaceae* la betanina es la betalaína más abundante, asimismo, se ha detectado la presencia de filocactina (R= 5-O-Glu-6'-O-malonil), que se encuentra en menor cantidad (Franco, 2004). En la tabla 1 se presentan la betalaínas más abundantes, entre las cuales se encuentran iresina, celosianina, betanidina, betanina etc, el residuo en la posición 5 y la longitud de onda de máxima absorbancia de las mismas, según se ha encontrado para las plantas del orden *Centrospermae*(Cai et al.,2005).

Tabla 1.

Betalaínas más abundantes encontradas en plantas del orden Centrospermae

Betalaína	Residuo	λmax /(nm) espectro		
	Aglicona	visible		
Iresina	-OH	538		
Isoiresina		538		
Celosianina	5-O-Glucosa	544-546		
Isocelosinina		542-544		
Betanidina	-OH	536		
Isobetanidina				
Betanina	5-O-Glucosa	535		
Isobetanina		535		
Amarantina	acido 2'-glucoronico-	536		
Isoamarantina	glucosa			
Gomprenina	6-O-Glucosa	540		
Isogomprenina				

Fuente: Cai et al., 2005

En las betacianinas, la glucosa es el azúcar más común y los azúcares menos frecuentes son la soforosa y la ramnosa; es también frecuente que se encuentren grupos sulfúrico, malónico, 3-hidroxi-3-metilglucósido, cítrico, p-cumárico, ferúlico, cafeico, y sinápico (García, 2008).

2.3.1.3 Betaxantinas pigmentos amarillos

De las betaxantinas (pigmentos amarillos) se tienen pocos datos ya que han sido poco estudiadas, debido principalmente a que son más difíciles de aislar, pero se tienen indicios de que son mucho más lábiles a pH superior a 3 que las betacianinas (Rodríguez, p. 1985). Piatelli y Minale en 1964 aislaron y caracterizaron la primera betaxantina a partir de los frutos del cactus *Opuntia ficus-indica*.

En el caso de las betaxantinas, el sustituyente R_1 en (figura 10A es un grupo amino o aminoácido y R_2 es usualmente un hidrogeno, así: en la indicaxantina (figura 10B), R_1 y R_2 forman un grupo prolina, y en la vulgaxantina I y II (figura 10C) presente en la especie *Beta vulgaris*, en donde R_1 es un residuo derivado del ácido glutámico (Sekiguchi *et al.*, 2010).



Figura 10. A) Estructuras básica de las betaxantinas. B) vulgaxantina I si R= NH2 y II si R=OH. C) indicaxantina D) isoindicaxantina

Fuente. Sekiguchi et al., 2010

Por lo tanto las BETAXANTINAS difieren de las BETACIANINAS en que el grupo indol es sustituido por un aminoácido.

2.3.2 Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas

La estabilidad del color es un factor que restringe el uso de los pigmentos naturales en la industria de alimentos.

La estabilidad de las betalaínas es influenciada fuertemente por el pH, la temperatura, la luz, la actividad de agua (a_w) y la presencia de oxígeno (Castellar *et al.*, 2003).

2.3.2.1 El pH

Las betalaínas son relativamente estables a lo largo un amplio rango de pH que va desde 3 a 7 sin que experimenten cambio de coloración; ésta característica permite su aplicación en alimentos ácidos. Las soluciones de betalaínas en este intervalo de pH muestran un espectro de absorción en el rango visible similar para betacianinas y betaxantinas (Von Elbe *et al.*, 1974). La longitud de onda (λ) de máxima absorbancia para betacianinas se encuentra entre 537 y 538 nm, mientras el máximo para betaxantinas se encuentra aproximadamente a 475 nm (Azedero, 2009). A pH ácido (3.5), λ se presenta un desplazamiento hipsocromico, por arriba de pH 7, λ cambia a un valor más elevado presentándose un desplazamiento batocromico. También como efecto de la degradación del pigmento se ha observado disminución intensidad del máximo absorción (efecto hipocrómico). El pH óptimo para una máxima estabilidad de la betanina está entre 5-6 (Huang, A *et al.*, 1987).

2.3.2.2 Temperatura

La temperatura es un factor crítico en la estabilidad de las betalaínas. La degradación térmica ha sido estudiada por varios autores (Huang *et al.*, 1987, Drdák *et al.*, 1990, Altamirano *et al.*, 1993, Saguy *et al.*, 1978) quienes encuentran que al calentar soluciones de betanina se

produce una reducción del color rojo característico de este pigmento y surge la aparición de un color ligeramente marrón. La degradación térmica de la betanina en presencia de oxígeno sigue una cinética de primer orden (Von Elbe *et al.*, 1974), si se calienta la betanina a altas temperaturas (mayores de 60 °C) y por tiempos prolongados (mayores a una hora), se acelera la hidrólisis de este compuesto en solución, produciendo ácido betalámico y el ciclodopa-5-O-glucósido como productos intermediarios; sin embargo, esta reacción es parcialmente reversible dependiendo del pH (Huang *et al.*, 1987, Sanchez, 2006).

2.3.2.3 Luz

Von et al 1974 y Cai *et al.*, 1998, reportaron que las betalaínas por causa de la exposición a la luz experimentan un índice de degradación de 15.6%; sin embargo no se han encontrado mecanismos de degradación térmica de estos pigmentos. Adicionalmente, la degradación de Betalaínas inducida por la luz es dependiente de oxígeno, porque se ha observado que los efectos de exposición a la luz son insignificantes en condiciones anaeróbicas (Attoe *et al.*, 1985).

2.3.2.4 Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) es otro de los factores que influyen en la estabilidad de los pigmentos y el color de los alimentos que los contienen. La mayor estabilidad del pigmento (cinética de primer orden) fue encontrada en alimentos o sistemas modelo con un bajo contenido de humedad y de a_w . El efecto de la actividad de agua en la estabilidad de betalaínas puede ser atribuido a una movilidad reducida de los reactivos o a la limitada solubilidad de oxígeno en un sistema experimental. (Delgado *et al.*, 2000).

2.3.2.5 Oxígeno

La presencia de oxígeno produce en las betalaínas cambio de color rojo a marrón y la degradación del pigmento. En 1974 Von Elbe y colaboradores almacenaron en solución buffer de

citrato-fosfato a pH 7, betanina, en dos atmosferas diferentes (aire y nitrógeno) para observar la influencia de los dos ambientes, por 6 días a 15°C; observando que la degradación del color aumentó hasta un 15% cuando la betanina fue expuesta al aire. La betanina reaccionó con el oxígeno molecular, produciendo la degradación del pigmento en soluciones saturadas con oxígeno.

En cuanto a aspectos estructurales, las betacianinas han sido más estables que las betaxantinas, a temperatura ambiente. Comparando la estabilidad de diferentes betacianinas en calentamiento se evidenció que las estructuras glicosiladas son más estables que las agliconas, debido a que los azucares unidos a la aglicona protegen a la molécula de la hidratación, evitando así su degradación (Von *et al.*, 1985). Además, algunos estudios han indicado que la estabilidad de la betacianina también se estabiliza por la presencia de ácidos alifáticos ó aromáticos, especialmente en la posición 6-O de la estructura, esto debido a que permiten la formación de estructuras tipo *sandwich* que protegen del ataque del agua.

Herbach *et al.*, 2006 encontraron mediante espectrofotometría Uv- Vis y cromatografía líquida de alto rendimiento y detección por arreglo de diodos (HPLC-DAD) diferentes productos de degradación térmica de la betanina y betacianinas aciladas (filocactina y hilocerenina). Ellos observaron que la betanina fue más estable que las estructuras aciladas, sin embargo, la estabilidad tintórea de filocactina y sobre todo de soluciones de hilocerenina en las misma condiciones se favorecen por la formación de productos de degradación de color rojo con alta retención de color (Azedero, 2009).

La figura 11 muestra las posibles rutas de degradación térmica y por influencia de pH de soluciones acuosas de la betanina. En el esquema se puede observar rupturas del enlace aldimina; generando el ciclo Dopa y el ácido betalámico dando como resultado la pérdidas del

color, también se observa deshidrogenaciones y descarboxilaciones de las betalaínas resultados que se obtiene por la exposición de estos pigmentos frente al calor y al cambio de pH.



Figura 11. Esquema de algunas vías de degradación de la betanina.

Fuente. Herbach et al., 2004

2.3.3 Betalaínas: otras moléculas antioxidantes

Namiki, (1990) menciona que la principal característica de un compuesto o sistema antioxidante es la prevención o detección de una cadena de propagación oxidativa mediante la estabilización de un radical y la regeneración del antioxidante radicalario. En este sentido, en este trabajo se valora este tipo de actividad en los extractos aislados de *Opuntia dillenii*.

Como parte del envejecimiento normal del organismo humano se producen un número considerable de sustancias químicamente inestables, llamadas especies reactivas de oxígeno que en su mayoría son radicales libres. El daño oxidativo de estas especies radicalarias logran producir en las células consecuencias nocivas en su función, por tal razón estas se asocian con el desarrollo de numerosas patologías y enfermedades degenerativas como el cáncer y la diabetes (Chihuailaf *et al.*, 2002). En la naturaleza existen compuestos antioxidantes que inhiben la acción de estas especies y pueden evitar el daño producido por estos radicales en los seres vivos.

Los antioxidantes provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. En algunos alimentos existen otros antioxidantes no nutrientes llamados compuestos fenólicos que son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Estos se sintetizan como metabolitos secundarios y presentan funciones de defensa y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia, el sabor y el aroma de los vegetales; ellos se encuentran en las verduras y frutas, y en productos derivados como el vino o la cerveza. Todos ellos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo (Bravo, 1998) En adición a esto, se ha demostrado en ensayos *in vitro*, que las betalaínas poseen actividad antioxidante (Cai *et al.*, 2003), la que se atribuye a la presencia de un grupo fenólico y un grupo amino cíclico, capaces de donar electrones y átomos de hidrógeno estabilizando radicales libres (Moreno *et al.*, 2008). Algunos informes basados en pruebas demuestran que la remolacha está entre las diez verduras más potentes con respecto a su actividad antioxidante (Halvorsen *et al.*, 2002). Wu *et al.*, (2006) informaron que la cáscara de pitahaya roja tiene los niveles más altos de betacianina comparada con la pulpa, y presenta también mayor actividad antioxidante que ésta siendo un fuerte inhibidor *in vitro* de la proliferación de células de melanoma.

Además de ser un antioxidante (Georgiev *et al.*, 2001), los pigmentos tipo betalaína son utilizados como colorantes de alimentos, ya que tienen una amplia gama de actividades biológicas deseables; actuando como: antiinflamatorio, antifúngico, y anticanceroso (Stintzing *et al.*, 2004).

2.3.4 Técnicas de análisis

2.3.4.1 Extracción del pigmento tipo betalaína por maceración química

Este es un método ampliamente utilizado para la extracción de esta clase de pigmentos naturales. Siendo esta una operación básica cuya finalidad es la separación de uno a más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase liquida o disolvente. El componente o componentes que se transfieren a la fase liquida reciben el nombre de soluto y es el que se recupera, mientras que el sólido insoluble se denomina material vegetal de desecho o inerte. Este tipo de operaciones se lleva a cabo en una o en múltiples etapas. Una etapa es aquella en la que se ponen en contacto las dos fases durante un determinado tiempo de

forma que se realiza transferencia de materia entre los dos componentes de las fases y el sistema sólido-líquido va aproximándose al equilibrio a medida que transcurre el tiempo.

Una vez alcanzado el equilibrio se procede a la separación mecánica de las fases. En realidad es difícil que en una etapa se llegue al equilibrio. Las formas de operación utilizadas en los procesos de extracción pueden ser continuas o discontinuas. En discontinuo puede utilizarse una etapa simple o bien múltiples etapas con disolvente nuevo en cada etapa o en contra corriente. Una etapa simple consta de utilizar agitación magnética, donde se pone en contacto el sólido y el disolvente durante un cierto tiempo en contacto (Ribas *et al.*, 2005).

Para la extracción de estos pigmentos, el fruto se macera en agua o se muele el material. En la mayoría de los casos es necesario utilizar como disolvente soluciones acuometanólicas o acuoetanólicas (del 20% al 50% v/v) en diferentes porcentajes para alcanzar la extracción completa (Piatelli, 1981). Algunas veces hay necesidad de hacer una fermentación aerobia del jugo por medio de *saccharomyses cerevisiae y aspergillus niger* para reducir químicamente los azúcares libres y aumentar el contenido de betacianina (Pourrat *et al.*, 1988).

2.3.4.2 Determinación de contenido de betalaínas

La cuantificación de los pigmentos tipo betalaína se realiza por métodos espectrofotométricos basados en las propiedades fotométricas de estos compuestos, según las cuales absorben luz en determinadas regiones del espectro visible (betaxantinas: 470-480nm y betacianinas: 538-540nm).

Las absorbancias que se determinan en soluciones del extracto obtenido a las longitudes de onda señaladas deben ser menores a 1. El contenido de betalaínas se calcula por medio de la siguiente ecuación:

BC $[mg/g] = [(A(DF)(MW)Vd/\varepsilon LWd)]$ (Stintzing et al., 1999)

Dónde:

A = absorbancia de la solución a analizar

DF = factor de dilución

MW= peso molecular de betanina o indicaxantina (550 g/mol; y 408 g/mol respectivamente).

Vd = volumen de solución.

 $\varepsilon = coeficiente de extinción molar. 60,000 L/(mol cm) en H₂O betanina; 48000 L/(mol cm) en H₂O idicaxantina.$

L =longitud de la celda.

 $Wd = peso \ de \ la \ muestra.$

2.3.4.3 Separación y purificación

Para la separación y purificación de los pigmentos vegetales, se emplean diferentes técnicas analíticas entre las que están: cromatografía de capa delgada y de columna.

• Cromatografía de capa delgada

Debido a que las betalaínas, presentan bajos coeficientes de retención (Rf), la cromatografía en capa fina (TLC) no es la técnica preferida para su separación. Bilyk y colaboradores, desarrollaron un sistema preparativo de TLC en una placa revestida con celulosa (0.5 mm) en el que usaron dos fases móviles: isopropanoletanol- agua-ácido acético en una relación de 6:7:6:1 (v/v) para la primera mezcla de disolventes y para la segunda etapa se emplearon los mismos disolventes pero en una proporción de 11:4:4:1 (v/v). Cuando los autores incorporaron el ácido en este sistema de disolventes, la movilidad de las betalaínas en la placa se facilitó debido a la protonación del grupo carboxílico de la betacianina, debido a que el anión carboxilato proporciona un sistema eléctricamente neutro por su interacción con el nitrógeno

cuaternario, el mismo efecto se observó para las betaxantinas (Sanchez, 2006). Los autores concluyen que no es necesario usar revelador debido que la separación de los pigmentos se ve claramente.

• Comatografía HPLC

La cromatografía HPLC (High performance liquid chromatography) es un método ampliamente utilizado para separación y análisis. La identificación tentativa de las betalaínas puede ser deducida de su comportamiento y comprobada mediante su espectro de masas y su tiempo de retención (t_R). La cromatografía líquida de alta eficiencia, utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a pasar por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así una separación de gran resolución. La cromatografía liquida se hace con columnas empaquetadas, estas columnas son de acero o de plástico de una longitud de 5-30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. "El soporte más común de HPLC son partículas microporosas de sílice muy pura que son permeables al disolvente. La cromatografía de adsorción sobre sílice es un ejemplo de cromatografía fase normal, que se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar. La cromatografía de fase inversa o reversa, que es la más utilizada, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y el disolvente es más polar" (Harris, 2007).

La primera aplicación de cromatografía líquida de alta eficiencia en betalaínas fue realizada por Vicent y scholz (1978), para ello se utilizaron una columna C_{18} , con una elución en gradiente utilizando tetrabutilamonio como fase móvil. Las columnas de soporte más utilizadas son C_8 y C_{18} , en fase reversa de tamaños de partícula entre 5 a 10 µm, mientras que los disolventes más usados han sido agua/metanol o mezclas de agua/acetonitrilo, acidificado con ácido acético o fórmico (Strack *et al.*, 1993), obteniéndose buenos resultados al utilizar estos sistemas de separación.

2.3.4.4 Técnicas para determinación de estructura

• Espectrofotometría UV-Visible

El análisis de las betalaínas, como el de otros compuestos coloridos se basa en la espectrofotometría UV-vis que es una técnica instrumental de amplio uso, en la que se estudia la absorción por parte de la materia de las radiaciones comprendidas en las zonas UV y visible del espectro electromagnético. La absorción selectiva de radiación produce el espectro de absorción, que proporciona información fundamental para la determinación de la composición química, la estructura y las propiedades de la materia (Martínez, 2009).

• Cromatografía HPLC-ESI/MS

El acoplamiento de un detector de espectrometría de masas a un sistema de separación cromatográfico constituye una herramienta que permite resolver con las suficientes garantías los problemas de identificación y cuantificación de sustancias. La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, HPLC-MS, suministra información del ión molecular y posibles fragmentaciones que contribuyen a la determinación de la estructura. Para una mejor identificación de los picos, se utiliza el modo positivo para betalaínas (fragmentación molecular $[M+H]^+$). La identificación de los compuestos se basa en una comparación de los tiempos de retención de HPLC (t_r), espectro UV-visible, espectrometría de masas (fragmentos) con compuestos patrones auténticos y los datos publicados. (Yeddes *et al.*, 2013).

La identificación de betalaínas por HPLC-MS ha sido reportada por varios autores (Kugler *et al.*, 2007; Stintzing *et al.*, 2005; Castellanos *et al.*, 2008).

La betanina, pigmento betalámico más abundante en las especies naturales que aportan este tipo compuestos, La figura 12 muestra un espectro de masas característico, debido a que presenta una señal intensa del ion molecular [M+H]⁺ de 551.85 y un ion fragmento 389.85 correspondiente a la pérdida de una hexosa162u.



Figura 12. Espectro de masas de alta resolución de la betanina.

Fuente. Khan et al., 2012

2.3.4.5 Métodos para la determinación de la actividad antioxidante.

El oxígeno molecular (O_2) desempeña un papel fundamental en la vida de un organismo aerobio, ya que está implicado como aceptor final de electrones. Pero a su vez puede llegar a causar toxicidad por su naturaleza química, debido a que de él se derivan radicales libres, los cuales tienen reacciones con los sistemas celulares, que ocasionan daños en sus estructuras, además este tipo de radicales provocan daños en la composición de los alimentos.

Así, una alternativa para evitar el daño causado por los radicales libres es la adición de antioxidantes en los alimentos elaborados conservando así las características organolépticas, adicional a esto se pueden tener efectos positivos sobre la salud. Por estos hechos es importante el estudio de la actividad antioxidante, para lo cual existen los siguientes métodos:

• Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se emplean varios métodos espectrofotométricos, entre los cuales se destaca el desarrollado por Folín y Ciocalteau, este se fundamenta en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfotungstico y fosfomolibdíco en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules detungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se determina a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de fruta (Folin *et al.*, 1927).

• Método del DPPH

Brand-Williams (Brand *et al.*, 1995) y colaboradores evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH•) en una solución metanólica. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH• absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales. El modelo que explica la actividad de un compuesto como antirradical se ejemplifica con la siguiente ecuación (figura 13)



Figura 13. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante

Fuente. Alam et al., 2012

Donde DPPH, es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, como es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado (ArO•) puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A). Entre las ventajas de usar este método se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH (Einbond *et al.*, 2004).

Cuando el radical libre reacciona con el compuesto antioxidante, este último le dona un protón y produce una decoloración que puede medirse a través del tiempo por medio de la disminución de la absorbancia de la mezcla a 515nm (Okezie, 2002). La decoloración de la mezcla se debe a la aparición de la forma reducida del radical, cambiándolo así, de un color violeta a un amarillo con el transcurso del tiempo.

• *Método TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox)*

Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS (ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) (figura 14) presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical ABTS++ una vez generado químicamente presenta nuevas características con máximos de absorción en las longitudes de onda de 414, 645, 734 y 815 nm, pero se mide a una longitud de onda λ 734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. El radical ABTS++ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de las betalaínas, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734nm), lo que reduce posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria (Re *et al.*, 1999).



Figura 14. Estructura del radical ABTS

Fuente. Este estudio

3. METODOLOGÍA

3.1 Equipos

Los equipos que se emplearon para ejecutar este trabajo de investigación son:

3.1.1 Equipos

- Columna cromatográfica de 30 cm de largo por 2 cm de diámetro.
- Columna cromatográfica XTerra MS C18 Column 5µm 4.6x250mm
- Espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck. 300
- Espectrómetro de Masas Shimadzu LC 2010.
- HPLC Waters 1525, con detector de arreglo de fotodiodos PDA Waters 2998.
- Micropipetas 50 100 μm y 100-1000 μm
- Refractómetro ATAGO # RS 500
- Rotaevaporador Heidolph, LABOROTA 4000-efficient..
- Vortex Mixer 120v labnet.

3.2. Muestreo, clasificación y características del fruto

3.2.1 Clasificación taxonómica

La identificación taxonómica de un cladodio con frutos se realizó en el Herbario de la Universidad de Nariño.

3.2.2 Características del fruto

Se determinó las características físicas del fruto como: color, forma, textura, tamaño y se determinó el pH del extracto liquido acuoso del fruto, tomando 3 medidas con la ayuda de un pH-metro portátil marca HACH. Los sólidos totales se determinaron haciendo caer gotas de jugo de 3 frutos sobre la pantalla de un refractómetro marca ATAGO RS # 500.

La recolección del fruto de *opuntia dillenii* se realizó en el municipio de Chachagüí, que está localizado en el Departamento de Nariño a 29 Km de la ciudad de San Juan de Pasto a 1950 msnm. De acuerdo a su consistencia y color visual (color Fucsia) se recolectaron 2 Kg de fruto.

3.3. Obtención del extracto crudo

Inicialmente los frutos se lavaron con agua y se eliminaron las espinas y finalmente mediante un cuarteo se seleccionaron para el estudio 1205 g de fruta fresca;

La extracción de los pigmentos tipo betalaínas se realizó por medio de maceración química, colocando 1205g del fruto con cascara en trozos pequeños en contacto con 1200 ml del solvente que en este caso es el agua (Fernández *et al.*, 2012) a temperatura ambiente realizando 3 extracciones cada 3 horas, cambiando el solvente, hasta decoloración del fruto; terminado el procedimiento se recolectaron 3600ml de extracto líquido, posteriormente se realizó una filtración con el fin de eliminar residuos de partículas (semillas) que pueden interferir en los procedimientos posteriores (figura 15).



Figura 15. Maceración química

Fuente. Este estudio

El extracto fue recolectado en envases plásticos y se llevó a refrigeración (4°C). Finalmente el solvente se eliminó colocando porciones de 20ml en cajas Petri sobre planchas a 40°C (figura 16).



Figura 16. Extracto crudo (EC)

Fuente. Este estudio

3.3.1 Ensayos preliminares

Una vez aislado el extracto crudo de pigmentos se preparó una solución acuosa al 1.02% p/v y se sometió a diferentes condiciones a pH (3, 5, 7). Otro ensayo para determinar la presencia de betalaínas fue tratar una solución acuosa 1.02% p/v con gotas de KOH 2M.

3.4 Determinación del contenido de betalaínas

El contenido de betalaínas del extracto crudo se determinó por el método espectrofotométrico (Stintzing *et al.*, 2004). 0.9501g del extracto se disolvieron en 50ml de agua tipo II, a partir de ésta se prepararon diluciones comprobando que la absorbancia entre en el rango óptimo para el análisis (< 1; > 0.8). Finalmente las proporciones extracto: agua fueron 1:2 y 1.1 para el análisis en el contenido de betacianinas y betaxantinas respectivamente.

Para la determinación del contenido en betaxantinas y betacianinas se utilizó la siguiente ecuación $B(mg/g) = (AxFDxPMxV)/(\varepsilon xmxL)$, dónde *B* es el contenido de betacianinas o

betaxantinas, en mg/g, *A* es la absorbancia a 538 nm para betacianinas y 480 nm para betaxantinas, *FD* es el factor de dilución, *PM* es el peso molecular (Betanina = 550 g/mol e Indicaxantina = 308 g/mol), *V* es el volumen del extracto, ε es el coeficiente de extinción molar (Betanina = 60000 L/ mol.cm, e Indicaxantina = 48000 L/mol.cm) y *L* es la longitud de la celda (1 cm).

3.5 Separación del contenido del pigmento crudo por cromatografía de capa fina

Para determinar el contenido preliminar de los pigmentos tipo betalaína se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina analítica de acuerdo al método propuesto por Santos *et al.*, 2007; durante el desarrollo de la técnica se tuvo especial cuidado en cubrir la cámara cromatografía con papel aluminio para proteger las placas de la luz, lo cual podría causar degradación del pigmento. Para la separación de los pigmentos se utilizó como fase estacionaria una placa celulosa microcristalina (TLC cellulose F) 4.8 X 1.7 cm y para elegir la fase móvil se realizaron ensayos con metanol: ácido fórmico en diferentes proporciones (5:5), (6:4), (7:3), (9:1), con el fin de encontrar el mejor solvente de elución.

3.6. Eliminación de hidrocoloides y proteínas

La eliminación de hidrocoloides y proteínas se realizó utilizando etanol al 96% en una proporción 2:1 etanol: extracto crudo a temperatura ambiente (Stintzing *et al.*, 2002). 10g de extracto crudo seco se disolvieron en 10ml de agua, posteriormente se adicionó 20 ml de etanol al 96% se agitó y se dejó reposar 20 minutos; los mucilagos se separaron de la fase acuosa por filtración a presión reducida con papel filtro; el etanol se eliminó por rotavaporación. Finalmente se llevó el extracto purificado (EP) a sequedad, para uso posterior.

3.7 Separación betaxantinas y betacianinas

Se utilizó una columna cromatográfica de 28 x 2 cm empacada con C_{18} marca SIGMA. La activación de la resina se hizo con tres volúmenes de metanol y posteriormente 3 volúmenes de agua acidificada con ácido fórmico (pH 3) (Stintzing *et al.*, 2002). 0.3g de extracto purificado se disolvieron en 1ml de agua tipo II, y se cargó la solución en la columna; el fraccionamiento de las dos clases de pigmentos se hizo con agua acidificada (pH 3) para obtener las betaxantinas (BX) y posteriormente las betacininas (BC) se eluyeron con una mezcla de metanol:agua acidificada pH3 (95:5).

3.8 Análisis de betalaínas por HPLC-analítica

Las fracciones rojas y amarillas que fueron separadas con C_{18} se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en modo analítico, según la metodología de Stintzing *et al.*, 2002 con algunas modificaciones; el equipo utilizado fue un Waters con detector de arreglo de fotodiodos y equipado con una columna cromatográfica XTerra MS C_{18} 250mm 5µm 4.6x250mm. Para el análisis se utilizó dos fases móviles compuestas de agua, acetonitrilo y ácido fórmico en la siguiente composición **A**: Ácido fórmico al 2% **B**: Acetonitrilo:Agua 80:20 (agua: acido fórmico 90:10), posteriormente cada fase se filtró y desgasificó . La muestra se disolvió en 3ml de la fase móvil A y se filtró en un cartucho con un diámetro de poro de 0,45 µm. El análisis se llevó a cabo en modo gradiente como lo muestra la tabla 2:

Tabla 2.

Tiempo	%A	%B	Duración
(minutos)			
0	93	7	35 min
35	80	20	5 min
40	93	7	Elución total

Programa de gradiente de elución

Fuente. Este estudio

3.9 Identificación de betalaínas mayoritarias

El extracto obtenido de la maceración química, las fracciones amarillas y rojas separadas por columna empaquetada con C_{18} se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

El análisis se realizó sobre tres fracciones: el extracto crudo (EC) y las fracciones roja (BC) y amarilla (BX) purificadas mediante cromatografía en columna (C_{18}). Previo al análisis las muestras se disolvieron en la fase móvil A y se filtraron a través de filtros de membrana 0,45 µm y posteriormente se inyectaron al cromatógrafo utilizando para la separación una Columna Kinetex Phenomenex C_{18} (150 x 2,1 mm i.d.; 2,6 µm). La interfase utilizada para el acople con el espectrómetro de masas fue ESI en modo de ionización positiva y negativa y el analizador fue de tipo cuadrupolo (equipo LC 2010). Las condiciones del análisis se especifican en la tabla 3.

Tabla 3.

Condiciones de análisis en HPLC-ESI-MS.

Fase móvil	(A) H ₂ O: HCOOH (99:1, v/v)		
	(B) ACN:H ₂ O: HCOOH (80:19:1, v/v/v)		
Gradiente:	3 - 20% B (0 - 35 min)		
	20 – 100 % B (35 – 40 min)		
Flujo	0,4 mL/min		
Inyección	5 μL		
Detección	280, 410, 480 y 538 nm		
Temperatura del CDL	250 °C		
Temperatura del Heat block	250 °C		
Voltaje del detector	1,80 Kv		
Rango	50 – 1000 m/z		
Flujo N ₂	1,0 L/min		

Fuente: este estudio

3.10 Determinación de fenoles totales

El contenido fenólico para los extractos crudo (EC), purificado (EP) y las fracciones rojas (BC) y amarillas (BX) se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu, que contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Cuando los fenoles entran en contacto con esta mezcla y se reducen generando los correspondientes óxidos (W_8O_{23} , Mo_8O_{23}) (figura 17) lo cual genera una coloración azul en la solución, que absorben a 765nm, la concentración de compuestos fenólicos es proporcional a la intensidad de la luz absorbida a esa longitud de onda (Aravena *et al., 1999*).

 Na_2CO_3 $2H_3PW_{12}O_{40} + 2HPMo_{12}O_{40} + 12 ArOH \longrightarrow 3W_8O_{23} + 3Mo_8O + 4H_3PO_3 + 12 ArO + 6H_2O$

Figura 17: Reactivo de Folin Ciocalteu en reacción con compuestos fenólicos

Fuente. Este estudio

Para llevar a cabo el procedimiento se emplearon 0,1ml de muestra a analizar, 0.5ml de reactivo de Folin-Ciocalteau y 1,5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio Na₂CO₃ al 20 % p/v, y se llevó a un volumen final de 10ml con agua tipo II. Después de 2 horas se tomó lectura de la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. También se preparó una curva de calibración de ácido gálico con soluciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150, 250 ppm, con el fin de expresar los resultados en mg de ácido gálico/ 100 g de peso fresco (Kuskoski *et al.*, 2003).

3.11 Determinación de la capacidad antioxidante:

3.11.1 Método de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC)

Para evaluar la actividad antioxidante se utilizó la metodología desarrollada por Re *et al.*, (1999), ya que es un método validado por su estabilidad y reproducibilidad; además siendo uno de los procedimientos más adecuados para el caso de muestras con color, como lo son los extractos que se estudian en este trabajo.

Con este método se analizó la actividad antioxidante de soluciones de extractos crudos con 82 mg (EC) y 81mg de purificados (EP), además las fracciones rojas con 15 mg (BC) y 90.30mg de fracción amarilla (BX).

- Formación del catión radical ABTS^{+°}: La solución Stock se preparó disolviendo 193 mg de ABTS y 33 mg de persulfato potásico en 10 ml agua tipo II. Esta solución se dejó reposar durante 24 horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Para llevar a cabo el análisis con el radical formado se realizó una dilución en 100ml metanol HPLC adicionando solución madre del catión radical ABTS^{+°} hasta llegar a un valor de absorbancia menor a 1, a una longitud de onda de máxima absorción de 734 nm.
- Recta de calibrado con patrones de Trolox. Se prepararon soluciones de Trolox a las siguientes concentraciones: 0,515, 1,0312, 1,547, 2,062, 2,58 mM.
- Medidas de la capacidad antioxidante: Para realizar la reacción se adicionó 30 μL de la solución a estudiar a 3 mL de la solución de ABTS⁺, Se agitó en vortex durante 1 minuto, se dejó reposar 6 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm por triplicado en el espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck. Las soluciones de Trolox se analizaron siguiendo el mismo procedimiento; para comprobar la funcionalidad del método se utilizó ácido ascórbico, como antioxidante. Finalmente los resultados se expresaron en μmol de Trolox/g de fruta.

Por medio de la relación matemática entre las absorbancias del catión radical en ausencia y presencia del antioxidante, se calculó el porcentaje de inhibición:

% de inhibición = Δ Abs/ Abs_{max} x 100

 Δ *Abs*: diferencia entre la absorbancia del catión radical y la absorbancia del catión radical con el antioxidante a 734 nm.

Abs_{max}: Absorbancia máxima del catión radical a 734 nm.

3.11.2 Método DPPH [2,2-difenil-1-picrilhidrazilo]

Se llevó a cabo con la metodología de Sánchez y colaboradores (Sánchez et al., 1998) con algunas modificaciones: Para realizar este análisis se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Pharo, tomando medidas de absorbancia a 515 nm. Se construyó una recta de calibrado preparando una solución madre 0,063 mM de DPPH y a partir de esta se prepararon diluciones a 0,0025 mM; 0,005 mM; 0,0075 mM; 0,01 mM y 0,02 mM,0,02mM, 0,03mM, 0,04mM, 0.05mM; estas diluciones se prepararon con el fin de determinar concentración de DPPH• remanente después de transcurrida la reacción. Para medir la eficiencia antiradical de los extractos de interés se tomaron 1950µL de solución de DPPH• 0,063 mM y se midió su absorbancia a 515 nm, posteriormente se adicionó 50µL de la solución a analizar y se registró la disminución de absorbancia hasta completar 90 minutos donde se observó la estabilización de las absorbancias de cada solución. Los tiempos finales de reacción dependen de la naturaleza de las muestras. Como patrón de referencia se analizó ácido gálico, con la misma metodología. Para evaluar la actividad frente al radical DPPH• se calculó el EC₅₀ un parámetro que representa la cantidad necesaria de antioxidante para disminuir la concentración de DPPH en un 50%. (Cai *et al.*, 2003); expresando los resultados en g de antioxidante/ kg de DPPH (EC₅₀)

3.12 Estabilidad del pigmento crudo

Para estudiar la cinética de degradación del pigmentos se prepararon soluciones acuosas del extracto crudo al 1.02% p/v a pH 3, 5, 7. Posteriormente se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-Vis Pharo 300, (t =0) y se almacenaron las muestras en presencia de luz tipo fluorescente compacta con intensidad lumínica de 0.09mW y en ausencia de luz a 18°C durante 35 días (en presencia de aire); manteniendo constantes estas condiciones se midieron las

absorbancias a 1, 5, 10, 20 y 35 días con el fin de obtener los parámetros cinéticos de degradación, como tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y constante cinética de degradación (k).

Para determinar el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) se utilizó la siguiente ecuación:

$$t_{1/2} = ln \ 0.5 / k$$

La constante cinética de degradación (k) se obtuvo de la ecuación de la gráfica que relacionó la expresión $\ln A_t / \ln A_o$ Vrs el tiempo, a pH 3, 5, 7 en ausencia y presencia de luz.

Los aspectos que se evaluaron determinaron las condiciones de almacenamiento para la conservación del pigmento en solución. En adición a los parámetros cinéticos, se determinó el contenido de betanina según la metodología descrita en el apartado 3.4, a cero y 35 días respectivamente para encontrar el porcentaje de betanina degradada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Clasificación del fruto

4.1.1 Clasificación del fruto

De acuerdo a los análisis desarrollados por el herbario de la Universidad de Nariño a un cladodio de la planta recolectado en el municipio de Chachagüi, se clasificó como *Opuntia dillenii* (Ker Gawl.) Haw, figura 16 con registro ID No. 13691. Herbario Universidad de Nariño).



Figura 18. Fruto Opuntia dillenii (Ker Gawl.) Haw.

Fuente. Este estudio

4.1.2 Características del fruto

Tabla 4.

Características iniciales del fruto de opuntia (Opuntia dillenii).

CARACTERISCA	DESCRIPCION		
Color	Fruto maduro presenta una cáscara		
Color	fucsia y pulpa de igual color		
Forma	Elipsoide de 3 y 5 cm de largo y 2,5 a 3		
гоппа	de ancho		
Textura	Corteza firme y pulpa blanda.		
рН	5.25 ± 0.03		
Solidos totales	11.33 ± 1.15		

Fuente. Este estudio

4.2 Obtención del extracto crudo

En la metodología se mencionó el procedimiento para obtención del extracto crudo por maceración química, donde se procesó fruto entero tanto la cascara como la pulpa, así obteniendo extracto crudo (EC) seco con un peso final de 170.02g y después de la eliminación de hidrocoloides y proteínas se obtuvo 130.14 g de extracto purificado (EP), lo que corresponden al 14.11% y 10.8% respectivamente, del peso total del fruto procesado.

4.3 Ensayos preliminares.

De acuerdo a los ensayos descritos en la metodología se determinó que el cambio de color fucsia a amarillo (figura 19) evidenció la presencia de los pigmentos tipo betalaínas que son los que ocasionan la coloración del fruto *Opuntia dillenii* y no las antocianinas.



Figura 19. Comportamiento del extracto crudo acuoso frente a variaciones de pH.

Fuente. Este estudio

Cuando la solución de pigmentos está a pH alcalino (9-11) ocurre una ruptura de enlace aldimina obteniendo dos compuestos, uno de ácido betalámico (amarillo) y otro de ciclo Dopa 5-O-β-glucosido (incoloro) (figura 20) (Herbach *et al*., 2004, Stintzing *et al.*, 2004)



Figura 20. Esquema del cambio estructural de las betacianinas en medio básico (pH 9-11)

Fuente. Este estudio

También para discriminar la presencia de antocianinas se tomó el espectro en la región UV-Vis del extracto crudo acuoso. El perfil observado en la figura 21 muestra dos señales características, la primera a 280 nm en la región UV, y la segunda a 535 nm en la región visible, máximos de absorbancia característicos de las betalaínas lo que confirma la presencia de las mismas. Piattelli (1976) encontró que el pico de absorbancia aproximadamente a 280 nm al igual que la absorción en 535nm son características espectrales de las betacianinas glicosiladas, lo cual se confirmó en la determinación del contenido de betacianinas. Otra característica que no se observa es un hombro característico a 470 nm correspondiente a la absorción máxima de las betaxantinas, esto se explica debido a que éstas pueden encontrarse en menor concentración.



Figura 21. Espectro UV-Vis del extracto crudo del fruto de Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio

4.4 Determinación de contenido en betalaínas

El contenido de betacianinas y betaxantinas se cuantificó mediante la metodología descrita anteriormente (apartado 3,4), registrando la absorbancia de los extractos de betacianinas a 538nm y el de las betaxantinas a 480 nm. La tabla 5 muestra las absorbancias registradas.

Tabla 5.

Absorbancias medida	s a las	longitudes	de onda	de	máxima	absorción
---------------------	---------	------------	---------	----	--------	-----------

Réplica	ABS λ_{538}	ABS λ_{480}
1	0.844	0.822
2	0.856	0.817
3	0.836	0.826
PROMEDIO	0.845	0.822
DS	0.01	0.005

Fuente. Este estudio

Tabla 6.

_	Muestra	Betacianinas ^a	Betaxantinas ^b	Betalainas total
	EC*	16.63 ± 0.196	7.55±0.035	24.18±0.19

Contenido de betacianinas y betaxantinas para el extracto crudo en 100g de fruto fresco.

^amg de betanina /100g fruto fresco, ^b mg de Indicaxantina/ 100 g de fruto fresco, ^c betaninas +

Indicaxantina. ^{*}Datos con \pm DS de tres réplicas.

Fuente. Este estudio

En los resultados de la tabla 6 se observa que el extracto crudo está más enriquecido en betacianinas (pigmentos de color rojo) que en betaxantinas (pigmentos de color amarillo), lo que está en concordancia con el color de la pulpa y la cáscara del fruto. Al comparar resultados obtenidos se observa que los valores obtenidos son bajos en comparación con las tunas púrpuras (*Opuntia ficus-indica*) cultivadas en Chile, con un contenido de betacianinas en el fruto entero (con cáscara) se encuentra entre 16,6 y 62,4 mg de betanina/100g de fruto fresco (Sepúlveda *et al.*, 2003), sin embargo la diferencia entre estos valores se debe a variaciones metodológicas en la obtención del extracto, de igual forma el valor se puede ver afectado por las condiciones en el manejo del cultivo. En otros estudios sobre la *Opuntia ficus indica* se reportan datos sobre el contenido de betanina, encontrándose valores que van desde 14 a 19 mg/100g (Fernández *et al.*, 2002; Castellar *et al.*, 2003), estos valores si son comparables con los encontrados en ésta investigación, ya que las dos especies tienen igual color tanto de la cascara como de la pulpa, razón por la cual pueden relacionarse en este sentido.

En la tabla 7 y en la figura 22 se presenta el contenido de betacianinas del fruto en estudio en comparación con el contenido de betacianinas en otros tipos de cactáceas expresado

en mg/ Kg de extracto seco. Se realizó la conversión de unidades de los resultados obtenidos en el presente estudio con el fin hacer la comparación con otras especies reportadas.

Tabla 7.

Comparación en el contenido de betacianinas entre diferentes especies o variedades.

Especie/variedad	Betacianinas(mg/kg extracto seco)	Bibliografía	
A. cruentus	1340	Cai <i>et al., 1998</i>	
Opuntia dillenii	1180	Fuente: esta	
	1100	investigación	
Betabel (Ruby Queen)	1180	Lopez, 1985	
A. hybridusa	820	Cai <i>et al., 1998</i>	
A. lividus	460	Cai <i>et al., 1998</i>	

Fuente. Este estudio



Figura 22. Comparación de los contenidos de betacianinas en diferentes plantas del orden

Centrospermae

Fuente. Este estudio

El fruto de *Opuntia dillenii* tiene un contenido de betalaínas alto en comparación con las especies de *A. hybridusa, A. lividus,* e igual contenido que betabel (*Ruby Queen*). Cabe mencionar que los valores reportados en bibliografía son obtenidos con algunas modificaciones en las metodologías de extracción, que pueden afectar el resultado final, por ejemplo la extracción acuosa de cada especie en comparación va a ser diferente, debido a que la composición de cada matriz vegetal siempre será única.

4.5 Identificación de betalaínas

4.5.1 Separación del contenido de betalaínas por cromatografía de capa fina

Para encontrar el mejor solvente de elución, y con el fin de obtener el mejor sistema de separación se realizaron ensayos con metanol acidificado con ácido fórmico en las proporciones que se muestran en la figura 23. Se encontró que la mejor separación se obtuvo en una mezcla de metanol: ácido fórmico en una proporción (9:1).

Los resultados de cromatografía en capa fina se muestran en la figura 23. Por la naturaleza coloreada de los compuestos no fue necesario usar un indicador para la visualización de los pigmentos separados. Se observó claramente la presencia de tres señales localizadas a diferentes Rf en la placa: una de color rojo en la parte inferior (1), una intermedia de color amarillo (2) y en la parte superior otra de color marron (3), señales que se asocian a la presencia betacianinas, betaxantinas y de otros componentes como hidrocoloides respectivamente los cuales presentaron los siguientes factores de retención 0.17, 0.3 y 0.55.



Figura 23. Ensayos de los sistemas de separación en TLC para el extracto crudo del fruto de *Opuntia dillenii*.

Fuente. Este estudio

4.6 Separación betaxantinas y betacianinas

"En los últimos años la metodología aplicada para la purificación de antocianinas, compuestos fenólicos y betalaínas mediante soportes poliméricos tipo C_{18} " (Stintzing *et al.*, 2002). La separación de los pigmentos se logró mediante el uso de las características de retención de las betalaínas y las betaxantinas, las que son dependientes del pH; por lo tanto para lograr el fraccionamiento fue necesario utilizar como eluyente agua que contenía ácido fórmico (pH 3) para separar la fracción amarilla de la roja; y la fracción más retenida por la columna se eluyó con metanol: agua acidificada (95:5). (Ver figura 24). Con la metodología utilizada se logró hacer la separación de los compuestos amarillos de los rojos, sin embargo no logró hacer el lavado de azúcares como reporta Stintzing *et al.*, 2002, estos quedaron en la fracción amarilla. Finalmente las dos clases de compuestos se llevaron a sequedad para su posterior análisis por HPLC-DAD.


Figura 24. Proceso de fraccionamiento de la fracción amarilla

Fuente. Este estudio

4.7 Determinación de fenoles totales

Para cuantificar los fenoles totales se construyó una recta de calibración (figura 25) utilizando como patrón ácido gálico en un intervalo de concentraciones de 5- 250 ppm (tabla 8). Los análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 8.

Concentración de ácido gálico ^a	Absorbancia ^b
5	0.014 ± 0.0025
10	$0.018{\pm}~0.001$
25	0.042 ± 0.001
50	0.072 ± 0.002
100	0.132 ± 0.0006
150	0.192 ± 0.001
250	0.304± 0.002

Resultados obtenidos del método Folin Ciocalteau con ácido gálico.

^a mg/ L ^b DS de tres réplicas.

Fuente. Este estudio



Figura 25. Recta de calibrado de ácido gálico.

Fuente. Este estudio

Por medio de la ecuación de la recta se obtuvo el contenido de fenoles totales de los extractos evaluados: crudo (EC), extracto purificado (EP), y las fracciones de rojas (BC) y amarillas (BX). El coeficiente de correlación cercano a uno indica una buena correlación de los datos obtenidos. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/ 100 gramos de fruta fresca

(tabla 8). Estos datos evidencian que los extractos crudos y purificados presentan mayor contenido en fenoles que las fracciones roja y amarilla (la figura 26), debido a que éstas últimas pasaron por un proceso de separación por medio de un soporte polimérico, el cual pudo retener este tipo de compuestos. Sin embargo hay otro aspecto importante por considerar debido a que es posible que azúcares, aminoácidos y el ácido ascórbico puedan ser reducidos por el reactivo de Folin-Ciocalteau (Robbins, 2003, Shawannecke, 2009), ya que está es una técnica que permite reducir compuestos orgánicos que presenten anillos aromáticos hidroxilados; por lo tanto el mayor contenido de fenoles en EC y EP puede estar relacionado con la presencia de este tipo de compuestos en las muestras.

Tabla 9.

Contenido f	fenólico	para EC,	EP,	<i>BC</i> ,	BX.
-------------	----------	----------	-----	-------------	-----

Muestra	FENOLES TOTALES
EC	311.61±12.29
EP	187.25±8.64
BC	49.82±0.949
BX	12.16±0.06
^a ma da ásida	a cálica / 100 a da franta

mg de ácido gálico/ 100g de fruto



Figura 26. Comparación del contenido fenólico de EC, EP, BC, BX obtenidos del fruto de

Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio

El contenido fenólico del extracto crudo de *Opuntia dillenii* comparado con el de otras especies evaluadas en diferentes trabajos (figura 27 y tabla 10), muestran que el fruto en estudio tiene un mayor contenido de compuestos que son reducidos por el reactivo de Folin; esto es interesante, debido a que esto se ve reflejado en la actividad antioxidante en tal forma que los compuestos fenólicos son los que contribuyen a dicha actividad (Moussa *et al.*, 2011). Es importante destacar que en este trabajo la evaluación del contenido fenólico se realizó al extracto crudo aislado de la totalidad del fruto (pulpa y cáscara), razón por la cual los valores son mucho mayores que los reportados en pulpa, en consonancia con este hallazgo, se han encontrado reportes que en la cáscara se encuentra mayor cantidad de fenoles que en la pulpa (Cantwell, 1995). De otro lado, en diferentes estudios se han encontrado en forma libre y conjugada diferentes ácidos fenólicos solubles enlazados a azúcares (García *et al., 2012*). En Cactáceas como el garambullo se ha reportado la presencia de los ácidos gálico y caféico (Guzmán *et al.,*

2010), mientras que en betabel se menciona un éster del ácido ferúlico (Kujala *et al.*, 2000), según estos reportes y los resultados encontrados se puede concluir que en el fruto de *Opuntia dillenii* existen mayor contenido de fenoles solubles en agua, cuya extracción favoreció la obtención de dichos compuestos.

Tabla 10.

Comparación del contenido fenólico en mg ácido gálico/100g fruta de diferentes cactáceas.

Espacia	mg ácido gálico/100g	Dibliggrafía
Especie	fruta	Bioliografia
(O. ficus-indica)	52	Repo <i>et a</i> l(2008)
Tuna cv. Reyna	72.3	Aguayo et al., 2008
O.f indica (L.)Mill.	89.2	Albano et al ., 2015
O. dillenii	311.61	Fuente : esta investigación

Fuente. Este estudio



Figura 27. Comparación del contenido fenólico de diferentes cactáceas.

4.8 Identificación de los componentes de los extractos por espectrometría de masas (HPLC-DAD-ESI-MS)

El extracto crudo y las fracciones rojas y amarillas se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con ionización por Electrospray (HPLC-ESI-MS) realizada en la Universidad Nacional de Colombia; ya que es una técnica de caracterización apropiada para la identificación de compuestos termolábiles altamente polares y no volátiles, como los pigmentos tipo betalaínas.

En las figura 28, 29, 30 se presentan los cromatogramas HPLC-DAD-ESI-MS de los extractos EC, BC y BX registrados a diferentes longitudes de onda.

a) λ :538 nm





dillenii detectados a longitudes de onda de a) 538nm, b)480nm, c)280nm

λ :538 nm







λ:280 nm





dillenii a 538, 480, 280nm respectivamente .

λ :480 nm







Figura 30. Cromatogramas HPLC-DAD-ESI-MS de la fracción amarilla (BX) de Opuntia

dillenii a 480, 280nm.

Fuente. Este estudio

En los diferentes cromatogramas se puede observar que en todos los extractos existen compuestos que absorben a 280 nm pero que no presentan la absorción característica a 538 y 480 nm correspondiente a las betacianinas y betaxantinas, respectivamente. Es claro además que las señales debidas a las betaxantinas se intensifican cuando los cromatogramas se miden a 480 nm.

De otro lado, al registrar los espectros UV-Vis *on line* (HPLC-DAD), se concluye que debido al máximo de absorción alrededor de 538 nm (Cai et al.,2005) (figura 31), los pigmentos mayoritarios en el extracto crudo (EC) del fruto de *Opuntia dillenii* son las betacianinas, lo cual se confirmó con la técnica de espectrometría de masas.



Figura 31. Espectros UV-Vis 538nm de las señales de mayor intensidad en el extracto crudo del fruto de Opuntia dillenii

Fuente. Este estudio

4.8.1 Identificación de los compuestos del perfil cromatográfico a 538 nm

Con el propósito de profundizar en la identificación de los diferentes compuestos en los extractos EC, BC y BX se presenta a continuación el análisis de los espectros de masas (HPLC-ESI/MS):

En la figura 32 se observa el cromatograma de masas para la fracción roja (BC) purificada mediante cromatografía en columna.



Figura 32. Perfil cromatográfico HPLC-ESI/MS de la fracción roja del fruto Opuntia

dillenii

El análisis por espectrometría de masas mostró que las señales 1 y 3 no solo tienen la misma masa sino también similares características espectrales, en la figura 33 se muestra el espectro de masas correspondiente a la señal 1.



Figura 33. Espectro de masas del ion molecular m/z 551.15 de la betanina o isobetanina en

Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio

Se puede establecer que de acuerdo a la relación m/z de 551.15 u (en modo de ionización positiva) correspondiente al ión molecular $[M+H]^+$. Los picos se identificaron como betanina-5-O- β -glucósido (betanina) e isobetanina-5-O- β -glucósido (isobetanina) (15.4 y a 17.08 respectivamente).Los espectros de absorción visible de los picos 1 y 3 mostraron similares λ_{max} , sin embargo el tiempo de retención de estos dos compuestos sobre la columna es diferente, la isobetanina presenta un tiempo de retención más alto que la betanina. El espectro de masas también se observa un ión $[M+H-44]^+$ con m/z 507.1 característico de la descarboxilación (-COO) en la posición 17 de la molécula (Stintzing *et al.*, 2002 Kugler *et al.*, 2007). Para poder observar con mayor claridad otros iones fragmento es necesario un análisis en modo tándem. En la figura 34 se presentan las estructuras correspondientes para estos dos compuestos.

También en los espectros UV-Vis de este compuesto se determinó que la glicosilación se encuentra en posición 5-O y no en 6-O, debido a que si la sustitución está en posición 6 se

observa el efecto batocrómico en el máximo de absorbancia de estos compuestos, efecto que no ocurre, con lo que se discrimina la presencia de estructura de la gomprenina (m/z 551).



Figura 34. Estructura de la betanina e isobetanina m/z 551.

Fuente. Este estudio

Los espectros de masas para el pico 2 y 5(11.9 a 20,4) del cromatograma masas muestra un ión molecular [M-H]⁻ con una m/z de 505.10 u (figura 35), que según la literatura corresponde a la forma descarboxilada de la isobetanina [549-44]⁻, que podría corresponder a la 17descarboxibetanina. (Nemzer *et al.*, 2011; Strack *et al.*, 2003). Diferentes publicaciones científicas mencionan que este tipo de compuestos presentan un efecto hipsocrómico (33nm desplazado al azul) en su máximo de absorbancia de las betacianinas, sugiriendo la presencia de una estructura 17- descarboxilada (Kugler *et al.*, 2007; Strack *et al.*, 2003). Este compuesto también se ha encontrado en la remolacha roja (Stintzing *et al.*, 2006). En la figura 36 se presenta la estructura química para este compuesto.



Figura 35. Espectro de masas del ion molecular m/z 505.10 de la descarboxibetanina o

descaboxisobetanina en Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 36. Estructura de 17- descarboxibetanina.

4.8.2 Identificación de los compuestos del perfil cromatográfico a 280 nm de la fracción roja



BC obtenida de la Opuntia dillenii.



la Opuntia dillenii presenta las señales de 8 a 15.

Fuente. Este estudio



Figura 38. Perfil cromatográfico HPLC-DAD-ESI-MS del EC de la Opuntia dillenii

Fuente. Este estudio

En el cromatograma del extracto crudo a 280nm se identificaron los compuestos minoritarios, los cuales tienen mayor intensidad a esta longitud de onda.



Figura 39. Espectro de masas del ion molecular m/z 381.05 de triptófano-betaxantina en

Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio

El espectro de masas (figura 39) en modo positivo del pico 8 (2.1min) del cromatograma a 280 nm de la fracción amarilla muestra, aunque en baja intensidad, un ion molecular [M+H]⁺ con m/z 398u que está en concordancia con la estructura de triptófano-betaxantina (figura 40), este ión experimenta una pérdida de 18u como se observa por la presencia de un ion fragmento 381.05.



Figura 40. Estructura de la Triptofano-betaxantina

En el espectro de la figura 41 correspondiente al pico 9 (4.7min) se muestra un ion molecular $[M+H]^+$ de m/z 493 con una estructura posible de isoramnetina-3-glucoronido (figura 42), compuesto que también se ha encontrado en otros frutos del cactus según lo reportado realizada por Correa *et al.*, 2010.



Figura 41. Espectro de masas del ion molecular m/z 493.05 de la isoramnetina-3-

glucoronido en Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 42. Estructura de isoramnetina-3-glucoronido.

Fuente. Este estudio

El pico 10 (7min) analizado por espectrometría de masas (en modo positivo) figura 43, presenta un ion molecular [M+H]⁺ de m/z 377.07, señal con gran intensidad; se propone una estructura tentativa que corresponde al compuesto tirosina-betaxantina (figura 44) también conocida como portulacaxantina II la cual está reportada en el trabajo de Piattelli y colaboradores publicado en el año 1985).



Figura 43. Espectro de masas del ion molecular m/z 377.07 de la portulacaxantina II en

Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 44. Estructura de la tirosina-betaxantina (portulacaxantinaII)

Fuente. Este estudio

En la figura 45 se observa el espectro de masas (en modo positivo) correspondiente a la señal 12(21.9min) del cromatógrama a 280nm, con m/z 463,10 se sugiere una estructura posible correspondiente a quercetina-3-O-glucosido (figura 46), este compuesto también fue encontrado por Correa *et al.*, 2010, como uno de los polifenoles más hallados en el jugo del fruto del cactus y con el espectro de masas obtenido se evidencia una señal muy intensa de m/z 463.10 con lo cual se comprueba la presencia de este tipo de compuesto en el fruto de *Opuntia dillenii*.



Figura 45. Espectro de masas para el ion molecular m/z 463 de la quercetina-3-O-glucosido

en la Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 46. Estructura de quercetina-3-O-glucosido.

Fuente. Este estudio

El espectro de masas (figura 47) de los picos 13 y 14 que se observan en los cromatógramas a 280nm, puede tratarse de compuestos isómeros con tiempos de retención muy cercanos (22.9 y 23.2min), de m/z 755 presentando un ión fragmento a m/z 463 debido a la pérdida de 204u correspondiente al sinapiol más 88u de dos descarboxilaciones [M-H-292]⁻, lo que sugiere una posible estructura de 6'-O-sinapiol-6-O-gonfrenina y 6'-O-sinapiol-6-O-isogonfrenina(figura 48), fragmentación característica de esta estructura, como también lo reportan Kugler *et al.*, 2007; Wybraniec *et al.*, 2010.



Figura 47. Espectro de masas del ion molecular con m/z 755 de la 6'-O-sinapiol-6-O-

gonfrenina o 6'-O-sinapiol-6-O-isogonfrenina en la Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 48. Estructura de a) 6'-O-sinapiol-6-O-gonfrenina y b) 6'-O-sinapiol-6-O-

isogonfrenina

Fuente. Este estudio

El espectro de masas para el pico 15 (29.9min) (figura 49), en modo de ionización negativa, muestra una señal m/z 767 [M-H]⁻ para el ión molecular y un ión fragmento a m/z 551 debido a la pérdida de 218 u [M-H-218]⁻ correspondiente a un ácido malónico (86u) y una unidad de apiosa (132u). Estos iones confirman la presencia del compuesto 2'-O-Apiosil-4-O-malonil-betanina o su isómero, compuesto también llamado 2'-Apiosil-filocactina que se encontró en una planta conocida con el nombre de *Hylocereus* al igual que en la cactácea

Christmas (Wybraniec *et al.*, 2007). En la figura 50 se muestra la estructura química de este compuesto.





malonil-betanina o su isómero en la Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 50. Estructura de a) 2'-O-Apiosil-4'-O-malonil-betanina b) 2'-O-Apiosil-4'-O-

malonil-isobetanina.

Fuente. Este estudio

En la figura 51 se observa el espectro de masas (en modo positivo) correspondiente a la señal 16 (37.5min) del cromatograma de la fracción roja BC a 280nm (figura 29). La señal a m/z 975,65 del ión molecular [M+H]⁺ puede corresponder al compuesto (figura 52) 5"-O-E-sinapoil-2'-O-apiosil filocactina ó 5"-O-E-sinapoil-2'-O-apiosil isofilocactina. Según la literatura se han

encontrado fragmentos característicos m/z 551u y 389u por perdida de sus unidades de sinapoil y apiosil (Wybraniec *et al.*, 2010), estas características no se lograron identificar por lo cual es recomendable la técnica de Tándem para un análisis más certero.



Figura 51. Espectro de masas del ion molecular con m/z 975.65 de la 5"-O-E-sinapoil-2'-O-

apiosil filocactina o su isómero en la Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 52. Estructura de a) 5"-O-E-sinapoil-2'-O-apiosil filocactina, b)

5"-O-E-sinapoil-2'-O-apiosil isofilocactina



Figura 53. Cromatograma HPLC-DAD-ESI-MS de la fracción amarilla (BX) en la *Opuntia dillenii* a 480nm.

Fuente. Este estudio

El espectro de masas del pico 20 (figura 54), (2.18min, cromatograma de la figura 53) modo negativo, muestra el ion molecular [M-H]⁻ de m/z 367, para esta masa se sugiere una estructura del ácido feruloil quínico (figura 55).



Figura 54. Espectro de masas del ion molecular con m/z 367 del ácido feruloil quínicoen la

Opuntia dillenii.



Figura 55. Estructura del ácido feruloil quinico

Fuente. Este estudio

Así como también se encontró en el análisis de la fracción amarilla, el espectro de masas (figura 56) que corresponde a un tiempo de retención de 2.9 minutos el ion [M-H]⁻ de m/z 190.8, correspondiente a la estructura del ácido quínico como lo muestra la figura 57



Figura 56. Espectro de masas del ion molecular con m/z 190.8 del ácido quínico en la

Opuntial dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 57. Estructura del ácido quínico

De igual manera aparece un ion molecular $[M+H]^+$ en el cromatógrama de la figura 53 (8.3min) con una m/z de 309 como lo muestra en el espectro de la figura 58, debido a la pérdida de 86u de su estructura presenta un ion fragmento $[M-86]^+$ m/z 223. Sugiriendo la indicaxantina como estructura probable (figura 59)



Figura 58. Espectro de masas del ion molecular con m/z 309 de la prolina- betaxantina en

Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio



Figura 59. Estructura de la prolina- betaxantina (indicaxantiana)

Fuente. Este estudio

Los picos que se encuentran enumerados como 4, 6, 7, 11, 17,18, 23, 24 en las figura 29 y figura 30 no se lograron identificar debido a que los pesos moleculares encontrados para estos compuestos no están reportados en la literatura científica y además no presentan claros patrones de fragmentación. Los espectros de las señales no identificadas se adjuntan en los anexos.

Finalmente en los diferentes extractos se identificaron los siguientes compuestos se resumen en la tabla 11.

Tabla 11.

Estructuras tentativas de los compuestos mayoritarios caracterizados por espectrometría de

masas de EC, BC, BX en la Opuntia dillenii.

Estructura tentativa			
Betacianinas	λmax	$m/z[M+1]^+$	m/z [M-1] ⁻
Betanina	538	551	
Isobetanina	538	551	
17-descarboxibetanina	538	507	
17-descarboxiisobetanina	538		
6'-O-sinapoil-6-O-gomfrenina	280,538		755
6'-O-sinapoil-6-O-isogomfrenina	280,538		755
2'-O-apiosil-4-O-malonil-betanina	280,538		767
2'-O-apiosil-4-O-malonil-isobetanina	280,538		767
5"-O-E-sinapoil-2'-apiosil-filocactina	538	975	
5''-O-E-sinapoil-2'-apiosil-isofilocactina	538	975	
Betaxantinas			
tirosina-betaxantina	280,280	377	
triptofano-betaxantina	280,480	398	
prolina-betaxantina	480	309	
Acidos fenólicos			
isoramnetina-3-glucoronido	280	493	
Quercetina-3-O- glucosido	280	463	
ácido feruloil quínico			367
ácido quinico	480, 280	190	

4.9 Determinación de la capacidad antioxidante

4.9.1 Capacidad antioxidante método TEAC



Figura 60. Recta de calibración para determinar la capacidad antioxidante

Fuente. Este estudio

De la recta de calibrado (figura 60), se observa la relación lineal inversa entre la absorbancia y la concentración de Trolox. Por su pendiente negativa, se puede ver como el catión radical ABTS^{*+} sufre la decoloración al reaccionar con una sustancia antioxidante (Trolox).

Con los datos de la tabla 12 y utilizando la ecuación de la recta de calibrado (y = -0,2562x + 0,797) se obtuvieron los valores de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) para las muestras analizadas.

Tabla 12.

		absorbancia		
Réplica	EC	EP	BC	BX
1	0,271	0,492	0,397	0,551
2	0,273	0,502	0,394	0,557
3	0,271	0,492	0,393	0,555
Promedio	0,272	0,495	0,395	0,554
DS	0,0012	0,0058	0,0021	0,0031
CV	0,0043	0,0117	0,0053	0,0055

Datos de absorbancia de las muestras analizadas para el método TEAC.

Fuente. Este estudio

Para evaluar la funcionalidad del método se determinó como referencia la capacidad antioxidante para ácido ascórbico presentado un valor TEAC que concuerda con datos publicados por Re *et al., 1999*.

Tabla 13.

Capacidad antioxidante equivalente a Trolox de las muestras EC, EP, y las fracciones: BC, y

BX.

	TEAC			
Muestra	Experimental	Reportado	% inhibición	
Ácido ascórbico ^a	1.08 ± 0.014	1,05	40,8	
EC^{b}	35.29 ± 0.075		62,94	
EP^b	15.7±0.3		32,56	
BC^b	5.37 ± 0.03		46,18	
BX^b	1.74±0.022		24,52	

^ammol trolox/mmol de compuesto; ^b µmol Trolox/g fruto.



Figura 61. Comparación de los valores TEAC del ECy EP del fruto de Opuntia dillenii.

Fuente. Este estudio

Comparando los resultados (figura 61) del extracto crudo y purificado, permiten ver que mayor capacidad para capturar el radical ABTS, fue del extracto crudo (EC) que el purificado, esto puede estar asociado con un mayor contenido de compuestos fenólicos que junto a las betalaínas pueden generar un efecto sinérgico que contribuyen a estabilizar este radical; el valor TEAC para EP es menor por lo que se puede ver que el mayor aporte a la actividad antioxidante es de los compuestos fenólicos; sin embargo en la estructura de las betalaínas también se presentan el favorecimiento de características antioxidantes ya que en ellas se puede encontrar la presencia de grupos reductores, que inhiben los daños causados por los radicales libres, considerándose así estos pigmentos, buenos antioxidantes. Este efecto se miró cuando las betacianinas actúan en forma separada observándose que con solo 15 mg de la muestra BC se obtuvo un valor de 5.37 µmol Trolox/g fruto y es en este punto en donde se observa la contribución de la actividad antiradical de las betacianinas como tal, y no en conjunto con otros compuestos que le aporten en esta actividad; además haciendo la comparación entre los dos grupos de betalaínas, las betacianinas son mejores antioxidantes que las betaxantinas, porque a pesar que se utilizó 90.3mg de BX el valor TEAC sigue siendo bajo.

El porcentaje de inhibición muestra que el extracto crudo presenta mayor eficiencia para capturar el radical ABTS en comparación con las demás muestras analizadas resultados que se encuentran relacionados con el mayor contenido de fenoles, los cuales en conjunto con las betalaínas aportan a la actividad antiradical.

Tabla 14.

Valores TEAC en otras especies.

Econo	µmol Trolox /100 g	Piblicarafía
Especie	fruto fresco	Bioliografia
Tuna Cardona	4311	Eredia., 2011
Opuntia dillenii	3529	Fuente: esta investigación
O.f indica (L.)Mill.	610	Albana et al. 2015
Purpura	010	Albano et al.,2015
cv. Reyna (blanca),	500	Corral et al., 2008
· F · · · · · ·		

Fuente. Este estudio



Figura 62. Comparación de capacidad antioxidante en µmol Trolox/Kg fruto Opuntia

dillenii con otros frutos.

Comparando los valores TEAC en µmol Trolox /100 g fruta fresca (FF) (tabla 14) con otras especies (figura 62), se encuentra que la capacidad antioxidante de la tuna en estudio es comparable con la encontrada para la tuna Cardona, la cual presenta similitudes físicas con el fruto de *Opuntia dillenii*, las otras especies en comparación a pesar de ser del genero *Opuntia* no reportan valores TEAC altos; otro aspecto importante es la variación metodológica de extracción de los pigmentos.

4.9.2 Actividad anti-radical método DPPH.

En este trabajo se evaluó también la actividad anti-radical de los extractos EC, EP, BC, BX; por el método DPPH. Para ello fue necesario la elaboración de una recta de calibrado (figura 63) de absorbancia vs concentración del radical DPPH• que arrojó la siguiente ecuación: y = 10,683x - 0,0025, con esta se determinó la concentración de [DPPH•].



Figura 63. Recta de calibración DPPH'

Fuente. Este estudio

Para tener un punto de referencia se trabajó con ácido gálico, una sustancia conocida que se ha clasificado como un anti- radical de alta eficiencia Re *et al., 1999.* El comportamiento del ácido gálico en diferentes concentraciones frente al radical DPPH[•] se muestra en la figura 64:



Figura 64. Comportamiento de concentraciones de ácido gálico frente al radical DPPH⁻.

Fuente. Este estudio

Como se observa en la grafica de la figura 64, la reacción entre DPPH• y ácido gálico se estabiliza aproximadamente a los 10 minutos, en todas las concentraciones evaluadas; sin embargo en las soluciones mas concentradas (0.148g/L, 0.074g/L y 0.037g/L) se presentó una dismunición significativa del radical DPPH•.

Así, para calcular el EC_{50} (g de antioxidante/ kg DPPH) se graficó el porcentaje remanente de DPPH Vs la concentración de antioxidante en un tiempo de 30 minutos (figura 65).



Figura 65. Curva con diferentes concentraciones de ácido gálico.

Fuente. Este estudio

En las gráficas (figura 66) se observa el % DPPH⁻ Remanente con respecto al tiempo de reacción para el extracto crudo (EC), extracto purificado (EP) y fracciones rojas (BC), amarillas (BX).

a) EC



b) EP.











Figura 66. Grafica que relaciona % remanente de DPPH con el tiempo para las muestras obtenidas del fruto de *Opuntia dillenii* a)EC b) EP c) BC d) BX

Fuente. Este estudio

De la gráfica (figura 66 a) se puede observar que a mayor concentración de antioxidante, menor % DPPH⁻ remanente., lo que comprueba que la eficiencia anti-radical depende claramente de la concentración. También se puede ver que el comportamiento frente al radical es diferente para cada muestra; por ejemplo, para el caso del extracto crudo EC se observó que la solución de 6,71 g/L reduce más rápidamente el 50 % de DPPH. El extracto purificado tiene un comportamiento similar, pero es necesario utilizar 6.45g/L para que haya una disminución del radical al 50% en un tiempo aproximado de 30minutos.

Para la fracción roja se observa un comportamiento diferente a los dos anteriores ya que se utilizó solo 1.4g/L para lograr una reducción significativa en la concentración de DPPH y además se estabiliza aproximadamente a los 20 minutos, hecho que no sucede con la fracción amarilla, en este caso se tiene que utilizar una mayor concentración de antioxidante. Esto se debe a que las Betacianinas son antioxidantes más potentes que las Betaxantinas (Azeredo, 2009).

Mediante la gráfica de concentración de antioxidante vs % DPPH• Remanente (anexos) se calculó el EC_{50} . Se debe destacar que mientras menor sea el valor EC_{50} mayor será la capacidad antioxidante; así de esta manera de acuerdo a los resultados de la tabla 15 se puede decir que la mayor capacidad antioxidante es de la fracción roja, porque en el ensayo se utilizó menor cantidad de muestra por kilogramo del radical DPPH•. En la tabla 15 se presentan estos resultados.

Tabla 15.

Muestra	g/ml antioxidante	%rem DPPH	Ec50 (g/Kg DPPH)
	7.5	44.44	
	5.4	57.17	
EC	4.3	69.84	6870
	3.2	79.36	
	1.6	87.34	
	7	48.55	
	5.005	55.55	
EP	3.99	68.25	6775
	3.01	81.49	
	1.5	88.88	
	1.5	34.09	
	1.41	39.8	
BC	1.27	43.8	1446
	1.2	50.47	
	1.11	51.8	
	9.03	38.09	
	8.13	39.23	
BX	6.77	74.09	9815.9
	5.87	75.04	
	4.96	90.09	
	0.148	11.48	
	0.074	37.65	
ácido gálico	0.037	37.65	35.30
	0.018	63.98	
	0.0074	86.09	

Valores EC₅₀ para EC, EP, BC, BX y ácido gálico.

Los valores EC_{50} para las muestras analizadas son grades con respecto al patrón de referencia, esto se debe a que la concentración en g/ml de las muestras analizadas que se utilizaron para aplicar el método fue grande en comparación a la cantidad que se utilizó para el ácido gálico; el hecho por el cual se utilizaron estas concentraciones fue para disminuir el tiempo del ensayo, de lo contrario el tiempo se hubiera extendido por más de 24 horas.

En comparación con los resultados obtenidos por el método TEAC el extracto crudo es el que presenta mayor capacidad antioxidante sin embargo el valor EC_{50} es menor para el extracto purificado.

Entre las fracciones, sí se puede ver una concordancia entre los dos métodos. La fracción roja presenta mayor capacidad antioxidante y menor valor EC_{50} , y para la fracción amarilla menor capacidad antioxidante y mayor valor de EC_{50} , lo que confirma que las betacianinas son antioxidantes más potentes, debido a que en su estructura se encuentran un mayor número de sustituyentes tipo hidroxilo que estabilizan los radicales libres (Azedero, 2009).

4.10 Estabilidad del extracto crudo

La estabilidad es uno de los factores más importantes a la hora del uso de pigmento, y puede ser una de las limitaciones de estos extractos como aditivo en condiciones ambientales. En este trabajo se estudió la estabilidad del extracto crudo en solución acuosa, a pH 3, 5, 7 en presencia y ausencia de luz en presencia de oxígeno. Durante un periodo de almacenamiento de 35 días se hizo el seguimiento por espectrofotometría, midiendo la absorción en cada ensayo, como medida de la degradación y disminución del contenido del pigmento con el paso del tiempo.
Con las absorbancias obtenidas en el seguimiento se calculó la variación de $ln(A_t/A_0)$ de cada muestra analizada, (donde A_t , es la absorbancia en un tiempo en días A_0 es la absorbancia inicial de la solución a una longitud de onda) y esta variable se correlacionó con el tiempo.

De acuerdo al comportamiento observado (figura 67) se tiene que la degradación guarda relación directa con la pendiente de cada recta.

a) pH 3 ausencia y presencia de luz



b) pH 5 ausencia y presencia de luz



pH 7 ausencia y presencia de luz



Figura 67. Graficos de la variable $ln(A_t/A_0)$ con respecto al tiempo a) pH 3 presencia y ausencia de luz b)pH 5 en presencia y ausencia de luz c) a pH 7en presencia y ausencia de

luz.

Fuente. Este estudio

De cada recta se obtuvo la pendiente que es igual a la constante de velocidad de degradación (*k*), encontrándose que valores bajos de la constante corresponden a menor degradación y por lo tanto a una mayor estabilidad de la solución. Observando las diferentes condiciones en las que se evaluó la estabilidad, se determinó que la solución acuosa a pH 5 y en ausencia de luz, tiene menor valor en la constante de velocidad de degradación; estos resultados permiten establecer las condiciones adecuadas de pH, en ausencia de luz a condiciones ambientales en el manejo del pigmento en soluciones acuosas.

En la tabla 16 se muestran los datos obtenidos para cada condición, el tiempo de vida media está relacionado en forma inversa a la constante de velocidad de reacción, por lo tanto, a mayor k menor tiempo de vida media, por consiguiente menor estabilidad.

4.10.1 Efecto de pH y luz

Se observó que durante el primer día de almacenamiento la absorbancia de las muestras no se afectó por el pH (3,5,7); sin embargo a partir del día quinto se observó mayor disminución en la absorbancia en las soluciones a pH 3. Después de 5 días la intensidad del color de las soluciones a pH 7 y 3 decrece más rápido que en las soluciones a pH 5, aspecto que se evidencio en la pendiente de cada recta, estos datos están de acuerdo con los resultados hallados por Huang *et al .*, 1987, quienes demostraron que el pH óptimo para la estabilidad máxima de la betanina en presencia de oxígeno está entre 5.5 y 5.8. Es evidente también que la presencia de luz (bombilla: fluorescente compacto con intensidad lumínica 0.09mW) aceleró la degradación de las soluciones.

Tabla 16.

Condiciones de almacenamiento y parámetros cinéticos de degradación de betalaínas para el extracto crudo acuoso

Condición / almacenamiento		Resultados	
pH	Luz	$t_{1/2}$ (días)	$k(10^{-3} dias^{-1})$
3	Ausencia	33.17±0.72	21±0.46
	presencia	11.65±0.26	59.4±1.1
5	Ausencia	96.32±2.67	7.2±0.2
	presencia	25.76±0.77	27.1±0.5
7	ausencia	24.67±0.31	28.1±0.35
	presencia	17.03±0.76	40.6±1.7

Fuente. Este estudio

Los resultados de la tabla 16 se observaron claramente en la figura 68, En esta se presenta la variación del tiempo de vida media del extracto crudo con respecto a las condiciones de almacenamiento.





Fuente. Este estudio

El análisis de estos datos permitió concluir que bajo las condiciones de almacenamiento, el tiempo de vida media del extracto crudo es mayor (mayor estabilidad) cuando las soluciones acuosas se almacenaron a pH 5 y en ausencia de luz, siendo esta último el factor que más influyó en la estabilidad del extracto lo que está en concordancia con estudios que reportan que el colorante se degrada fácilmente y particularmente cuando es expuesto a la luz (Herbach *et al* ., 2004).

4.10.2 Determinación del % de betanina degradada.

Finalmente se evaluó el contenido de betanina por el método de Stintzing *et a*l 2004 en un tiempo inicial (t₀) y un tiempo final (t₃₅), con el propósito de cuantificar el % de betanina degradada; siendo este el tercer parámetro que ayudó a determinar las mejores condiciones de almacenamiento de los pigmentos. Como se observa en la tabla 17 el porcentaje de degradación fue mayor a pH 3 y 7 que a pH 5. Encontrándose también que cuando las soluciones se almacenaron en presencia de luz, es mayor la cantidad de betanina degradada, estos resultados son similares a los hechos encontrados por Cai *et al.*, 1998 en donde la betanina se degrada un 15.6% más en presencia de luz. El porcentaje de betanina degradada, el tiempo de vida media y la constante de velocidad, permiten encontrar que las condiciones de almacenamiento de la solución del extracto crudo acuoso del fruto de *Opuntia dillenii* son a pH 5 y en ausencia de luz.

Tabla 17.

Condiciones		mgbetanina/100gfruto		
рН	Luz	t ₀	t ₃₅	% de betanina degradada
3	ausencia	11.61±0.07	4.61±0.42	60.29
	presencia	11.64 ± 0.01	1.33±0.06	88.57
5	ausencia	12.04±0.06	9.50±0.04	21.09
	presencia	12.06±0.06	4.78±0.08	60.37
7	ausencia	12.20±0.03	4.74 ± 0.09	61.15
	presencia	12.29±0.01	3.13±0.23	74.53

Resultados del % de betanina degradada encontrados a las condiciones establecidas.

Fuente. Este estudio

CONCLUSIONES

La técnica HPLC-ESI-MS permitió la identificación de los compuestos betanina e isobetanina, descarboxibetanina y descarboxisobetanina, 2'-O-apiosil-filocatina, sinapoil-gonfrenina, sinapoil-isogofrenina, tirosina-xantina, triptofan-betexantina, isoarmetin-3-glucoronide, quercetin-3-O-glucosido en la fruta de *Opuntia dillenii*.

El contenido fenólico calculado por el método de Folin Ciocalteau en el extracto crudo del fruto de *Opuntia dillenii* fue de 311.61mg de AG/100g de fruto fresco, siendo éste extracto rico en compuestos fenólicos y otras sustancias que reducen el reactivo de Folin, con lo cual supera a valores encontrados en otros estudios para *Opuntia ficus indica* (52mg AG/100gFF), *Cv Reyna* (72.3mgAG/100gFF), *Opuntia ficus indica* (L)Mill (89.2mgAG/100gFF).

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos EC, EP, BC y BX frente a radicales ABTS y DPPH por espectroscopia UV-Vis, permitió establecer que el más activo frente a radicales ABTS era el EC, seguido por el EP, BC y BX. Los resultados de este método evidenciaron que la mayor actividad antioxidante está relacionada con el contenido de betalaínas en conjunto con el contenido fenólico; sin embargo la fracción roja muestra buena actividad antioxidante en una menor concentración, lo cual se confirmó al aplicar el método DPPH, donde se estableció que este extracto era más activo frente a los radicales libres con un valor EC_{50} de 1436 g/Kg DPPH, siendo este inferior que las otras muestras.

El fraccionamiento del EC de esta fruta mediante el uso de cromatografía en columna (C18) fue apropiado para el análisis de las betalaínas, ya que se logró obtener por separado dos clases de compuestos tanto betacianinas, como betaxantinas.

El análisis de la estabilidad del extracto EC, permitió observar las condiciones más favorables en las cuales se conserva el contenido de betalaínas, con base en la cuantificación de

los pigmentos se concluyó que el extracto más estable era el almacenado a pH 5 y en ausencia de luz, mostrando un tiempo de vida media de 96.32 días, una constante de degradación 7.2 $\times 10^{-3}$ días⁻¹.

Los extractos del fruto *Opuntia dillenii* presentan un contenido fenólico y actividad antioxidante importantes, estas propiedades en conjunto con el color se podrían preservar utilizando la técnica de microencapsulados en un trabajo posterior.

RECOMENDACIONES

Para confirmar y profundizar en el conocimiento de la estructura de los compuestos identificados en el fruto de *Opuntia dillenii* se recomienda analizar los extractos aislados mediante la técnica de espectrometría de Masas en modo *tándem* (MS-MS).

Existen diversos componentes minoritarios de los que no hay en la literatura reportes sobre su peso molecular hallado en esta investigación, para ellos es necesario profundizar en su elucidación estructural mediante otras técnicas instrumentales como la RMN y espectrometría de Masas en modo *tándem* (MS-MS).

Con el propósito de conservar las propiedades bifuncionales de este tipo de extractos se recomienda realizar estudios cinéticos de la degradación de sus microencapsulados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alam, M; Bristi, J; Rafiquzzaman, M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi. Pharm. J.* 21 p.143-152.
- Albano, C; Negro, C; Tommasi, N; Gerardi, C; Mita, G; Miceli, A; Bellis, L; Blando, F.
 (2015). Betalains, Phenols and Antioxidant Capacity in Cactus Pear [Opuntia ficus-indica
 (L.) Mill.] Fruits from Apulia (South Italy) Genotypes. *Antioxidants*, 4(2), p. 269-280.
- Altamirano, R; Drdák, M; Simon, P; Rajniakoba, A; Karovicová, J, & Preclíck, L. (1993)
 Thermal degradation of betanine in various wáter alcohol model systems. *Food Chem*.
 46, p.73-75.
- Aravena, S; Orthofer, V; Lamuela, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. En: *Meth. Enzymol.* 299, p. 152–178.
- Attoe, E; Elbe, J, (1981). Photochemical degradation of betanine and isolated anthocyanins, J. Food. Sci. 46, p.1934-1937.
- Attoe, E; Von; E. (1985,) Oxygen involvement in betanine degradation: effect of antioxidants. *J. Food Sci.* 50, p. 106–110.
- Azedero, H. (2009) Betalains: properties, sources, applications, and stability a review. *Food. Sci. Technol. Res.* 44, p. 2365–2376.
- Bilyk, A; Kolodij, M; Sapers, G. (1981) Estabilization of red beet pigments with isoascorbic acid. *J. Food. Sci.* 46, p.1616-1617.
- Bjön, L; Papageorgiou, G; Blankenship, R; Govindjee. (2009) Review. A viewpoint: Why chlorophyll a?. *Photosynth. Res.* 99, p 85-98.

- Böhm, H; Rink, E. (1988) . Betalains. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.Vasil, I, K, Ed . New York: *Academic Press*, 5, p 449-463.
- Borovsky, Y; Para, I. (2008) chlorophyll breakdown during pepper fruit ripenin in the chlorophyll retainer mutation is impaired at the homolog of the senescence-inducible stay-green gene. *Theor. Appl. Genet.* 117, p. 235-240.
- Brand, W; Cuvelier, M; Berset C.(1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food. Sci. Technol.* 28, pp. 25-30.
- Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. En: *Nutr. Rev.* 56, p. 317-333.
- Butera, D; Tesoriere, L; Di gaudio, F; Bongiorno, A; Allegra, M; Y Pintaudi, A. (2002)
 Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. J. Agric. Food. Chem. 50, p. 6895–6901.
- Cai, Y; Sun, M; Corke, H. (2003)Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. J. Agric. Food Chem. 51, p. 2288–2294.
- Cai, Y; Sun, M; Corke, H;(1998) Colourant properties and stability of Amaranthus betacyanin pigments. J. Agric. Food Chem. 46, p. 4491–4495.

Cai, Y; Sun, M; Corke, H. (2005) HPLC Characterization of Betalains from Plants in the

Amaranthacea J. Chrom. Sci. 43, p. 454-460.

Cai Y; Sun M; Wu H ;Huang R; Corke H. (1998) Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. J. Agric. Food. Chem. 46 (6), p. 2074-2070.

- Castellanos,S; Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. Journal of *Agric. Food. Chem.* 56, p. 5758–5764.
- Castellar, R; Obón, J. M; Alacid, M; Fernandez, J. A. (2003) Color Properties and Stability of Betacyanins from Opuntia Fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 51, p.2772-2776.
- Corral, R; Yahia, E; Carrillo, A; González, G. (2008). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. J. Agric. Food Chem. 56 p.10498-10504
- Chihuailaf, R; Contreras, P; Wittwer, F.(2002) Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Res.* 33(3), p. 265-283.
- Correa, J; Jacob, J; Perez,C; Paliyath, G. (2011) Effect of a sodium caseinate edible coating on berry cactus fruit (*Myrtillocactus geometrizans*) phytochemicals. *Food. Res. Int.* 44, p. 1897–1904.
- Cantwell, M. (1995). Post-harvest management of fruits and vegetables stems. *In*: Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. Barbera, G. (ed.) FAO *Plant Production and Protection*, Paper 132. p. 120-141.
- Delgado, F; Jimenez, A; Paredes; O. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Critical Reviews in: *Food. Sci. Nutr.* 40, p. 173–289.
- Drdák, M y Vallová, M. (1990). Kinetics of the thermal degradation of Betanine. *Die Nahrung*, 34, p. 307-310.

- Einbond, R; Reynertson, A; Xiao dong, L; Basile, J; Kennelly, E. (2004) Anthocyanin antioxidants from edible fruits. En: *Food. Chem.* 84, p. 23-28.
- Fennema, O. (1995) Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España., Capitulo 10. p. 773-849.
- Fernández J; Castellar, R; Obón, J. Almela, L.(2002) Screening and Mass-Spectral Confirmation of Betalains in Cactus Pears. *Chromatographia*. 56, p.591-595.
- Fernández, J; Giménez, P; Angosto, J; Moreno, J.(2012) A Process of Recovery of a Natural Yellow Colourant from *Opuntia* Fruits. *Food. Technol. Biotechnol.* 50 (2), p. 246–251.
- Folin, C; Ciocalteau, V. (1927) Tyrosine and tryptophan determination in proteins. En: J. Biol. Chem. 73, p. 627-650.
- Franco, M. (2004) caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (escontria chiotilla); una cactácea subexplotada. Tesis para obtener título maestra en biotecnología. Universidad autónoma metropolitana. México. p. 120.
- García, L; Salinas, Y; Valle, S. (2012). Phenolic compounds and antioxidant activity in pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Rev. Fitotec. Mex.* 35, p. 1 5.
- García, R. (2008) Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia stricta*. Tesis pregrado, Universidad Politécnica de Cartagena, Colombia. p. 89.
- Georgiev, V; Weber, J; Kneschke, E; Nedyalkov, P; Bley, T; Ivanov, A. (2001)Antioxidant Activity and Phenolic Content of Betalain Extracts from Intact Plants and Hairy Root Cultures of the Red Beetroot *Beta vulgaris cv*. Detroit Dark Red. *Plant. Foods. Hum. Nutr.* 65, p. 105–111.
- Guzmán S; Herrera, G; Hernández,D; Reynoso, R; Guzmán,A; Vaillant, F. (2010) Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit

cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food. Chem.* 121, p. 381-386.

- Halvorsen, B; Holte, K; Myhrstad,W.(2002) A systematic screening of totaantioxidants in dietary planzs. J. Nutr. 132, p. 461–471.
- Harris, D. (2007) análisis químico cuantitativo, editorial Reverté S.A, 3° edición, Barcelona, p. 709.
- Herbach, K; Stintzing, F; Carle, R. (2004) Impact of thermal treatment on colour and pigment pattern of red beet (Beta vulgaris L.) preparations. *J. Food. Sci.* 69, p. C491–C498.
- Huang, A; Von Elbe, J. (1987) Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. J. Food. Sci, 52, p.1689-1693.
- Khan, M; Sri Harsha, P ; Giridhar, P; Ravishankar, A. (2012). Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and *in vitro* cancer cell cytotoxicity of *Rivina humilis*L. berries, potential source of betalains. *LWT Food. Sci. Tech.* 47, p. 315–323.
- Kugler, F; Stintzing, F; Carle, R. (2007). Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from Gomphrena globosa L. and Bougainvillea sp. by HPLC– DAD–ESI–MS. Anal. Bioanaly. Chem. 387, p. 637–648.
- Kujala T ; Loponen, J; Klika, D; Pihlaja ,K. (2000) Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution an effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. J. Agric. Food. Chem. 48, 5338-5372.
- Kuskoski, E; Vega, J; Rio, J; Fett, R;Ttroncoso, A; Asuero, A.(2003) Characterization of anthocyanins from the fruts ofBaguacu (*Eugenia umbelliflora Berg*). En: Int. J. Sociology. Agric. and Food. 51, pp.

- López B.G. (1985). Obtención de colorantes rojos de origen natural a partir del betabel, estudio agroquímico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- Martínez, J; Narros, A; García, M; Pozas, F; Díaz, S.(2009) Experimentación química general, Thomson ediciones, 5ª edición, Madrid, p. 172.
- Moreno, D; García C; Gil J. (2008) Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Rev.* 7 p. 261-280.
- Moussa, T; El-Samahy, S; Rohn, S; Kroh, S. (2011) Flavonols, betacyanins content and antioxidant activity of cactus Opuntia macrorhiza fruits . *Food. Res. Int.* 44(7), p. 2169–2174.
- Namiki M.(1990) Antioxidants/antimutagens in food Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 29, p. 273-300.
- Nemzer, B; Pietrzkowski, Z; Sporna , A; Stalica, P; Tadeusz, T; Wybraniec, S. (2011) Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root(Beta vulgaris L.) dried extracts. *Food. Chem.* 127 p. 42–53.
- Osorio, O; Ortiz, A; Alvares, V; Dorantes, L; Gusti, M. (2011) Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits, *J. Food. Res.* 44, p. 2160–2168.
- Okezie, I. (2002) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. En: *Mutation. Res.* 523, p. 280.
- Paz, O; Yahia,E; Bejar, G.(2008) Changes in external and internal color during, postharvest ripening of manila and ataulfo mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography- APcl⁺ -time-of-flight mass spectrometry. *postharvest. Boil. Tech.* 50, p. 145-152.

- Piatelli, M. (1981) The Betalains:Structure, biosynthesis and chemical taxonomy. In: Conn, E, E, Ed; and the biochemestry of plants: A comprehensive treatise. Secondary plant products academy press, New York. 17, p. 557-570.
- Piattelli, M; Minale, L; Nicolaus, R. (1965). Ulteriori ricerche sulle betaxanthine. Rend. Accad. Sci. Fis. Mat. Napoli 32, p. 55–56.
- Piattelli M, Betalains. (1976). In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments; Academic Press. New York: s.n, p. 564.
- Pimienta, E; Del Castillo, R. Reproductive biology. In: *Cacti, Biology and uses*. Park S. Nobel (ed). University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, U.S.A. 2002, p. 75-90.
- Pourrat, A; Lejeune, B; Grand, A; Pourra,T. (1988) Betalains assay of fermented red beet root extrac by High performance liquid chromatografy. *J. Food. Sci.* 53(1), p. 294-295.
- Prakash, M; Manikandan, S; Mekala, V. (2013)Modeling and optimization of betalain extraction from Opuntiaficus-indica using Box–Behnken design with desirability function. *Ind. Crop. Prod.* 49, p 304–311.
- Qiu,Y; Chen, Y; Pei, Y; Matsuda, H; Yoshikawa M. (2002) Constituents with Radical
 Scavenging Effect from Opuntia dillenii: Structures of New α-Pyrones and
 Flavonol Glycoside. *Chem. Pharm. Bull* 50(11) p. 1507—1510
- Ratnaweera, P; De Silva1, D; Williams, D; Andersen, R. (2015) Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant Opuntia dillenii and the isolation of equisetin, from endophytic Fusarium sp. *reviuw BMC* 15 p.220.

- Re, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M; Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic*. *Biol. Med.* 26 p. 1231-1237.
- Repo, R; Encina, C. (2008) Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Rev. Soc. Quím.* 74(2), 108-124
- Ribas, A; Barbosa, G. (2005) Operaciones unitarias en la ingeniería de alimento. Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona, p. 865
- Rodríguez P. F. (1985) Las betalainas como colorantes naturales en alimentos. *Revista de la Industria Alimentaria.*, 7, 4 p. 9-13.
- Robbins J (2003). Phenolic acids in food: An overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem. 51: 2866-2887.
- Saguy, I; Kopelman, I y Mizrahi, S. (1978). Thermal Kinetic Degradation of Betanin and Betalamic Acid. J. Agric. Food Chem, 26, p. 360-362.
- Saldaña, M. (2004) Efecto de la copigmentación sobre la expresión de color en sistemas modelo de ciruela (Prunnus doméstica), Puebla (México), trabajo de grado (Licenciatura en quimicofarmacobiología). Escuela de ciencias. Universidad Las Américas. P 123.
- Sánchez, N. (2006) Extraccion y caracterización de los principales pigmentos de *Opuntia joconostle* (xoconostle), Tesis maestría, centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada, Instituto Politécnico Nacional. México. p. 107.
- Sánchez, C; Larrauri, J; Saura, C. (1998) A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. *J. Food. Sci. Agric.* 76, p. 270- 276.

- Santos, S; Zabaleta, F; Zaldívar, P; Villalpando, A; Yañes, M; Guerrero, I. (2007) Caracterización parcial del pigmento rojo de la "jiotilla". (Escontria chiotilla [wever] briton & rose). *Rev. Mex. Ing.* 6 (001), p.19-25.
- Sapers, G; Hornstein, J. (1979). Varietal differences in colorant poperties and stability of red beet pigments. J. Food Sci. 44, p. 1245-1248.
- Sepúlveda, E; Sáenz, C; Gómez, C. (2003) Determinación de betanina en ecotipos de tuna roja colectados en Chile. Memoria IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional Conocimiento y aprovechamiento del nopal. Zacatecas, México. p. 282-285.
- Sekiguchi, H; Ozeki, Y; Sasaki, N. (2010) In Vitro Synthesis of Betaxanthins Using Recombinant DOPA 4,5-Dioxygenase and Evaluation of Their Radical-Scavenging Activities J. Agric. Food. Chem. 58, p. 12504–12509.

Shawanneck, M. (2009) Physico-chemical Characteristics and Antioxidant Activity of Tart Cherry

Powder dried by various drying methods. Tesis de maestria. Michigan State University. p 22.

- Stintzing, F; Carle, R.(2004) Analysis of Betalains. In Socaciu Carmen (Ed.), Food colorants: Chemical and functional properties. CRC Press. p. 507–531.
- Stintzing, F y Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Food. Sci. Tec.* 15, p.19–38.
- Stintzing, F; Schieber, A; Carle, R. (2002) 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. J. Agric. Food. Chem. 50, p. 2302-2307.

- Stintzing, F; Schieber, A; Carle, R. (2002). Betacyanin in fruits from red-purple pitaya, Hylocereus polyhizus (Weber) Britton & Rose. *Food. Chem.* 77 p.101–106.
- Stintzing, F; Schieber, A; Carle, R. (1999) Amino acid composition and betaxanthin formation in fruits from *Opuntia ficus-indica*. *Planta Med.* 65, pp. 632–635.
- Stintzing, F; Schieber, A; Carle, R.(2001) Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur Food Res Technol*. 2001, 212, p. 396–407.
- Stintzing, F; Carle, R.(2004) Funtional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition, *Food. Sci. Technol. Res.* 15, p. 19- 38.
- Strack, D; Steglich, W; Wray, V. (1993) Betalains. In: Methods in plant Biochemistry. Academic Press. Orlando. 8, p. 421-450.
- Strack, D; Vogt, T; Schliemann, W. ((2003)) Recent advances in betalain research. *Phytochemistry.* 62 p. 247–269.
- Tesoriere, L; Butera, D; D'arpa, D; Di Gaudio, F; Allegra, M; Gentile, C; Livrea, M. (2003) Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low-density lipoproteins. *Free. Radical. Res.* 37, p. 689-696.
- Vergara, C; Saavedra, J; Sáenz, C; García, P; Paz R. (2014) Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (Opuntia ficus-indica) extracts and betanin stability during storage. *Food Chem.* 157, p. 246–251.
- Villegas, R; García, F; Caballero A; Santos E. (1983) Estudio de los colorantes del betabel (Beta vulgaris L.). *Rev. Soc. Quím. Méx.* 27 (4), p. 175-183.
- Von, E; Maing, I; Amundson, C. (1974) Colour stability of betanin. J. Food Sci. 39, p. 334–337.
- Von, E y Attoe, E. (1985). Oxygen involvement in betanine degradation Measurement of active oxygen species and oxidationreduction potentials. *Food. Chem*, 16, p. 49–67.

- Wu, L; Hsu, H; Chen, C; Chiu, C; Lin, Y; Ho, J.(2006) Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chem.* 95, p. 319–327.
- Wybraniec, S; Nowak, B; Mitka, K; Kowalski, P; Mizrahi, Y. (2007) Minor betalains in fruits of Hylocereus species. Phytochemistry. 68, p. 251–259.
- Wybraniec, S; Spo´ rna, A; Mizrahi, Y. (2010) Profiles of Betacyanins in Epidermal Layers of Grafted and Light-Stressed Cacti Studied by LC-DAD-ESI-MS/MS. J. Agric. Food Chem. 58, p. 5347–5354.
- Yahia, E; Ornelas, J. Fruit and Vegetable Phytochemicals Chemistry, Nutritional Value, and Stability. chemestry, stability and biologycal actions of carotenoides Editorial Wiley-Blackwell. 2010, p. 177-184.
- Yeddes, N; Chérif, J; Guyot, S; Sotin, H; Ayadi, M. (2013) Comparative Study of Antioxidant Power, Polyphenols, Flavonoids and Betacyanins of the Peel and Pulp of Three Tunisian *Opuntia* Forms. *Antioxidants*, 2, p. 37-5.
- Zhu, F; Cai, Y; Corke, H. (2010) Evaluation of Asian salted noodles in the presence of Amaranthus betacyanin pigments. *Food. Chem*, 118 p. 663–669

ANEXOS

Anexo A.

GRAFICAS





EC 50 para extracto purificado (EP)



EC 50 para fracción roja (BC)



EC 50 para fracción amarilla (BX)



Anexo B.

COMPUESTOS NO IDENTIFICADOS) POR HPLC-ESI-MS

Espectros de masa en modo positivo [M+H]⁺

t_R(tiempo de retención): 4.7minutos



Extracto: EC λ :280nm t_R (tiempo de retención):17.8minutos

Extracto: EC λ:280nm



Extracto: EC λ : 480nm t_R (tiempo de retención): 11.9

















Extracto: EC λ :480n m t_R(tiempo de retención):18.5





Extracto: BX λ :280nm t_R (tiempo de retención):6.2minutos



Extracto: BX λ :280nm t_{R} (tiempo de retención):6.2minutos









Extracto: BX λ :280nm t_R (tiempo de retención):6.2minutos

Espectros de masa en modo negativo [M-H]⁻









Extracto:BX λ :280nm t_R (tiempo de retención): 6.2minutos.



Extracto:BX λ :280nm t_R (tiempo de retención):6.2minutos.









