

CARACTERIZACIÓN, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTABILIDAD DE LAS
BETALAÍNAS AISLADAS DEL FRUTO DE DOS ESPECIES DE CACTUS: *OPUNTIA*
STRICTA HAW Y *OPUNTIA ELATIOR* MILL.

MARÍA CLAUDIA MONTALVO REVELO

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

2020

CARACTERIZACIÓN, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTABILIDAD DE LAS
BETALAÍNAS AISLADAS DEL FRUTO DE DOS ESPECIES DE CACTUS: *OPUNTIA*
STRICTA HAW Y *OPUNTIA ELATIOR* MILL.

María Claudia Montalvo Revelo

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

Director

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez

Dr. Ciencias Químicas

Codirectora

Silvia Cruz Sánchez

Dra. Ciencias Químicas

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

2020

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”.

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

NOTA DE ACEPTACIÓN

NATALIA MOSQUERA

Firma Jurado

JHON FREDY CASTAÑEDA

Firma Jurado

San Juan de Pasto, Diciembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su amor y apoyo incondicional.

A los docentes Nelson Hurtado y Silvia Cruz por su orientación y colaboración a lo largo de este trabajo de investigación.

A la Universidad de Nariño y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) por el financiamiento de esta Investigación.

A los jurados evaluadores, Natalia Mosquera y Jhon Fredy Castañeda por el tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.

A los docentes y laboratoristas del programa de Química por sus enseñanzas durante mi formación profesional.

A mis amigas y compañeras Pamela, Carolina, Natalia y Estefanía, por los momentos compartidos y por su apoyo y colaboración en la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

*A mi madre, por todo su amor y apoyo durante esta etapa de mi vida
sin ella esto no habría sido posible, gracias por ser mi ejemplo.*

RESUMEN

En el presente estudio se aislaron, purificaron e identificaron los pigmentos mayoritarios tipo betalaína de dos variedades de Cactus: *Opuntia stricta* Haw y *Opuntia elatior* Mill, que crecen de forma silvestre en Cañón de Chicamocha (Departamento de Santander). Inicialmente el extracto crudo se aisló mediante extracción asistida con Microondas (EAM). Posteriormente, los extractos crudos se purificaron eliminando los mucílagos. En este proceso se aislaron dos extractos crudos: extracto crudo de *O. stricta* (ECOS) y extracto crudo de *O. elatior* (ECOE) y dos extractos purificados, extracto purificado de *O. stricta* (EPOS) y extracto purificado de *O. elatior* (EPOE). Mediante espectroscopía UV-Vis se cuantificó el contenido de betacianinas, encontrando para ECOS: $11,842 \pm 0,124$ mg de betanina/100 g de fruto fresco y para ECOE: $3,374 \pm 0,095$ mg de betanina/100 g de fruto fresco. Mediante HPLC-DAD y espectroscopia UV-Vis, se identificaron en el fruto de las dos especies 5 betacianinas: Betanina (0,78 y 0,17%), Descarboxibetanina (0,50 y 0,10%), Isobetanina (1,30 y 0,51%), Descarboxiisobetanina (0,69 y 0,17%) y Neobetanina (no cuantificada) además de dos betacianinas no identificadas (0,88; 0,45 y 1,33; 1,57%) g de betacianina en 100 g de extracto purificado) para *O. stricta* y *O. elatior* respectivamente.

Por otra parte, el análisis de la actividad antioxidante mostró que las fracciones rojas de ambas especies son las más antioxidantes y a la vez presentaron el mayor contenido fenólico. Con respecto a la estabilidad al almacenamiento; se concluyó que la degradación de los pigmentos sigue una cinética de primer orden, el pH óptimo de almacenamiento para los dos extractos crudos fue el pH de sus soluciones acuosas. Este estudio también permitió establecer que cuando los extractos crudos son encapsulados en maltodextrina, las muestras son mucho más estables (no se observaron diferencias en el contenido de betacianinas, contenido fenólico y TEAC).

Palabras clave: Betalaínas, *Opuntia*, TEAC, DPPH, Estabilidad.

ABSTRACT

In the present study, the betalaine-type major pigments of two varieties of Cactus were isolated, purified and identified: *Opuntia stricta* Haw and *Opuntia elatior* Mill, which grow wild in Cañon del Chicamocha (Department of Santander). Initially the crude extract was isolated by Microwave assisted extraction (MAE). Subsequently, the crude extracts were purified by removing the mucilages. In this process, two crude extracts were isolated: crude extract of *O. stricta* (ECOS) and crude extract of *O. elatior* (ECOE) and two purified extracts, purified extract of *O. stricta* (EPOS) and purified extract of *O. elatior* (EPOE). By UV-Vis spectroscopy, the betacyanin content was quantified, finding for ECOS: $11,842 \pm 0,124$ mg of betanin / 100 g of fresh fruit and for ECOE: $3,374 \pm 0,095$ mg of betanin / 100 g of fresh fruit. Using HPLC-DAD and UV-Vis spectroscopy, 5 betacyanins were identified in the fruit of the two species: Betanin (0.78 and 0.17%), Descarboxibetanin (0.50 and 0.10%), Isobetanin (1, 30 and 0.51%), Decarboxyisobetanin (0.69 and 0.17%) and Neobetanin (not quantified) in addition to two unidentified betacyanins (0.88, 0.45 and 1.33, 1.57%) g of betacyanin in 100 g of purified extract) for *O. stricta* and *O. elatior* respectively.

On the other hand, the analysis of the antioxidant activity showed that the red fractions of both species are the most antioxidant and at the same time had the highest phenolic content. With respect to storage stability; it was concluded that the degradation of the pigments follows a first order kinetics, the optimum storage pH for the two crude extracts was the pH of their aqueous solutions. This study also allowed to establish that when the crude extracts are encapsulated in maltodextrin, the samples are much more stable (no differences were observed in betacyanin content, phenolic content and TEAC).

Keywords: Betalains, *Opuntia*, TEAC, DPPH, Stability.

CONTENIDO

Introducción	22
1. Objetivos	24
1.1. Objetivo General	24
1.2. Objetivos Específicos	24
2. Estado del Arte.....	25
2.1. Marco teórico	25
2.1.1. Pigmentos Naturales.	25
2.1.2. Factores que afectan la estabilidad de las Betalaínas.	28
2.1.3. Betalaínas: moléculas antioxidantes.	31
2.1.4. Técnicas de análisis.	32
2.1.4.4. Métodos para la Determinación de la actividad antioxidante y contenido Fenólico.	35
2.2. Marco Contextual	38
2.2.1. Cactáceas.	38
2.3. Antecedentes	41
3. Materiales y Métodos.....	46
3.1. Material Vegetal	46
3.1.1. Clasificación taxonómica.	46
3.1.2. Características del fruto.	46
3.2. Extracción de Betalaínas asistida por microondas	47
3.2.1. Ensayos preliminares para la determinación de la presencia de Betalaínas en las muestras.	47
3.3. Eliminación de hidrocoloides y proteínas	47
3.4. Cuantificación de Betalaínas	48
3.5. Separación de betacianinas y betaxantinas.....	49
3.6. Identificación de las betalaínas	51

3.7. Determinación de fenoles totales	51
3.8. Determinación de la capacidad Antioxidante.....	49
3.8.1. Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).	49
3.8.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	49
3.9. Estabilidad química de los extractos crudos (EC).....	52
3.10. Encapsulación de los extractos en maltodextrina.....	52
3.11. Ensayo de la estabilidad del extracto crudo encapsulado	53
3.12. Análisis Estadístico	53
4. Resultados y Discusión	53
4.1. Material Vegetal	53
4.1.1. Clasificación taxonómica.	53
4.1.2. Características del fruto.	53
4.2. Determinación de la presencia de Betalaínas en las muestras	54
4.3. Obtención del Extracto crudo y purificado de betalaínas	56
4.4. Cuantificación de Betalaínas.....	57
4.5. Separación de betacianinas y betaxantinas.....	59
4.6. Identificación de las betalaínas	59
4.7. Determinación de fenoles totales	68
4.8. Determinación de la capacidad Antioxidante.....	74
4.8.1. Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).	74
4.8.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	78
4.9. Estabilidad química de los extractos crudos (EC).....	82
4.10. Estabilidad de los Extractos crudos Encapsulados.....	87
Conclusiones	90
Recomendaciones	92

Referencias Bibliográficas	93
Anexos	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras de resonancia de la betalaina	26
Figura 2. Estructura química de las betalainas a) Ácido betalámico, b) Betaxantina, c) Betacianina.....	27
Figura 3. Esquema de biosíntesis de betalainas en plantas	28
Figura 4. Sitios propensos a la Degradación de betacianinas	29
Figura 5. Estructura del cromóforo ABTS.....	35
Figura 6. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante	36
Figura 7. <i>Opuntia stricta</i> Haw	40
Figura 8. <i>Opuntia elatior</i> Mill	41
Figura 9. Obtención del Extracto Crudo	47
Figura 10. Prueba Cualitativa para la presencia de Betalainas	55
Figura 11. Hidrólisis de Betalainas en medio básico	55
Figura 12. Espectros UV-Visible de los Extractos Crudos de los frutos de Opuntia	56
Figura 13. Perfil Cromatográfico a 538 nm del EPOS	60
Figura 14. Estructura de las Betacianinas identificadas en EPOS	61
Figura 15. Espectros UV-Vis de los picos cromatográficos del EPOS.	62
Figura 16. Perfil cromatográfico a 538 nm de la FR de <i>O. stricta</i>	63
Figura 17. Espectro UV-Vis de los picos 5 y 6 de FROS.....	63
Figura 18. Perfil cromatográfico a 480 nm de la FR de <i>O. stricta</i>	64
Figura 19. Estructura de la neobetanina, correspondiente al pico 7	64
Figura 20. Espectro cromatográfico del EPOE a 538 nm.....	65
Figura 21. Cromatograma de EPOE a 480 nm	66
Figura 22. Cromatograma a 538 de la FROE	67
Figura 23. Curva de calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales.	70
Figura 24. Diagrama de barras del contenido fenólico (mg AG/g Muestra) de extractos y fracciones obtenidos a partir de las tunas de dos variedades de cactus.	73
Figura 25. Curva de calibración con trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).	75
Figura 26. Diagrama de barras de la TEAC de extractos y fracciones obtenidos a partir de las tunas de dos variedades de cactus.	77

Figura 27. Gráfica de correlación la actividad antioxidante equivalente a Trolox y entre el contenido fenólico, en la especie <i>Opuntia stricta</i>	78
Figura 28. Curvas de Calibración para los extractos y fracciones de las dos especies	79
Figura 29. Diagrama de barras de valores de EC ₅₀ (ppm) de extractos y fracciones obtenidos a partir de <i>Opuntia stricta</i> y <i>Opuntia elatior</i>	81
Figura 30. Comportamiento Cinético del proceso de degradación de ECOS y ECOE.	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones preparadas para la cuantificación de betalainas de las dos especies	48
Tabla 2. Solventes utilizados como fase móvil en la cromatografía de columna con Silica C ₁₈ ..	50
Tabla 3. Características fisicoquímicas de los Frutos de <i>Opuntia</i>	54
Tabla 4. Absorbancias medidas a 538 nm para los EC y EP	57
Tabla 5. Contenido de Betacianinas para los EC y EP	57
Tabla 6. Compuestos identificados en la FROS a 538 nm	63
Tabla 7. Compuestos identificados en la FROE	67
Tabla 8. Compuestos identificados en las dos variedades de Cactus	68
Tabla 9. Resultados del método de Folin- Ciocalteu para los patrones de AG	69
Tabla 10. Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método Folin Ciocalteu ...	70
Tabla 11. Contenido de fenoles totales en los extractos y fracciones obtenidos de los frutos de las dos variedades de Cactus	70
Tabla 12. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones de <i>Opuntia stricta</i> (ECOS, EPOS, FAOS, BCOS).	72
Tabla 13. Contenido fenólico de extractos crudos en algunas especies del Género <i>Opuntia</i>	73
Tabla 14. Resultados del método de TEAC con patrones de Trolox	74
Tabla 15. Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método TEAC	75
Tabla 16. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox de los extractos y fracciones obtenidos de los frutos de las dos variedades de Cactus	76
Tabla 17. Valores TEAC para los Extractos crudos de los frutos de algunas variedades del Género <i>Opuntia</i>	77
Tabla 18. Parámetros estadísticos de las curvas de calibración para los extractos (EC y EP) y fracciones de las dos especies (FA y FR)	80
Tabla 19. EC ₅₀ de los extractos y las fracciones de las dos especies de cactus	80
Tabla 20. Contenido de BC, Contenido Fenólico Total y Actividad Antioxidante de Extractos y fracciones de las dos especies de <i>Opuntia</i>	81
Tabla 21. Parámetros Cinéticos de degradación de betacianinas para los extractos ECOS y ECOE a diferente pH.	83
Tabla 22. Contenido Fenólico y Actividad antioxidante de los ECOS almacenados	85
Tabla 23. Contenido Fenólico y Actividad antioxidante de los ECOE almacenados	85

Tabla 24. Contenido de BC, Contenido Fenólico Total y Actividad Antioxidante de Extractos y fracciones de las dos especies de <i>Opuntia</i>	88
--	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Coloración azul característica de la reacción de Folin Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico.....	103
Anexo B. Coloración azul característica de la reacción del radical ABTS con los antioxidantes	103
Anexo C. Carta del herbario	104
Anexo D. Tiempos de Retención de los patrones de Betalaínas.....	105
Anexo E. Espectros UV-Vis de los picos cromatográficos de la FROS.....	105
Anexo F. Espectro UV-Vis del pico 7 de la FROS.....	105
Anexo G. Espectros UV- Vis de los picos identificados en EPOE	106
Anexo H. Espectro UV-Vis del pico 7 del EPOE.....	106
Anexo I. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones de <i>Opuntia elatior</i> (ECOE, EPOE, FAOE, FROE).	106
Anexo J. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones de las dos variedades de cactus.....	106
Anexo K. Prueba de Múltiple Rangos para la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) en los extractos y fracciones de <i>Opuntia stricta</i> (ECOS, EPOS, FAOS, FROS).	107
Anexo L. Prueba de Múltiple Rangos para la TEAC en los extractos y fracciones de <i>Opuntia elatior</i> (ECOE, EPOE, FAOE, FROE).	107
Anexo M. Prueba de Múltiple Rangos para la TEAC en los extractos y fracciones de las dos variedades de cactus.....	107
Anexo N. Gráfica de correlación la actividad antioxidante equivalente a Trolox y entre el contenido fenólico, en la especie <i>Opuntia elatior</i>	108
Anexo O. Prueba de Múltiple Rangos para la Actividad Antioxidante por el método de DPPH en los extractos y fracciones de <i>Opuntia stricta</i> (ECOS, EPOS, FAOS, FROS).	108
Anexo P. Prueba de Múltiple Rangos para la Actividad Antioxidante por el método de DPPH en los extractos y fracciones de <i>Opuntia elatior</i> (ECOE, EPOE, FAOE, FROE).	109
Anexo Q. Prueba de Múltiple Rangos para la Actividad Antioxidante por el método de DPPH en los extractos y fracciones de las dos variedades de cactus.	109
Anexo R. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido de BC en el ECOS almacenado.	109

Anexo S. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en el ECOS almacenado.	110
Anexo T. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el TEAC del ECOS almacenado.	111
Anexo U. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante por el método de DPPH del ECOS almacenado.	111
Anexo V. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido de BC en el ECOE almacenado.	112
Anexo W. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en el ECOE almacenado.	113
Anexo X. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el TEAC del ECOS almacenado.	113
Anexo Y. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante por el método de DPPH del ECOS almacenado.	114

GLOSARIO

ANTIOXIDANTE: Compuesto que inhibe o retrasa la oxidación de los sustratos, incluso si el compuesto está presente en una concentración significativamente menor que el sustrato oxidado.

BETALAÍNAS: Pigmentos hidrosolubles, que contienen nitrógeno y que son derivados del ácido betalámico, responsables de la coloración amarilla y roja-violeta. Son de dos tipos: betaxantinas y betacianinas.

BETACIANINAS: Pigmentos tipo Betalaínas, de color rojo-violeta, formados por la conjugación del ácido betalámico con el ciclo DOPA.

BETAXANTINAS: Pigmentos betaláinicos con color característico amarillo- naranja, lo cuales contienen ácido betalámico conjugado con aminas o aminoácidos.

CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA: Técnica de separación donde la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar. Los solutos no polares tienden a adsorberse en la fase estacionaria y se mueven a través del sistema más lentamente que los solutos polares.

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

EFECTO BATOCRÓMICO: También conocido como desplazamiento rojo, corresponde al cambio de un máximo de absorción a una longitud de onda mayor debido a la presencia de un auxocromo, o efecto solvente.

EFECTO HIPOCRÓMICO: Efecto que conduce a la disminución en la intensidad de absorción.

EFECTO HIPSOCRÓMICO: también conocido como desplazamiento azul, corresponde al cambio de un máximo de absorción a una longitud de onda menor. Este es causado por la eliminación de la conjugación o el cambio en la polaridad del solvente.

FITOQUÍMICO: término que se refiere a una variedad de compuestos derivados de plantas con actividades terapéuticas tales como propiedades anticancerígenas, antimutagénicas, antiinflamatorias y antioxidantes; sin embargo, son considerados como nutrientes no esenciales.

IN VITRO: se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

ISÓMEROS: Compuestos que tienen la misma fórmula molecular pero diferente fórmula estructural.

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

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

RADICAL LIBRE: átomo o molécula que contiene al menos un electrón no apareado, caracterizada por su elevada reactividad.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Absorbancia
ABTS	Ácido 2,2 azino-bis-(3-etilbenzotiazolil)-6-sulfónico
AG	Ácido gálico
A _w	Actividad de agua
BC	Betacianinas
BX	Betaxantinas
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAM	Extracción Asistida por Microondas
EC ₅₀	Concentración de antioxidante necesario para disminuir la concentración de DPPH* en un 50%
ECOE	Extracto Crudo <i>Opuntia elatior</i>
ECOS	Extracto Crudo <i>Opuntia stricta</i>
EEOE	Extracto Encapsulado <i>Opuntia elatior</i>
EEOS	Extracto Encapsulado <i>Opuntia stricta</i>
EPOE	Extracto Purificado <i>Opuntia elatior</i>
EPOS	Extracto Purificado <i>Opuntia stricta</i>
FAOS	Fracción Amarilla <i>Opuntia stricta</i>
FAOE	Fracción Amarilla <i>Opuntia elatior</i>
FROS	Fracción Roja <i>Opuntia stricta</i>
FROE	Fracción Roja <i>Opuntia elatior</i>
K	Constante de velocidad
Min	minutos

TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
t_R	Tiempo de retención
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
UV-Vis	Ultravioleta- Visible
λ	Longitud de onda

INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria las características organolépticas tienen un impacto significativo en la selección y aceptación de los alimentos (Martins, Roriz, Morales, Barros, & Ferreira, 2017), junto con el sabor y la textura, investigadores de la industria alimentaria consideran que el color es un factor importante de calidad, de hecho, podría ser el más importante de los tres: "Si no tienes el color correcto, creo que puedes olvidarte de los otros dos", dice Jack Francis, científico de alimentos de la Univ. de Massachusetts (Burrows, 2009). Es por esto que a lo largo del tiempo se han usado diferentes colorantes sintéticos, entre los más utilizados se encuentran los colorantes derivados de alquitrán de hulla, sin embargo, estos colorantes han llamado la atención debido a sus posibles efectos adversos en la salud humana, por ejemplo, desde 1979 más de 700 colorantes sintéticos han sido prohibidos para su uso en alimentos y cosméticos por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y hoy en día la FDA permite el uso general de solo 36 colorantes en alimentos y cosméticos (7 colorantes sintéticos y 26 naturales); del mismo modo, en 1994 la Unión Europea autorizó el uso de solo 43 colorantes como aditivos alimentarios (17 materiales sintéticos, 13 colorantes naturales y 13 "naturalmente idénticos") (Georgiev, Ilieva, Bley, & Pavlov, 2008) lo anterior debido a que están posiblemente asociados con el desarrollo del Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) principalmente en niños susceptibles (Arnold, Lofthouse, & Hurt, 2012).

Considerando su posible toxicidad, Instituciones como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, ordenó que todos los productos que contuvieran dentro de sus aditivos colorantes artificiales deberían mostrar en su etiqueta: "puede tener efectos en la actividad y atención de los niños" (Kanarek, 2011), realizando el llamado para que sean los consumidores quienes decidan si adquieren o no el producto.

Adicionalmente, se ha incrementado la demanda de colorantes alimentarios naturales, provocada por una demanda general entre los consumidores de productos "totalmente naturales" (Burrows, 2009), esto ha generado un aumento considerable en la investigación de nuevas fuentes de colorantes naturales. Entre los pigmentos naturales reconocidos están las clorofilas, carotenos, antocianinas y betalaínas, siendo estas últimas las menos estudiadas y las que son objeto de investigación en este trabajo.

Las betalaínas son compuestos nitrogenados hidrosolubles derivados del ácido betalámico, que presentan una ventaja sobre las antocianinas debido a su estabilidad superior como colorantes naturales a pH 4-7. También se sabe que mejoran el valor estético de los alimentos y contribuyen a la salud y el bienestar de los consumidores por su capacidad antioxidante (Bhupinder, Singh & Bahadur, 2014) y por sus comprobados beneficios para la salud humana (S. Chauhan, Sheth, Jivani, Rathod, & Shah, 2010; Gandía-Herrero, Jiménez-Atiénzar, Cabanes, García-Carmona, & Escribano, 2010). Hoy en día, el colorante rojo para alimentos conocido como "betanina o E-162", extraído de la remolacha roja es el principal representante de este tipo de pigmentos, y así se comercializa en la Unión Europea y los Estados Unidos (Choo, 2018). Aunque la remolacha es la principal fuente comercial de betalaínas, su atractivo es limitado por presentar un sabor desagradable debido a la presencia de geosmina y 3-alquil-2-metoxipirazinas (3-sec-butil-, 3-isobutil y la 3-isopropil-2-metoxipirazina) (Castellanos- Santiago & Yahia, 2008; Esatbeyoglu, Wagner, Schini-Kerth, & Rimbach, 2015) las cuales afectan negativamente la aceptación sensorial, también presenta altas concentraciones de nitratos que están asociados con la formación de nitrosaminas cancerígenas (Rodríguez-Sánchez, Cruz, & Barragán-huerta, 2017). Razón por la cual están siendo estudiadas nuevas fuentes de Betalaínas, entre ellas las que se encuentran en la familia Cactaceae del género *Opuntia*. El uso de frutos de *Opuntia* como colorantes tiene varias ventajas, como olor y / o sabor neutros, bajo contenido de nitratos, una amplia gama de colores y representa un menor riesgo de transferencia microbiológica (Choo, 2018), además de que tienen mínimos requerimientos de suelo y agua, lo que significaría una alternativa para la agricultura de regiones áridas y semiáridas (R. Castellar, Obón, Alacid, & Fernández-López, 2003); adicionalmente el consumo de sus frutas está involucrado en mantener el equilibrio redox del cuerpo, disminuir el daño oxidativo, mejorar el estado antioxidante en los humanos (Gandía-Herrero et al., 2010) y poseer actividad analgésica, antiinflamatoria, anticancerígena, antidiabética, entre otras (S. Chauhan, Sheth, Jivani, Rathod, & Shah, 2010)

En el departamento de Santander se han encontrado dos especies de cactáceas *Opuntia stricta* Haw y *Opuntia elatior* Mill, las cuales son subexplotadas; sin embargo la información generada en el presente trabajo amplió su conocimiento en cuanto a composición química, propiedades bioactivas y 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 aporta a la salud humana mencionado anteriormente.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo General

Estudiar la composición, actividad antioxidante y estabilidad de los pigmentos tipo betalainas aislados del fruto de dos especies de cactus: *Opuntia stricta* Haw y *Opuntia elatior* Mill.

1.2. Objetivos Específicos

- Separar e identificar las betalainas presentes en dos especies de cactus utilizando diferentes técnicas cromatográficas (cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficiencia, HPLC)
- Cuantificar las betacianinas y betaxantinas aisladas de los frutos de las cactáceas mediante espectroscopia UV-VIS.
- Determinar la estabilidad química a los cambios de pH y tiempo de almacenamiento de los extractos crudos y sus microencapsulados.
- Determinar el contenido fenólico total y la capacidad antioxidante (métodos TEAC y DPPH) del extracto crudo y el microencapsulado.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1. Marco teórico

2.1.1. Pigmentos Naturales.

Los pigmentos son compuestos químicos que absorben la luz en el rango de longitud de onda de la región visible, el color producido se debe a una estructura específica de la molécula (cromóforo); esta estructura captura la energía y se produce la excitación de un electrón de un orbital externo a un orbital superior; la energía no absorbida es reflejada y / o refractada para ser capturada por el ojo y los impulsos neurales generados se transmiten al cerebro, donde podrían interpretarse como un color. Los pigmentos naturales son producidos por organismos vivos tales como plantas, animales, hongos y microorganismos (Delgado-Vargas, Jimenez, & Paredes-López, 2000). En la naturaleza se destacan 4 tipos de pigmentos naturales: liposolubles como carotenoides (amarillo, naranja y rojo) y clorofilas (verde), e hidrosolubles como antocianinas (rojo, azul y púrpura) y betalaínas (rojo y amarillo) (Rodriguez-Amaya, 2016). Mientras las dos primeras categorías se depositan en plástidos en células vegetales, las dos últimas se localizan en las vacuolas (Fathordoobady, Mirhosseini, Selamat, & Manap, 2016). Se han realizado varios estudios sobre las propiedades bioactivas de dichos pigmentos, especialmente de los carotenoides y antocianinas, enfocándose principalmente en sus propiedades antioxidantes. Sin embargo la relativa escasez de las betalaínas en la naturaleza, han dificultado su estudio como compuestos bioactivos (Azeredo, 2009). A continuación, se realiza la descripción de los pigmentos de estudio, Betalaínas:

2.1.1.1. Betalaínas.

Son compuestos nitrogenados hidrosolubles que pueden ser de dos tipos, betacianinas y betaxantinas dependiendo de la identidad de los sustituyentes R_1 y R_2 (figura 1). El término "betalaína" fue introducido por primera vez por Mabry y Dreiding (1968), estas son derivados iminio del ácido betalámico que se basan en el sistema protonado 1,2,4,7,7-pentasustituido 1,7-diazaheptametinamino, el color de las betalaínas se atribuye a la resonancia de los dobles enlaces de este sistema (Choo, 2018).

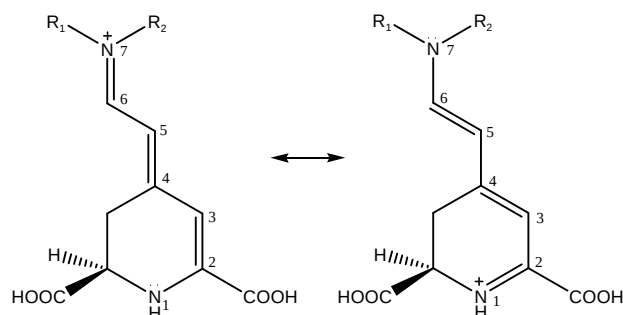


Figura 1. Estructuras de resonancia de la betalaína. Modificado de:: Choo (2018)

Estructuralmente, las betalaínas son derivados del ácido betalámico (figura 2a), las betaxantinas (BX) (Latín: beta = remolacha, Griego: xanthos = amarillo) (figura 2b) son productos de condensación de ácido betalámico y aminoácidos o aminas. Dependiendo de la estructura particular del compuesto amino, la absorción máxima de betaxantinas varía entre 460 y 480 nm (Strack, Vogt, & Schliemann, 2003). Las betaxantinas más comunes y frecuentemente tratadas son la glutamina-betaxantina (vulgaxantina I), la betaxantina principal en la remolacha roja (*Betavulgaris* L.) y la indicaxantina (prolina-betaxantina) el pigmento predominante en las peras de cactus amarillas (*Opuntia* spp.)(Herbach, Stintzing, & Carle, 2006)

Por otro lado, los productos de condensación de ácido betalámico y ciclo-Dopa [ciclo-3- (3,4-dihidroxifenilalanina)] se conocen comúnmente como betacianinas (BC) (figura 2c) debido a su color violeta intenso (en griego: kyaneos = azul). Su fuerte cambio batocrómico de 50 a 70 nm en comparación con las betaxantinas se debe a la conjugación de los dobles enlaces del anillo aromático del ciclo-DOPA, extendiendo el sistema electrónico de resonancia. La gran variedad de betacianinas existentes se obtienen por la glicosilación de uno de sus grupos hidroxilos localizados en las posiciones 5 y 6 de la betanidina (aglicona de las BC) lo que causa además un desplazamiento hipsocrómico; la acilación del glicósido resultante produce un desplazamiento batocrómico, si esta se da con ácidos aromáticos y la esterificación con ácidos alifáticos tiene pocos efectos en el máximo de absorción de las betacianinas (M. R. Castellar, Obón, & Fernández-López, 2006; Rodríguez-Amaya, 2018). Se ha encontrado que las betacianinas son principalmente 5-O-glucosiladas (por ejemplo, la betanina), raramente 6-O-glucosiladas (por ejemplo, la gomphrenina II), pero nunca están glucosiladas en las dos posiciones. Las betacianinas se clasifican en 4 grupos: tipo-betanina, tipo-amarantina, tipo-gomphrenina y tipo-2-descarboxibetanina (Delgado-Vargas et al., 2000; Esatbeyoglu et al., 2015)

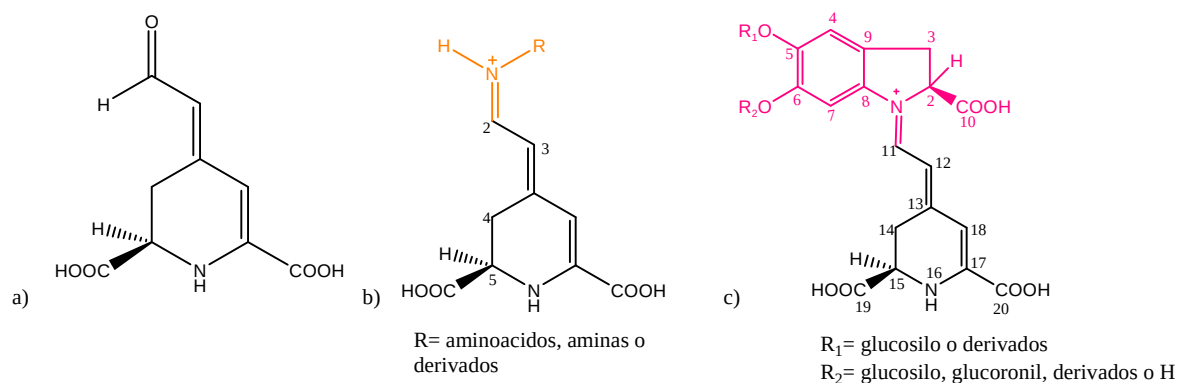


Figura 2. Estructura química de las betalainas a) Ácido betalámico, b) Betaxantina, c)

Betacianina. Modificado de: Herbach et al., (2006) y Rodríguez-Amaya (2018)

Las betalainas tienen importancia quimiotaxonómica típicamente asociadas a plantas del orden de Caryophyllales (R. Castellar et al., 2003), en el cual se encuentran familias como Achatocarpaceae, Aizoaceae, Amaranthaceae, Basellaceae, Cactaceae, Chenopodiaceae, Didiereaceae, Halophytaceae, Hectorellaceae, Nyctaginaceae, Phytolaccaceae, Portulacaceae, y Stegnospermataceae, solo dos familias de las Caryophyllales, las Caryophyllaceae and Molluginaceae producen antocianinas, las betalainas también se encuentran en algunos hongos superiores, pertenecientes a los géneros *Amanita*, *Hygrocybe* e *Hygrosporus* (Delgado-Vargas et al., 2000; Georgiev et al., 2008). Hasta la fecha, se han identificado 51 estructuras diferentes de betacianinas y 23 estructuras de betaxantinas (Choo, 2018).

La biosíntesis de betalainas (Figura 3) comienza con el aminoácido L- tirosina y continúa a través de dos vías independientes desde L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina). En el primer paso, la tirosina se hidroxila a L-DOPA catalizada por la tirosinasa, que es una enzima bifuncional polifenoloxidasas que contiene cobre; esta enzima también participa en la oxidación de L-DOPA a dopaquinona. Posteriormente, la dopaquinona sufre un proceso de ciclación que conduce a la formación de ciclo-DOPA, esta ciclación también es posible partiendo de L-DOPA por medio del citocromo P450 (CYP76AD1). Del mismo modo ocurren otras reacciones análogas, catalizadas por la DOPA-4,5-dioxigenasa, que escinde el anillo de L-DOPA entre los carbonos 4 y 5, formando así un intermediario inestable, el 4,5-seco-DOPA, debido a la condensación intramolecular espontánea entre el grupo amino y el grupo aldehído de éste se forma el ácido betalámico. Las siguientes condensaciones, como el ácido betalámico con ciclo-DOPA conduce a la formación de betacianinas (pigmentos de betanidina), y la condensación del

ácido betalámico con diferentes aminoácidos o aminas, conduce a la formación de betaxantinas. Por lo tanto, el ácido betalámico que se origina a través de 4,5-seco -DOPA, puede ser considerado el precursor biosintético de la producción de betalaínas (Esatbeyoglu et al., 2015; Martins et al., 2017)

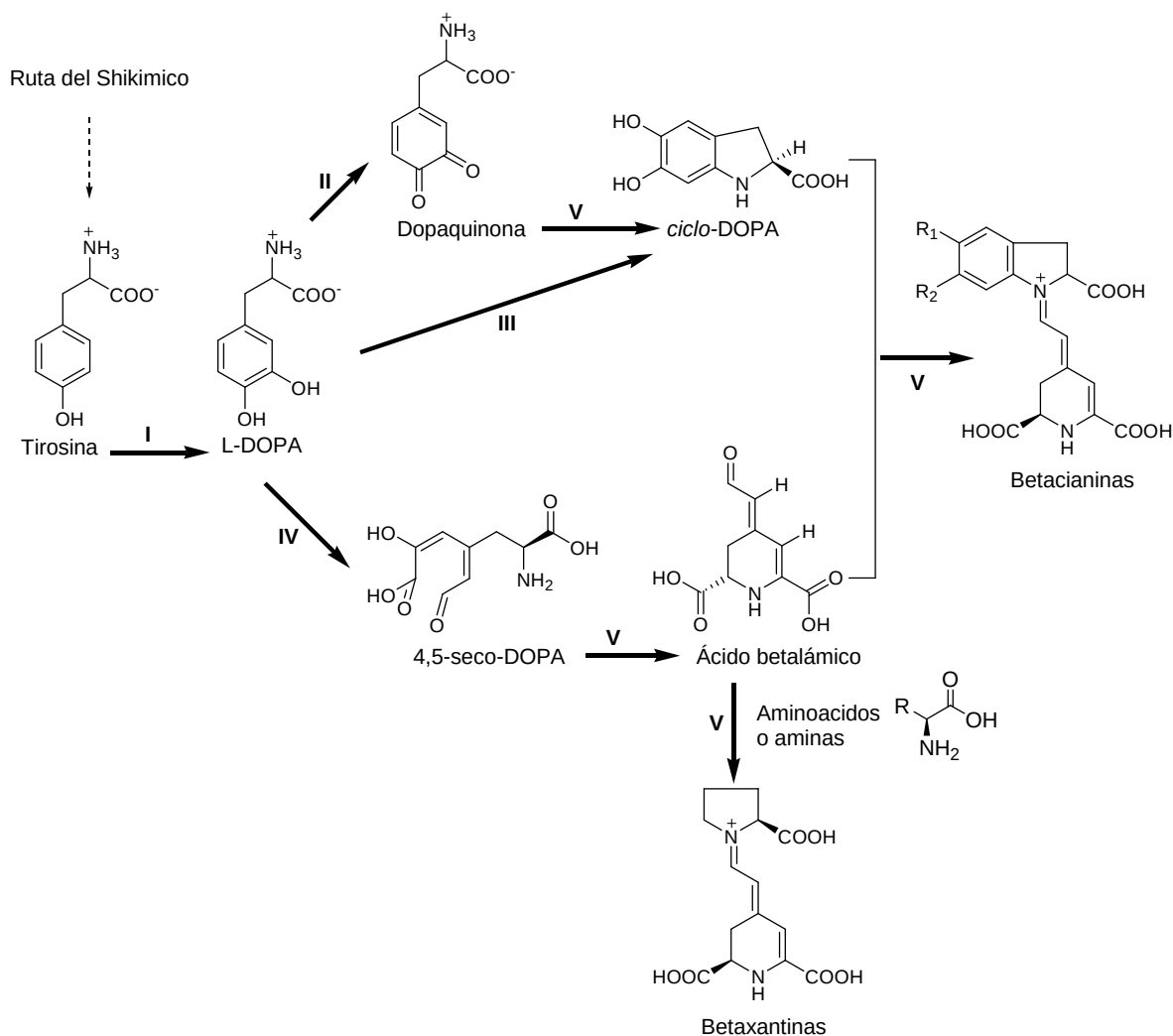


Figura 3. Esquema de biosíntesis de betalaínas en plantas

*I tirosina hidroxilasa, II tirosina en presencia de O_2 , III citocromo P450 (CYP76AD1, IV DOPA-4,5-dioxigenasa, V reacción espontánea. Modificado de: Esatbeyoglu et al. (2015) y Martins et al., (2017)

2.1.2. Factores que afectan la estabilidad de las Betalaínas.

La estabilidad de las betalaínas se ve afectada principalmente en sus características estructurales, dentro de los posibles cambios están la degradación del enlace aldimina, la deshidrogenación, la

desglucosilación, la descarboxilación y la isomerización (Figura 4) (Manchali, Murthy, Nagaraju, & Neelwarne, 2013; Khan, 2016); entre los factores que pueden afectarlas están el pH, la temperatura, la luz, la actividad de agua (a_w) y la presencia de oxígeno (R. Castellar et al., 2003)

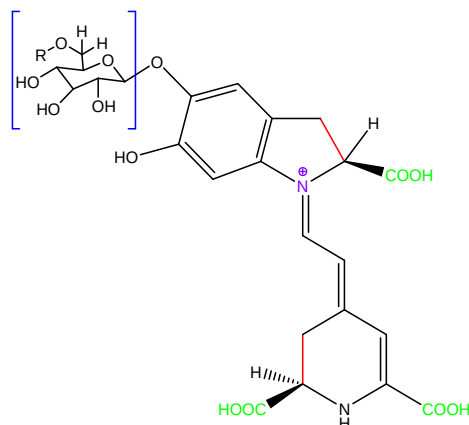


Figura 4. Sitios propensos a la Degradación de betacianinas.

Desglucosilación (corchetes azules), descarboxilación (verde), deshidrogenación (rojo) y ataque nucleofílico (morado). Modificado de: Manchali et al., (2013) y Khan (2016).

2.1.2.1. El pH

Las betalaínas son relativamente estables a lo largo de un amplio rango de pH que va desde 3 a 7 sin que experimenten cambio de coloración. Las soluciones de betalaínas en este intervalo de pH muestran un espectro de absorción en el rango visible similar para betacianinas y betaxantinas con longitudes de onda de máxima absorbancia entre 537 y 538 nm para betacianinas y aproximadamente a 475 nm para betaxantinas (Azeredo, 2009).

A condiciones alcalinas, se rompe el enlace aldimina por hidrólisis y la longitud de onda cambia a un valor más elevado presentándose un desplazamiento batocrómico, mientras que a pH ácido (menor que 3), se induce la recondensación del ácido betalámico y los compuestos amino (betaxantinas) o el ciclo- DOPA 5-O- β -glucósido (betacianinas) por lo cual la longitud de onda presenta un desplazamiento hipsocrómico. También como efecto de la degradación del pigmento se ha observado disminución en la intensidad del máximo de absorción (efecto hipocrómico). El pH óptimo para una máxima estabilidad de la betanina está entre 5-6 (Huang & Von Elbe, 1987; Delgado-Vargas et al., 2000)

Además que el pH que confiere estabilidad máxima a la betalaína podría verse influenciado por la temperatura y la concentración de oxígeno en el medio, también que depende de la matriz alimentaria como evidencia de los efectos combinados de pH (3-7) y temperatura (25-80°C) (Rodríguez-Sánchez et al., 2017)

2.1.2.2. Temperatura.

Puede ser considerada como el factor que más afecta la estabilidad de las betalaínas tanto en su procesamiento como en su almacenamiento (Sáenz, Cancino, & Robert, 2012)

La degradación térmica ha sido estudiada por varios autores (Von Elbe, Maing, & Amundson, 1974; Huang & Von Elbe, 1987; Delgado-Vargas et al., 2000) 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 betanina en presencia de oxígeno sigue una cinética de primer orden, 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-glucosido como productos intermediarios; sin embargo, esta reacción es parcialmente reversible dependiendo del pH (Herbach et al., 2006)

2.1.2.3. Luz.

Las Betalaínas son sensibles a la luz y tienden a degradarse debido a la absorción de ésta en la región visible y ultravioleta. Este fenómeno produce una excitación de los electrones π del cromóforo de las betalaínas a estados de mayor energía, por lo cual la energía de activación de las moléculas disminuye, lo que genera una rápida degradación de los pigmentos (Harivaindaran, Rebecca, & Chandran, 2008; Martins et al., 2017).

Von Elbe, Maing, & Amundson (1974) y Cai, Sun, Wu, Huang, & Corke (1998), reportaron que las betalaínas experimentan un índice de degradación de 15,6% a causa de la exposición a la luz. 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 & Von Elbe, 1985).

2.1.2.4. Actividad de agua (a_w).

La actividad de agua 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 las betalaínas puede ser atribuido a una movilidad reducida de los reactivos o a la limitada solubilidad de oxígeno, lo que aumenta la desestabilización (Delgado-Vargas et al., 2000)

2.1.2.5. Oxígeno.

Las betalaínas reaccionan con oxígeno molecular. El almacenamiento de soluciones de betanina bajo niveles bajos de oxígeno resulta en una menor degradación del pigmento que en la atmósfera, ya que los bajos niveles de oxígeno favorecen que el pigmento se recupere parcialmente después de la degradación. Una desviación de la cinética de degradación de primer orden de betanina en ausencia de oxígeno se atribuyó a la reversibilidad de la reacción y por tanto se dice que la estabilidad de la betanina mejora con antioxidantes o con una atmósfera de nitrógeno (Azeredo, 2009)

2.1.3. Betalaínas: moléculas antioxidantes.

Un antioxidante es un compuesto que inhibe o retrasa la oxidación de los sustratos, incluso si el compuesto está presente en una concentración significativamente menor que el sustrato oxidado. La eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es uno de los posibles mecanismos de acción, otros incluyen la prevención de la formación de ROS mediante la unión de metales o la inhibición de enzimas. Los antioxidantes que rompen cadenas evitan el daño al interferir con las cascadas de propagación de radicales libres. Los compuestos antioxidantes se pueden reciclar en la célula o se dañan irreversiblemente, pero sus productos de oxidación son menos dañinos o se pueden convertir en sustancias inocuas (Matkowski, 2008)

Dentro de los compuestos antioxidantes se encuentran las betalaínas, las cuales presentan una estructura con un nitrógeno positivo en un sistema de polieno. Su amina cíclica, que es similar a la de la etoxiquina antioxidante, ha sido considerada razonablemente como el grupo reactivo que confiere a esta clase de moléculas propiedades reductoras. Por lo tanto, estos fitoquímicos (betacianinas y betaxantinas) tienen un grupo fenólico y un grupo de aminas acíclicas, que son excelentes donantes de electrones y son capaces de estabilizar los radicales (Kanner, Harel, &

Granit, 2001; Moreno, García-Viguera, Gil, & Gil-Izquierdo, 2008). Las propiedades antioxidantes de las betalaínas incrementan con el número de grupos hidroxilo e imino, por otro lado, la glicosilación de estas reduce su actividad antioxidante, la posición de la glicosilación también afecta la actividad antioxidante, las betacianinas 5-O-glicosiladas muestran menos actividad que las betacianinas 6-O-glicosiladas (Esatbeyoglu et al., 2015)

La actividad antioxidante de las betalaínas ha sido estudiada en modelos químicos y biológicos, en estudios de Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) las betalaínas de la remolacha roja presentaron una actividad antioxidante 1,5- 2 veces mayor que las antocianinas cianidina-3-O- glucosido y cianidina, a pH 4; mientras que a pH 7,4 el ensayo de TEAC y DPPH para la betanina presentó una actividad antioxidante cerca de 7,5 y 3 veces mayor que vitamina C, respectivamente (Gengatharan, Dykes, & Choo, 2015)

2.1.4. Técnicas de análisis.

2.1.4.1. *Extracción asistida por microondas*

Los fundamentos del proceso de extracción por microondas son diferentes a los métodos convencionales (sólido-líquido o simplemente extracción) porque la extracción se produce como resultado de cambios en la estructura celular causados por las ondas electromagnéticas. Comparado con los métodos de extracción tradicional, la extracción asistida por microondas (MAE por sus siglas en inglés) requiere menor tiempo de procesamiento y una menor demanda de solventes y energía, lo que resulta en mayores rendimientos de extracción (Cardoso-Ugarte, Sosa-Morales, Ballard, Liceaga, & San Martín-González, 2014) , que pueden ser el resultado de una combinación sinérgica de dos fenómenos de transporte: gradientes de masa y calor que funcionan en la misma dirección. En el MAE el calor se disipa volumétricamente dentro del medio irradiado y la transferencia de masa ocurre desde el interior del sólido hacia el exterior.(Veggi, Martinez, & Meireles, 2013)

Las microondas son ondas electromagnéticas con un rango de frecuencia de 0.1-3 GHz. Las microondas comprenden campos eléctricos y magnéticos en la propagación de la energía electromagnética, que actúa como una radiación no ionizante que causa movimientos moleculares de los iones y la rotación de los dipolos, pero no afecta la estructura molecular cuando se colocan materiales dieléctricos que contienen dipolos permanentes o inducidos en un campo de microondas, la rotación de los dipolos en el campo alterno produce calor. El campo de

microondas aplicado hace que las moléculas, en promedio, pasen un poco más de tiempo orientándose en la dirección del campo eléctrico que en otras direcciones. Cuando se elimina el campo eléctrico, la agitación térmica devuelve las moléculas a un estado desordenado en el tiempo de relajación y se libera energía térmica. Por lo tanto, el calentamiento de microondas resulta de la disipación de las ondas electromagnéticas en el medio irradiado. La potencia disipada en el medio depende de la complejidad del material y de la intensidad de campo eléctrico local promediada en el tiempo. (Chemat, Fabiano-Tixier, Abert, Tamara, & Vorobiev, 2015; Bastos & Goncalves, 2017)

2.1.4.2. 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 (BX: 470-480 nm y BC: 538-540 nm). Las absorbancias que se determinan en soluciones del extracto obtenido a las longitudes de onda señaladas deben ser menores que 1. El contenido de betalaínas se calcula por medio de la siguiente ecuación:

$$B \left[\frac{mg}{l} \right] = \frac{A \times DF \times MW \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (1)$$

Donde A es la absorción a 538 nm y 480 nm para betacianinas y betaxantinas, respectivamente. DF es el factor de dilución y L la longitud de trayectoria de la cubeta de 1 cm. MW y ϵ , los pesos moleculares y coeficientes de extinción de los compuestos representativos: betanina e indicaxantina. Para betanina ($MW = 550 \frac{g}{mol}$, $\epsilon = 60000 \frac{l}{mol \cdot cm}$ en H_2O ; $\lambda = 538 nm$;) e indicaxantina ($MV = 308 \frac{g}{mol}$, $\epsilon = 48000 \frac{l}{mol \cdot cm}$ en H_2O ; $\lambda = 480 nm$.) (F. Stintzing, Schieber, & Carle, 2003)

2.1.4.3. Separación y Purificación.

La extracción de pigmentos naturales muchas veces implica la co-extracción de compuestos como azúcares, proteínas, entre otros; por lo que se requieren procesos posteriores de purificación, por ejemplo, las proteínas e hidrocoloides (mucílagos) pueden ser eliminados a través de precipitación etanólica (F C Stintzing, Schieber, & Carle, 2002).

Para la separación de betalaínas se han usado diferentes técnicas cromatográficas entre ellas la cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficiencia. Para la cromatografía en columna (CC) se han utilizado varios tipos de resinas o soportes no sólo para la purificación sino también para la separación. Sanchez-Gonzalez, Jaime-Fonseca, Martin-Martinez, & Zepeda (2013) utilizaron Amberlita XAD-7 para eliminar proteínas, mucílagos, pectinas y solutos de bajo peso molecular; y Sephadex G-25 para fraccionar las mezclas de polisacáridos, polipéptidos, proteínas globulares y ácidos nucleicos; a su vez fraccionaron las betalaínas. Mientras que F C Stintzing et al., (2002) utilizó Amberlita XAD-16 HP y cartuchos de C₁₈ para la semi-purificación y concentración de los extractos betalaínicos, incluyendo la separación de betaxantinas y betacianinas utilizando las características de retención dependientes del pH.

Por otra parte, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es ampliamente utilizada en el estudio de betalaínas porque al estar acoplada a DAD (detector de arreglo de diodos), MS (espectrometría de masas) y/o NMR (resonancia magnética nuclear) la separación e identificación pueden llevarse a cabo simultáneamente. Generalmente se utilizan soportes de fase reversa (columnas C₁₈ o C₈) y con tamaños de partícula entre 3 y 10 µm; éste tipo de columnas están compuestas por partículas de sílice a las cuales se unen cadenas alifáticas de octadecil-silano (Technologies, 2007) al ser ésta columna apolar los compuestos más polares eluirán rápidamente mientras que los menos polares presentaran mayores tiempos de retención.

La separación de los pigmentos, a escala analítica y semi-preparativa, se favorece utilizando solventes que consisten en mezclas de agua-metanol o agua-acetonitrilo acidificadas con ácido acético, fórmico o fosfórico (Cai, Sun, & Corke, 2005). La presencia de BX y BC se monitorea principalmente alrededor de 480 y 540 nm, respectivamente. Los espectros de absorción en el rango visible y UV-Vis proporcionan información estructural básica del tipo de betalaína y sus posibles sustituciones. En general, en HPLC fase reversa, las BX eluyen más rápido que las BC (J. A. Fernández-López, Castellar, Obón, & Almela, 2002) debido a la mayor polaridad presentada por las primeras, lo que hace que no sean retenidas por la columna apolar, mientras que las BC al ser ligeramente menos polares son retenidas y para eluirlas es necesario cambiar de solvente.

2.1.4.4. Métodos para la Determinación de la actividad antioxidante y contenido Fenólico.

Método TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox): El cromóforo ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6- sulfónico) (figura 5) presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm. El radical ABTS^{•+} es generado químicamente por la oxidación del ABTS con persulfato de potasio, el cual 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.

La adición de antioxidantes al catión radical preformado lo reduce en un periodo de tiempo (reducción que se observa en la decoloración del radical lo cual es medido espectrofotométricamente) dependiendo de la actividad antioxidante, la concentración del antioxidante y la duración de la reacción. Así, la extensión de la decoloración como porcentaje de inhibición del catión radical ABTS^{•+} se determina en función de la concentración y el tiempo y se calcula con relación a la reactividad de Trolox como estándar, en las mismas condiciones.

Una de las principales ventajas del uso de éste radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos y es químicamente estable. 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 (Miller & Rice-Evans, 1996; Re et al., 1999; Prior, Wu, & Schaich, 2005)

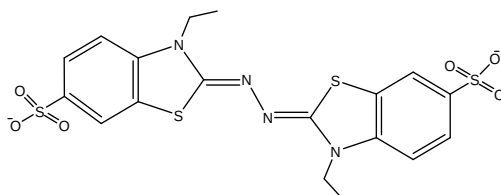


Figura 5. Estructura del cromóforo ABTS. Tomado de Prior, Wu, & Schaich, (2005).

Método del DPPH: El método se basa en el trabajo de Brand-Williams y colaboradores (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995) quienes evaluaron la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH[•]) en una solución etanólica. 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 reacción (figura 6)

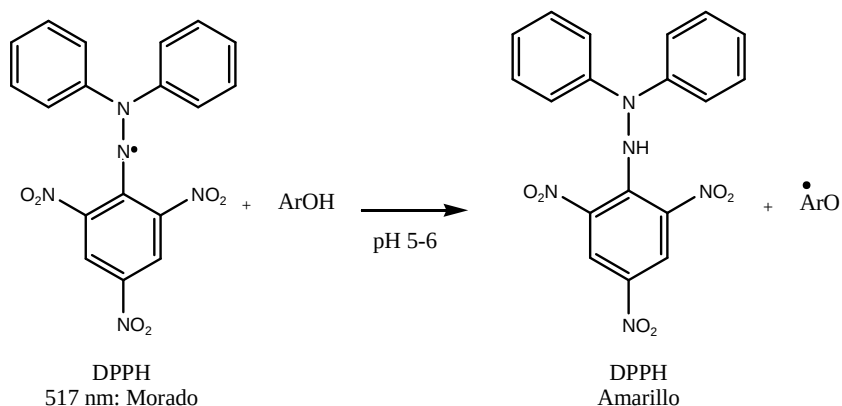
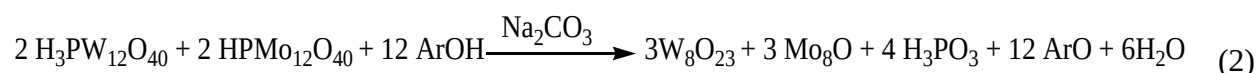


Figura 6. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante. Modificado de: Brand-Wiliams et al., (1995) y Molyneux, (2004)

Donde ArOH, es un antioxidante que actúa como antirradical donando radicales hidrógenos, dando como resultados 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 medios orgánicos y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH. 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. 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 (Molyneux, 2004; Prior et al., 2005)

Determinación de fenoles Totales: El método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN y CIOCALTEAU (FC) (Folin & Ciocalteu, 1927), para la determinación de fenoles totales, se

fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) (Ecuación 2). La absorbancia del color azul producido se mide a 765 nm, la concentración de compuestos fenólicos es proporcional a la intensidad de la luz absorbida a esa longitud de onda. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de pulpa de frutos (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-filho, & Fett, 2005)



El ensayo de FC se ha usado tradicionalmente como una medida de compuestos fenólicos totales en vegetales y frutas. Sin embargo, sustancias orgánicas e inorgánicas no fenólicas adicionales en extractos crudos también pueden reaccionar con el reactivo FC y dar concentraciones fenólicas aparentes elevadas. Recientemente se ha sugerido que, a menos que se pueda eliminar la interferencia, los resultados obtenidos por este método deben mencionarse como capacidad de reducción de FC en lugar de compuestos fenólicos totales (Rodríguez-Sánchez et al., 2017)

2.1.4.5. Encapsulación.

La encapsulación es una manera de estabilizar, proteger y extender la vida media de compuestos sensibles como fitoquímicos por ejemplo, los polifenoles o betalainas; este proceso tiene múltiples aplicaciones en la industria alimenticia, tales como la liberación controlada, entrega y enmascaramiento de sabores, colores y olores (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Osorio, & Nazareno, 2016). Como agentes encapsulantes se han usado carbohidratos, derivados semi-sintéticos de celulosa y polímeros sintéticos, estos han exhibido diferencias en sus propiedades, costos y eficacia de encapsulación. Como aditivos para obtener polvos de jugos frutales principalmente se han usado productos parcialmente hidrolizados del almidón, estos polímeros blancos de L-glucosa presentan un sabor natural, son inodoros y son fácilmente digeridos por humanos (Otálora, Carriazo, Iturriaga, Nazareno, & Osorio, 2015)

El secado por aspersión es uno de los métodos de encapsulación más utilizados, el proceso implica la mezcla del material del núcleo con un material de pared / revestimiento. La mezcla homogeneizada de material de núcleo y material de pared se alimenta a un secador por pulverización. A través de una boquilla, se rocían gotitas atomizadas, el agua en las gotitas se

evapora mediante la circulación de aire caliente y se obtienen cápsulas esféricas con un rango de tamaño medio de 10 a 100 μm (Khan, 2016). Debido a su alta solubilidad en agua se utilizó maltodextrina como agente encapsulante, ésta se obtiene de la hidrólisis ácida de diferentes fuentes de almidón (maíz, papa entre otros); (Robert, Torres, García, Vergara, & Sáenz, 2015; Parra, 2010)

La recuperación de betacianinas en el secado por pulverización está influenciada principalmente por propiedades del agente encapsulante (es decir, viscosidad y solubilidad), la relación betacianina / agente encapsulante y la temperatura (Vergara, Saavedra, Sáenz, García, & Robert, 2014)

2.2. Marco Contextual

2.2.1. Cactáceas.

Las cactáceas son una familia constituida por alrededor de 1600 especies. Los miembros de ésta familia se encuentran en forma nativa desde Chile y Argentina hasta Canadá, y se cultivan en más de 30 países (Esquivel, 2004).

Estas plantas tienen la característica de que utilizan de manera eficiente el agua (con eficiencias de cinco a diez veces mayores que los cultivos convencionales), lo que ocasiona que el requerimiento de agua sea bajo. Esta característica de aprovechamiento del agua se debe a la vía fotosintética para esta familia, la vía del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). En las plantas CAM, las estomas se abren de noche y capturan el dióxido de carbono en la noche cuando la transpiración es baja.

Dentro de las cactáceas existen alrededor de 35 especies que tiene potencial como cultivo para obtención de frutos, vegetales o forraje. Las cactáceas pertenecen al orden Caryophyllales. Su ubicación filogenética dentro de este orden es indisputable, debido a que las cactáceas y las otras familias en este orden comparten características (sinamorfismos) que no ocurren en ningún otro orden de las angiospermas. Uno de estos sinamorfismos es la presencia de betalaínas, un tipo de pigmentos nitrogenados derivados de la tirosina. Los cactáceos comestibles se pueden clasificar en tres tipos: las tunas, las pitayas (trepadoras) y las pereskias (columnares). Existen alrededor de 100 especies, principalmente del género *Opuntia*, del cual se obtienen frutos comestibles y su cultivo se logra en terrenos áridos, donde pocas plantas pueden sobrevivir (Anderson et al., 2002;

Cota-Sánchez, 2016). Los frutos de los cactus son conocidos como peras espinosas, tuna en México y nochtli en el lenguaje Nahuatl (Castellanos- Santiago & Yahia, 2008)

2.2.1.1. *Opuntia stricta* Haw:

Es una especie fanerógama perteneciente a la familia Cactaceae, nativas de Norteamérica en México, Estados Unidos y Cuba. Debido a las diferentes propiedades nutricionales y medicinales, la corteza es usada como tónico y diurético, las frutas tienen propiedades refrescantes y tónicas, y los brotes jóvenes y el jugo lechoso son astringentes (Cota-Sánchez, 2016); esta especie ha sido distribuida ampliamente fuera de su área original. Debido a su potencial colonizador y constituir una amenaza grave para las especies autóctonas, los hábitats o los ecosistemas, ha sido catalogada en el Catálogo Español de Especies exóticas Invasoras.

Taxonomía:

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Cactaceae
Género:	<i>Opuntia</i>
Especie:	<i>Opuntia stricta</i> (Haw) Haw.

Las plantas son arbustos suculentos extendidos o erectos, muy ramificados que alcanzan una altura de 2 m. Los cladodios (tallos) son de color verde a verde azulado, aplastados, y de aproximadamente 10-25 cm de largo y generalmente de 7,5 a 15 cm de ancho. A partir de las areolas, se desarrollan las espinas amarillentas gruesas y ligeramente curvadas, que varían en número desde totalmente ausentes hasta grupos de uno o dos o más, normalmente grupos. Las flores son de color amarillo brillante y aparecen durante los meses de verano. La especie se identifica mejor por su típica fruta en forma de pera a esférica, de color púrpura en la madurez, de 4-6 cm de largo y 2.5-3 cm de diámetro. Su superficie exterior es lisa y sin espinas, a excepción de algunos gloquidios incrustados en las pequeñas areolas. La pulpa es de color púrpura intenso y de sabor agrio y contiene alrededor de 60 semillas con recubrimiento duro. Las plantas más viejas desarrollan tallos leñosos que proporcionan soporte a las plantas más grandes.



Figura 7. *Opuntia stricta* Haw

Fuente: Esta investigación

2.2.1.2. *Opuntia elatior* Mill:

Es una especie fanerógama perteneciente a la familia *Cactaceae*. Es nativa de Centroamérica, Colombia, Venezuela e islas del Caribe.

Taxonomía:

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Cactaceae
Género:	<i>Opuntia</i>
Especie:	<i>Opuntia elatior</i> Mill.

O. elatior es arbustivo o arborescente, formando grupos densos, muy ramificados o plantas con un tronco primario bien definido de hasta 5 m de altura. Los cladodios son de color verde oliva y de forma oblonga, de 10-40 cm de largo. Las flores son de color amarillo anaranjado con franjas rojas o totalmente de color rojo anaranjado, el estilo se expande en la base formando un nectario, los filamentos son de color rosa rojizo y los lóbulos del estigma son verdes. El fruto es ovoide como la mayoría de los opuntias, y de color rojizo a rosado rojizo cuando está maduro; la superficie externa de la fruta es típicamente tuberculada, como resultado de las areolas elevadas; se pueden desarrollar espinas a partir de las areolas de la fruta. Las espinas se encuentran en grupos de dos a ocho, cada una de 2-4 cm de largo, con forma de aguja y de color blanco brillante que envejece de un gris a marrón más oscuro. (Itankar, Sontakke, Tauqeer, & Charde, 2014)



Figura 8. *Opuntia elatior* Mill

Fuente: esta investigación

2.3. Antecedentes

Se han encontrado diversas publicaciones referentes a la extracción, identificación, capacidad antioxidante y estabilidad de betalaínas en especies del género *Opuntia*, a continuación, se presentan algunos trabajos realizados, inicialmente se hablará de la *Opuntia stricta* y posteriormente de las investigaciones realizadas con *Opuntia elatior*:

Benavides P (2017) realizó la evaluación de dos técnicas de extracción de betalaínas: extracción tradicional con Solventes y Extracción asistida con microondas (EAM) en dos variedades de cactus: *Cereus hexagonus* y *Opuntia stricta*, y encontró que el método EAM genera una mayor eficiencia de extracción de este tipo de compuestos. Las mejores condiciones para la extracción mediante la técnica EAM fueron: 90 % de potencia total del equipo (1100 W) y 3 ciclos de 10 minutos de extracción, usando como solvente etanol al 30%.

R. Castellar et al., en 2003 quienes estudiaron las betalaínas extraídas de diferentes especies de *Opuntia*: *Opuntia stricta* Haw, *Opuntia undulata* Griff y *Opuntia ficus indica* L. Mill, las dos últimas presentaron tanto betaxantinas como betacianinas, mientras que la primera solo se encontraron betacianinas. El estudio de estabilización térmica y al almacenamiento se realizó usando buffer citrato- fosfato a pH 3,4,5,6 y 7; la estabilidad térmica se ensayó a 50 y 90 °C mientras que la estabilidad al almacenamiento fue a 22 y 4°C.; también se estudiaron los productos de degradación térmica de las betacianinas de *Opuntia stricta*, haciendo el seguimiento por HPLC-PDA. Las betacianinas de *Opuntia stricta* mostraron ser más estables a pH 5, con un tiempo de vida media de más de 1 año, sin añadir estabilizantes.

En 2006 M. R. Castellar, Obón, & Fernández-López obtuvieron el extracto crudo concentrado de los frutos de *Opuntia stricta*, utilizaron etanol: agua 60:40 (v/v) como el solvente de extracción óptimo para reducir la viscosidad causada por la presencia de mucílago y pectinas. El extracto concentrado resultante tuvo una alta resistencia de color (3.9, OD 535 nm, 1% v / v sol), una alta concentración de betanina (4,7 g L⁻¹) y baja viscosidad (59.0 cP). También mostró una alta estabilidad ($t_{1/2}$ = 236.6d, 4 °C) principalmente debido a su bajo pH (3,4) y bajo contenido de

agua (571 g kg⁻¹). Estas características se encontraban en el mismo rango que muestran los tres colorantes líquidos concentrados comercialmente disponibles estudiados (remolacha roja, zanahoria roja y piel de uva roja).

Fernández-López, Almela, Obón, & Castellar, en 2010, realizaron el estudio de la capacidad antioxidante de los extractos crudos de tres especies de cactus (*Opuntia ficus-indica*, *Opuntia undulata* y *Opuntia stricta*), los métodos utilizados para dicha determinación fueron TEAC y DPPH: el extracto de *O. Ficus-indica* presentó la más alta capacidad antioxidante y contenido de taurina, los frutos de *O. stricta* fueron ricos en ácido ascórbico y fenoles totales, mientras que los frutos de *O. Undulata* presentaron alto contenido de carotenoides.

Posteriormente M. R. Castellar, Solano, & Obón, en 2012 realizaron el estudio del contenido de betalaínas a lo largo de las etapas de maduración de frutos de *Opuntia stricta* (2, 4, 6, 7, 8 y 9 meses después de la antesis) concluyendo así que los frutos de *O. stricta* deben ser cosechados alrededor de 9 meses después de la antesis para lograr alta concentración de pigmento y de antioxidantes. Obteniendo los valores máximos mostrados a continuación: betacianinas (81 mg / 100 g fruto fresco), componentes antioxidantes como los fenoles (135 mg de ácido gálico / 100 g ff) y ácido ascórbico (35 mg / 100 g). Además, encontraron otras características de la fruta como una baja concentración de azúcar (4.7 g / 100 g ff) y un pH (3.3), lo que puede prevenir la contaminación microbiana y la degradación del pigmento.

Mientras que los estudios realizados sobre la especie *Opuntia elatior*, se enfocaron principalmente en su aplicación como antioxidante, antidiabética, anticonceptivo, analgésico y antiinflamatorio como se muestra a continuación:

Ramyashree, Shivabasavaiah, & H, en 2012 realizaron el estudio fitoquímico de los extractos etanólicos de frutos de *Opuntia elatior*, revelando la presencia de alcaloides, carbohidratos, grasas, aceites, flavonoides, fenólicos, taninos, esteroides y saponinas; además realizaron una prueba de toxicidad en donde la administración oral de extracto crudo no mostró ningún efecto tóxico sobre la morfología externa y el peso corporal de los ratones.

En 2013, Chauhan, Sheth, Rathod, Suhagia, & Maradia, también realizaron el análisis fitoquímico para la estandarización de frutos de *Opuntia elatior* Mill el cual indicó la presencia betacianina, alto contenido de azúcar y baja acidez, la presencia de betacianina fue comprobada

mediante HPLC y HPLC/MS. El peso promedio de la fruta fue de 24.568 ± 7.134 g / unidad y el porcentaje de cáscara y semilla fue muy bajo en comparación con la porción comestible. El contenido total de betacianina (47.10 mg / 100 ml) equivalente a la betanina obtenida de frutos de *Opuntia elatior* Mill fue mayor en comparación con *Opuntia ficus-indica* y *Opuntia undulata* Griff mientras que más bajo en comparación con *Opuntia stricta* Haw.

En el 2014 Itankar et al. obtuvieron el extracto hidroalcoholico de tunas de *Opuntia elatior* (HAOE), así como tres fracciones: fracción soluble en acetato de etilo (EAOE), fracción soluble en n-butanol (BFOE) y fracción insoluble en n-butanol (BIOE), al extracto y sus fracciones se les realizó una marcha fitoquímica que reveló la presencia de carbohidratos, esteroides, flavonoides, proteínas y taninos en el extracto de HAOE. Las fracciones de EAOE y BFOE demostraron la presencia de carbohidratos, esteroides, flavonoides y taninos. Sin embargo, BIOE mostró la presencia prominente de carbohidratos y se encontró una intensidad de color muy pequeña en el caso de la detección de flavonoides y taninos. También se determinó su capacidad antioxidante por el método de DPPH y Captura de radicales de óxido nítrico: las fracciones solubles de HAOE, acetato de etilo (EAOE) y butanol (BFOE) mostraron una actividad antioxidante significativa. Los contenidos polifenólicos, flavonoides, flavonona más altos y el grado de polimerización se encontraron en EAOE. El potencial de eliminación fue del orden del Ácido Ascórbico > EAOE > BFOE > HAOE > BIOE, donde se usó ácido ascórbico como control positivo.

Posteriormente en 2015 Chauhan, Sheth, & Suhagia, evaluaron la acción analgésica y antiinflamatoria de los frutos de esta especie, los resultados indicaron que la administración oral del zumo de fruta de *Opuntia elatior* Mill. exhibe propiedades analgésicas centrales y periféricas, que pueden deberse a la presencia de compuestos fenólicos y de betanina.

Sutariya & Saraf, en el 2016 aislaron y purificaron betanina de frutos de *Opuntia elatior* mediante cromatografía de columna, e investigaron los mecanismos antifibroticos de la betanina en contra de la nefropatía diabética inducida por estreptozotocina; en general la betanina mejoró las defensas e inhibió el estrés oxidativo en ratas con nefropatía diabética.

En el 2017 Kotadiya et al. estudiaron la actividad antioxidante y antidiabética *in vitro* de extractos hidroalcoholico de frutos de *Opuntia elatior*. También realizaron una marcha fitoquímica de los frutos de esta variedad de *Opuntia*, la cual reveló la presencia de

carbohidratos, flavonoides, fenoles y proteínas. La actividad antioxidante se realizó por el método de DPPH: los extractos hidroalcoholico de estas tunas presentaron un $38,14 \pm 1,07$ % de inhibición del DPPH a una concentración de $200 \mu\text{g/mL}$, para la actividad antidiabética se usó el ensayo de inhibición de la α -amilasa obteniendo un % de inhibición de $54,68 \pm 0,11$.

Por otro lado, en investigaciones relacionadas con la encapsulación de betalaínas:

Obón, Castellar, Alacid, & Fernández-López, en 2009 extrajeron el zumo de frutas *Opuntia stricta* y lo encapsularon por secado por aspersión, utilizaron jarabe de glucosa (DE 29) como coadyuvante de secado. El color se mantuvo durante el proceso de secado ($> 98\%$) y el rendimiento de secado fue alto (58%). El colorante en polvo mostró una alta resistencia del color (4.0), siendo esta resistencia del color estable cuando se almacenó a temperatura ambiente durante un mes. Este colorante se aplicó con éxito en dos sistemas de modelos de alimentos: un yogur y un refresco. Los alimentos presentaron una tonalidad rojo-violeta muy atractiva para los consumidores que se mantuvo después de un mes en refrigeración (4°C) (DE <5).

En el 2010 Gandía-Herrero et al., extrajeron indicaxantina de frutos de *Opuntia ficus indica*, posteriormente la purificaron y encapsularon por secado por pulverización usando como matriz maltodextrina; a estos encapsulados se les determinó su actividad de búsqueda de radicales libres (haciendo uso del catión radical ABTS) y su actividad antioxidante mediante el método de poder antioxidante reductor férrico (FRAP). También se realizó un estudio de la estabilidad de la indicaxantina encapsulada a diferentes valores de pH (3,5-8,5) y en ausencia y presencia de luz, obteniendo como resultados que la presencia de luz incrementa la degradación de la indicaxantina para todos los pH ensayados, la degradación se ajustó a una cinética de primer orden, finalmente los autores concluyeron que los pigmentos fueron más estables a pH 6 y 7 en ausencia de luz.

Vergara et al. (2014) realizaron la encapsulación de la pulpa y de extractos de betalaínas ultrafiltrados del fruto de *Opuntia ficus indica* mediante secado por pulverización usando como agente encapsulante capsul; estos encapsulados fueron almacenados a 60°C y posteriormente se caracterizaron. Obteniendo una cinética de pseudo-primer orden, la constante de velocidad de las betacianinas fue significativamente más alta para el sistema capsul-pulpa que para capsul-ultrafiltrado, lo cual sugirió que los mucílagos o el alto contenido de azúcar presente en la pulpa,

conlleva al incremento de la higroscopicidad de las micropartículas capsul-pulpa lo que puede ocasionar a la degradación de las betalaínas.

En 2015 Otálora et al., estudió la estabilidad de extractos ricos en betalaínas de *Opuntia ficus indica* y sus microencapsulados en maltodextrina-mucílago de cladiodo (SD1) y sólo maltodextrina (SD2), en ausencia de luz, a temperatura constante y bajo humedad relativa controlada; consideraron como variables independientes la humedad y el tiempo de almacenamiento (2,4,7,10,15,20 y 25 días), las variables dependientes fueron la actividad de agua y el contenido de betalaínas. El proceso para obtener SD1 tuvo el rendimiento más alto, atribuible a la presencia de mucílago que mejoró el proceso de secado por aspersión; que coincide con los menores valores de actividad de agua y humedad obtenidos para SD1 que para SD2. El contenido de betalaínas en los dos tipos de cápsulas fue de 0.497 ± 0.03 y 0.495 ± 0.05 mg equivalentes de betanina / g de perlas, de donde el autor concluye que el tipo de agente encapsulante no afecta la retención de los compuestos bioactivos a tiempo cero. En general los valores de actividad de agua tendieron a ser constantes después de siete días, obteniendo valores similares para las dos muestras.

Robert et al. (2015) estudiaron la interferencia del aislado de proteína de soja y su mezcla con maltodextrina o inulina, en el contenido de betalaína y la estabilidad química de las micropartículas de *O. Ficus-indica* (pera cactus púrpura) obtenidas mediante secado por aspersión. Los autores observaron que a pesar de que las betacianinas (pigmentos rojos) se producen en cantidades más altas que las betaxantinas (pigmentos amarillos) en tuna morada, se observó una disminución significativa de su contenido durante el almacenamiento (a 60 ° C), pero las betaxantinas revelaron ser más estables que las betacianinas.

Castro-Muñoz, Barragán-Huerta, & Yáñez-Fernández (2015) encapsularon jugo de tuna clarificado (*Opuntia stricta*) usando gelatina- maltodextrina como soporte. Las microcápsulas generadas fueron estructuras rígidas, que se atribuyen a la presencia de gelatina. El contenido de betalaína depende tanto de la temperatura como de la proporción de encapsulante, pero la actividad antioxidante depende sólo de la proporción de los portadores. La selección de la mejor proporción de portadores en este estudio fue de 2.5: 7.5 debido al mayor rendimiento, a los valores de colorimetría máximos relacionados con el contenido de betalaína y ala buena actividad antioxidante.

Posteriormente en 2016 Otálora et al., realizaron la encapsulación de los pigmentos de *Opuntia ficus indica* mediante gelificación iónica usando como encapsulantes alginato de calcio y alginato de calcio- albumina de serum bovino; evaluó la estabilidad de los encapsulados al almacenamiento con diferentes humedades relativas evidenciando que la retención de las betalaínas de las perlas almacenadas depende tanto del porcentaje de humedad relativa como del tipo de matriz usada en las perlas y que la estabilidad de las betalaínas disminuye con el incremento del contenido de humedad en el ambiente. También evaluaron su actividad antioxidante durante el almacenamiento (método de DPPH); obteniendo una buena correlación entre la retención de la betanina y la capacidad antirradical para los dos tipos de perlas y la muestra control, cuando se almacenaron a diferentes condiciones de porcentajes de humedad y temperatura (25 y 50 °C). Esos resultados mostraron que la capacidad antioxidante de las perlas tenía una relación cuasi-lineal con la cantidad de betanina remanente; aunque después de perder el pigmento, la capacidad antioxidante residual podría deberse probablemente a la reactividad de los productos de degradación.

De acuerdo con lo mencionado, en el presente trabajo se realizó la purificación, el fraccionamiento y caracterización de los extractos crudos de dos variedades de cactus del género *Opuntia* con el fin de determinar cuál de esas fracciones es la más antioxidante y su estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

3.1.1. Clasificación taxonómica.

La identificación taxonómica de los frutos se realizó en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

3.1.2. Características del fruto.

Se determinaron las características físicas de los frutos como: color, forma, textura, así como el pH del extracto líquido acuoso del fruto, por triplicado. Los frutos de *Opuntia* fueron recolectados aleatoriamente en el Cañón del Chicamocha (Departamento de Santander): *Opuntia stricta* (6° 58' 18.26" N, 73°13' 12.72" W, 1032 msnm) y *Opuntia elatior* (6°50' 27.30" N, 72° 59' 25.83" W, 683 msnm) y se seleccionaron de acuerdo con su consistencia y color. Se retiraron las espinas de las tunas, y luego estas últimas fueron cortadas con cáscara en trozos pequeños

que posteriormente se liofilizaron y almacenaron en nevera hasta su utilización (Otálora et al., 2015).

3.2. Extracción de Betalaínas asistida por microondas

La Extracción se realizó usando un Microondas-Samsung adaptado con un sistema de reflujo, muestras de 30 g se colocaron en el balón con una solución de etanol al 30%, por cada gramo de fruto se agregaron 3 mL de solvente y se trataron al 90% de la potencia total del equipo, durante 10 min, este procedimiento se repitió 3 veces, entre ciclos se dejó reposar la muestra aproximadamente 30 min (Benavides P, 2017).

La suspensión resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos; luego, el sobrenadante obtenido se concentró a 45°C en un rotaevaporador. Posteriormente, el agua se eliminó por medio de secado en plancha a 45°C, resultando un sólido que se denominó extracto crudo (EC): Obteniendo de esta manera el Extracto crudo *Opuntia stricta* (ECOS) y Extracto crudo *Opuntia elatior* (ECOE). (Figura 9)



Figura 9. Obtención del Extracto Crudo. Fuente: esta investigación

3.2.1. Ensayos preliminares para la determinación de la presencia de Betalaínas en las muestras.

A cada extracto crudo se agregó unas gotas de NaOH 2M y se observó el cambio en su coloración del color inicial de los extractos a un color amarillo (Delgado-Vargas et al., 2000). Adicionalmente, se midió el espectro de absorción de una solución acuosa de los EC y se determinaron los máximos de absorción.

3.3. Eliminación de hidrocoloides y proteínas

La eliminación de hidrocoloides y proteínas se realizó según el procedimiento planteado por Stintzing, Schieber, & Carle (2002), con algunas modificaciones. Los extractos crudos se disolvieron en proporción 1:10 (g de muestra/ mL de agua) y luego, por cada mL de EC se

adicionaron 2 mL de etanol al 96%, después de 20-30 minutos se observó una suspensión que se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min; el sobrenadante traslucido se rotaevaporó a 45°C y posteriormente se sometió a secado obteniendo sólidos de color púrpura y rosado brillante, a los cuales se les denominó extracto purificado (EP): obteniendo de esta forma el Extracto purificado *Opuntia stricta* (EPOS) y Extracto purificado *Opuntia elatior* (EPOE).

3.4. Cuantificación de Betalaínas

El contenido de betalaínas de los EC y EP se determinó por espectrofotometría UV- Vis. (F. Stintzing et al., 2003) Para este propósito, se prepararon soluciones madre de los EC en agua tipo II (ver tabla 1), a partir de éstas se prepararon diluciones en un buffer citrato- fosfato 0,05 M pH 5, luego utilizando un espectrofotómetro Spectroquant® Probe 300 se determinaron las absorbancias máximas a 538nm para betacianinas (BC) y a 480 nm para betaxantinas (BX), que permitieron estimar la concentración de pigmentos [B] utilizando la ecuación 3. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

$$B \left[\frac{mg}{l} \right] = \frac{A \times DF \times MW \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (2)$$

Donde A es la absorción a 538 nm y 480 nm para betacianinas y betaxantinas, respectivamente. DF es el factor de dilución y L la longitud de trayectoria de la cubeta de 1 cm. MW y ϵ , los pesos moleculares y coeficientes de extinción de los compuestos representativos: betanina e indicaxantina.

Para betanina ($MW = 550 \frac{g}{mol}$, $\epsilon = 60000 \frac{l}{mol \cdot cm}$ en H_2O ; $\lambda = 538 nm$;) e indicaxantina ($MW = 308 \frac{g}{mol}$, $\epsilon = 48000 \frac{l}{mol \cdot cm}$ en H_2O ; $\lambda = 480 nm$.)

Tabla 1. Soluciones preparadas para la cuantificación de betalaínas de las dos especies. Fuente: Esta investigación.

<i>Especie</i>	<i>Extracto</i>	<i>Peso</i> (g)	<i>Vol.</i> <i>Solución</i> <i>Madre (mL)</i>	<i>Alícuota (mL)</i>	<i>Volumen</i> <i>sol. Final</i>
<i>Opuntia stricta</i>	Crudo	0,3677	10	1,1	10
	Purificado	0,4294		1,2	
<i>Opuntia</i>	Crudo	2,0689	25	2	5

<i>elator</i>	Purificado	0,9939	10
---------------	------------	--------	----

3.8. Determinación de la capacidad Antioxidante

Para la medida de la capacidad antioxidante de los EC, EP y de las FR y FA de las dos especies de *Opuntia* se utilizaron dos métodos espectrofotométricos: TEAC y DPPH. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro 1205 Vis Spectrofotometer y todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.8.1. Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Se evaluó la capacidad de reducir al radical $ABTS^{•+}$ siguiendo la metodología desarrollada por Re et al., 1999. Primero se formó el catión radical $ABTS^{•+}$, que se produjo por la oxidación de ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2,45mM) en agua tipo II (Solución Stock), esta solución se dejó reposar durante 24 horas en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se tomó una alícuota de la solución Stock y se diluyó con solución salina taponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 hasta alcanzar una absorbancia de $0,916 \pm 0,003$, a una longitud de onda de máxima absorción de 734 nm (solución A_1). Este radical posee una coloración azul verdosa, que se observa en el Anexo B.

Para llevar a cabo la reacción se adicionaron 30 μ L de la muestra o patrón a 3 mL de la solución A_1 , se agitó en vortex durante 1 minuto, se dejó reposar por 6 minutos y finalmente se midió la absorbancia a 734 nm. Siguiendo la metodología descrita, se construyó una curva de calibración con soluciones metanólicas de Trolox (patrón) a las siguientes concentraciones: 0,4; 0,9; 1,4; 1,9; 2,4 y 3 mM. Como control positivo se utilizó ácido ascórbico en concentración de 100 ppm en metanol. Los resultados se expresaron en μ mol de Trolox/g de muestra. Finalmente se analizaron todos los extractos y fracciones de las dos especies: *Opuntia stricta* y *Opuntia elator*: extracto crudo (EC 6000 ppm y 10000 ppm), purificado (EP 6000 ppm y 10000 ppm) y las fracciones rojas (FR 1000 ppm y 1000 ppm) y amarillas (FA 30000 ppm y 30000 ppm) respectivamente; las cuales fueron disueltas en metanol al 50%, por tanto, se realizó un blanco de reacción utilizando 30 μ L de este solvente.

3.8.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

Para este análisis se implementó la metodología propuesta por Cai, Sun, & Corke (2003) con algunas modificaciones; se estudió la capacidad antiradical de los EC, EP, y FA, FR de las dos especies. Se preparó una solución Stock de DPPH $^{\bullet}$ 120 mM en etanol al 80%. 3,9 mL de esta

solución se adicionaron a 0,1 ml de los extractos a diferentes concentraciones. Se usaron 4 concentraciones diferentes para cada muestra (dichas concentraciones se seleccionaron adecuadamente dependiendo de cada muestra). La reacción se realizó a temperatura ambiente (18 ° C) y la disminución de la absorbancia de DPPH[•] se midió a 515 nm después de 30 min. Como blanco se usó etanol al 80% y la solución DPPH[•] sin extractos (3,9 ml de DPPH[•] 0,1 ml de etanol al 80%) fue el control. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. La actividad antioxidante de los extractos se expresó usando los parámetros de:

- a. actividad de eliminación de radicales:

EC_{50} = concentración (ppm) de antioxidante (Extracto) requerida para una disminución del 50% en la absorbancia de los radicales DPPH[•]

- b. inhibición (%) de DPPH[•] absorbancia = $(A_{\text{control}} - A_{\text{test}}) \times 100 / A_{\text{control}}$. Se realizó una gráfica de la absorbancia de DPPH frente a la concentración de antioxidante para establecer las curvas estándar (curvas dosis-respuesta) y calcular la EC_{50} . El control es la absorbancia del control (solución DPPH[•] sin extracto) y A_{test} es la absorbancia de la muestra de prueba (solución DPPH[•] más 0,1 ml de compuesto de prueba 5 µM) (Cai et al., 2003).

3.5. Separación de betacianinas y betaxantinas

Se utilizó una columna cromatográfica de 19 x 1,9 cm empacada con C₁₈ marca SIGMA. La activación de la resina se hizo con tres volúmenes de metanol y posteriormente tres volúmenes de agua acidificada con ácido fórmico (pH 3) (Stintzing, Schieber, & Carle, 2002). Para la elución de los compuestos se hizo necesario el uso de dos fases móviles, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Solventes utilizados como fase móvil en la cromatografía de columna con Silica C₁₈.
Fuente: Esta Investigación.

<i>Fase móvil (FM)</i>	<i>Solvente</i>
<i>Inicial</i>	agua acidificada con HCOOH (pH 3)
<i>Final</i>	metanol: agua acidificada pH 3 (95:5)

Se disolvieron 0,8 g de cada extracto purificado en 1 mL de agua acidificada, y se cargaron en la columna; con la fase móvil inicial se eluyó la fracción amarilla (FA), mientras que con la fase

móvil final se eluyó la fracción roja (FR). Las fracciones recolectadas se concentraron a presión reducida a 45°C y se llevaron a sequedad obteniéndose los sólidos.

3.6. Identificación de las betalaínas

Los extractos purificados, las fracciones amarillas y rojas separadas mediante columna empacada con C₁₈ se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en los laboratorios de la Universidad de Sevilla- España. Se utilizó el sistema cromatográfico Agilent 1200 equipado con una bomba cuaternaria, un detector de diodo UV-vis, un inyector automático y el software ChemStation. Antes de la inyección directa, las muestras se filtraron a través de un filtro de nailon de 0,45 µm.

Las betalaínas se separaron en una columna Zorbax C₁₈ (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm) mantenida a 25 ° C a un flujo de 1 mL min⁻¹. Los eluyentes fueron: eluyente A agua: ácido fórmico (99:1) y eluyente B acetonitrilo: agua: ácido fórmico (80:19:1). El volumen de inyección para todos los extractos fue de 50 µL. Las betacianinas y las betaxantinas se monitorearon a 538 y 480 nm, respectivamente. La identificación de cada pico cromatográfico se asignó tentativamente por sus características espectrales visibles en comparación con los tiempos de retención de estándares. La semicuantificación se realizó sobre la base de las áreas medias de cada señal cromatográfica.

3.7. Determinación de fenoles totales

Se determinó el contenido fenólico para los extractos y fracciones de las dos especies: *Opuntia stricta* y *Opuntia elatior*: extracto crudo, EC (15000 ppm y 10000 ppm, respectivamente), purificado EP (15000 ppm y 10000 ppm) y las fracciones rojas FR (3000 ppm y 500 ppm) y amarillas FA (30000 ppm y 60000 ppm), por el método de Folin-Ciocalteu. En el proceso se utilizó 0,1mL de muestra a analizar (apropiadamente disuelta en metanol al 50%), 0,5mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 1,5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio Na₂CO₃ al 20 % p/v, se aforaron a un volumen final de 10mL con agua tipo II, esta solución se agitó obteniendo una coloración azul característica del reactivo Folin-Ciocalteu (ver Anexo A) Después de 2 horas se tomó lectura de la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro 1205 Vis Spectrofotometer. Como blanco se usó 0,1 mL de metanol al 50%.

De la misma manera se realizó una curva de calibración usando como patrón ácido gálico a las siguientes concentraciones: 10, 30, 60, 100, 150 y 180 ppm, los resultados del contenido fenólico

se expresaron en mg de ácido gálico/ g de muestra (Galati et al., 2003). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

3.9. Estabilidad química de los extractos crudos (EC)

Para estudiar la cinética de degradación de los pigmentos se prepararon soluciones acuosas de los extractos crudos (ECOS y ECOE) a pH 3, pH extracto acuoso (ECOS: 4,26 y ECOE: 4,77) y pH 7. Posteriormente se midió la absorbancia de las soluciones (a 538 nm) en un espectrofotómetro 1205 Vis Spectrofotometer, recientemente preparadas (t=0) y luego del periodo de almacenamiento.

También se determinó el contenido fenólico y la capacidad antioxidante por los métodos mencionados en la sección 3.8. Las muestras se almacenaron en ausencia de luz a 18°C durante 4 meses (en presencia de aire); manteniendo constantes estas condiciones se midieron las respectivas absorbancias. Con el fin de obtener los parámetros cinéticos de degradación, como tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y constante cinética de degradación (K); así como su relación con la capacidad antioxidante.

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

$$t_{1/2} = \ln 0,5 / k \quad (3)$$

La constante cinética de degradación (k) se obtuvo de la ecuación de la gráfica que relacionó Ln [BC] vs tiempo, a pH 3, pH extracto acuoso y pH7 en ausencia de luz. Los aspectos que se evaluaron determinaron las condiciones de almacenamiento para la conservación del pigmento en solución.

3.10. Encapsulación de los extractos en maltodextrina

El proceso de encapsulado se realizó en el grupo de investigación GANAC de la Universidad Nacional de Colombia: los extractos crudos ECOS (0,9431 g) y ECOE (0,9308 g) se combinaron con el agente encapsulante Maltodextrina (1,062 para *Opuntia stricta* y 1,0765 g para *Opuntia elatior*). El proceso de secado por aspersión se realizó en un equipo LabPlant DE20 a escala de laboratorio que cuenta con una cámara de aspersión de volumen 1110 x 525 x 600 mm. La mezcla se cargó al equipo y se mantuvo en agitación magnética constante a 20 °C hasta su completa homogeneización y posteriormente se sometió al proceso de secado por aspersión utilizando un flujo de aire de 100 m³/h y una presión de aire de 4 bares. El diámetro interno de la

boquilla fue de 0.5 mm con un flujo de carga de 485 mL/h con temperatura de entrada 140 °C y de salida de 76°C para *Opuntia stricta* y 80°C para *Opuntia elatior*. Obteniéndose así los extractos encapsulados, denominados Extracto Encapsulado *Opuntia stricta* (EEOS: 0,800 g) y Extracto Encapsulado *Opuntia elatior* (EEOE: 0,600 g).

3.11. Ensayo de la estabilidad del extracto crudo encapsulado

Los encapsulados se almacenaron en cajas Petri, en presencia de aire y oscuridad a una temperatura constante de 18°C, por un periodo de tiempo de 116 días para EEOS y 56 días para EEOE, en el día cero se determinó el contenido de betalainas (sección 3.4.), contenido fenólico (sección 3.7.) y actividad antioxidante por el método de TEAC (sección 3.8.1.) Estas medidas se realizaron en el momento que se observaba cambio en los resultados.

3.12. Análisis Estadístico

Todos los valores se expresan como promedio $\pm$ desviación estándar de la muestra. El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurion.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Material Vegetal

4.1.1. Clasificación taxonómica.

De acuerdo con la clasificación realizada en el Herbario Nacional Colombiano los cladodios de las dos plantas recolectadas en el Cañón del Chicamocha (Departamento de Santander), pertenecen a la familia Cactaceae (Anexo C) y sus nombres científicos son:

- *Opuntia stricta* (Haw.) Haw. No. de registro en el herbario 595149

- *Opuntia elatior* Mill. No. de registro en el herbario 595148

4.1.2. Características del fruto.

Los frutos fueron recolectados en su estado de madurez: consistencia blanda y color púrpura intenso. Las características fisicoquímicas de estos se muestran en la tabla 3. El porcentaje de humedad de los frutos de las dos especies (79,4% y 47,6% respectivamente) es diferente al encontrado para otras especies del género tales como la *Opuntia: Joconostle, Dillenii, Ficus-indica* y *Stricta* (81,68 – 87,05%) (Díaz Medina, Rodríguez Rodríguez, & Díaz Romero, 2007; Obón et al., 2009; M. R. Castellar et al., 2012; Sánchez-Gonzalez et al., 2013) lo anterior puede

deberse a que son diferentes especies y a la zona donde estas fueron recolectadas, el valor obtenido para *O. stricta* es cercano al valor reportado mientras que los frutos de *O. elatior* tienen menor contenido de humedad. Por otro lado, los valores de pH obtenidos son diferentes a los reportados para *Opuntia stricta* $3,8 \pm 0,1$ y $3,37 \pm 0,12$ (Obón et al., 2009; M. R. Castellar et al., 2012), los frutos tratados son ligeramente menos ácidos, mientras que para la *Opuntia elatior* no se encontraron reportes.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de los Frutos de *Opuntia*. Fuente: Esta Investigación.

CARACTERISTICA	DESCRIPCIÓN	
	<i>Opuntia stricta</i>	<i>Opuntia elatior</i>
Color	Cuando el fruto es maduro es Púrpura y su pulpa es del mismo color	Cuando el fruto es maduro es Púrpura rojizo y su pulpa es del mismo color
Forma	Ovoide, de 4-6 cm de largo y 2.5-3 cm de diámetro	Ovoide, de 3-5 cm de largo y 2.5-3 cm de diámetro
Textura	Corteza firme y pulpa blanda	Corteza firme y pulpa blanda
pH	$4,26 \pm 0,02$	$4,77 \pm 0,02$
Porcentaje de Humedad	79,4%	47,6%

4.2. Determinación de la presencia de Betalainas en las muestras

Investigaciones previas determinaron la presencia de betalainas en los frutos del Género *Opuntia* (R. Castellar et al., 2003; Betancourt, Cejudo-bastante, Francisco, & Hurtado, 2017), sin embargo, para corroborar que este fuese el pigmento a analizar y no antocianinas, se realizó una prueba cualitativa con los extractos de las dos especies, ésta consiste en agregar una base fuerte (NaOH) al EC y observar el cambio de color. Para los dos extractos se apreció un cambio de color de púrpura y púrpura rojizo a amarillo (figura 10), al ser el pH alcalino (9-11) se produce la ruptura del enlace aldimina obteniendo como productos el ácido betalámico de color amarillo y el ciclo Dopa 5-O- β -glucosido (incoloro) (Herbach et al., 2006) (figura 11) comprobando así que se tratan de betalainas.



Figura 10. Prueba Cualitativa para la presencia de Betalaínas

a) y c) Coloración inicial de los ECOS y ECOE respectivamente, b) y d) cambio de coloración después de la adición del NaOH. Fuente: Esta investigación

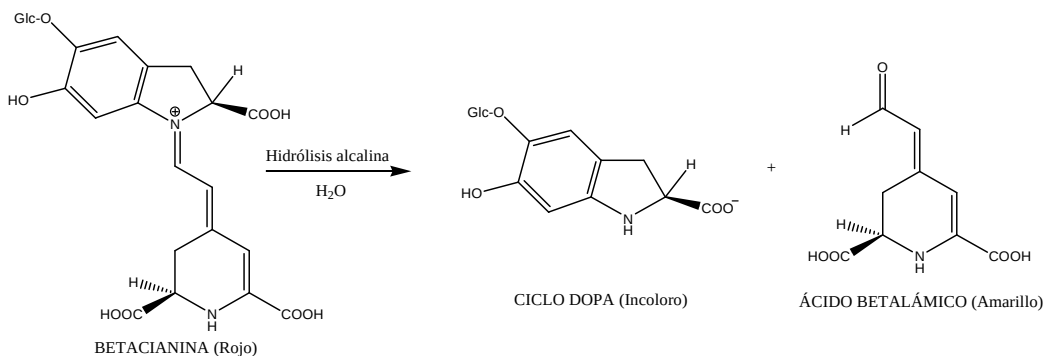


Figura 11. Hidrólisis de Betalaínas en medio básico. Fuente: Esta Investigación

Otra forma de comprobar que se trataba de betalaínas fue mediante los espectros UV-Vis de los extractos acuosos de las dos especies (figura 12), en los espectros se observa la presencia de dos picos característicos en cada espectro, en la región UV a 280 nm (dos picos anchos de absorbancias superiores a 3) y en la región visible a 538 nm; se sugiere que la absorción a 280 nm indica que las betalaínas están aciladas (Reynoso, Garcia, Morales, & Mejia, 1997) y la absorción a 538 nm es propia de las betacianinas, sin embargo no se observó el pico característico de las betaxantinas a 480 nm, lo anterior puede deberse a que éstas se encuentran en una menor concentración.

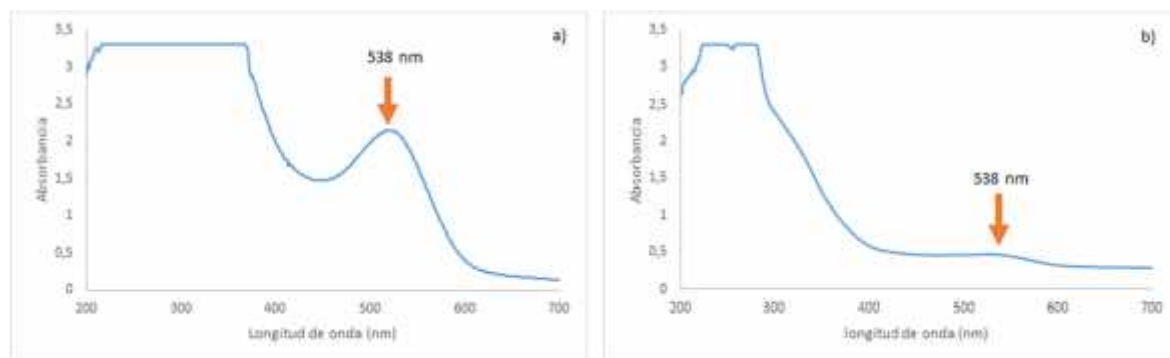


Figura 12. Espectros UV-Visible de los Extractos Crudos de los frutos de *Opuntia*
a) *Opuntia stricta* b) *Opuntia elatior*. Fuente: Esta Investigación

4.3. Obtención del Extracto crudo y purificado de betalainas

De acuerdo con la metodología mencionada en la sección 3.2, se obtuvieron los extractos crudos de las dos especies de cactáceas: extracto crudo de *Opuntia stricta* (ECOS) y Extracto Crudo de *Opuntia elatior* (ECOE); para los dos casos, el fruto completo (cáscara y pulpa) se sometió al proceso de extracción, obteniendo un porcentaje de extracción para *Opuntia stricta* del 30% de fruto seco y para *Opuntia elatior* 35% de fruto seco.

Durante el proceso de extracción, la irradiación de las microondas provoca en las células estrés térmico, ocasionando así que la temperatura y la presión dentro de estas aumente hasta el punto en el que las paredes celulares se rompen liberando los compuestos intracelulares como lo son las betalainas (Cardoso-Ugarte et al., 2014), aunque la temperatura alcanzada en este proceso es alta y se podría esperar que las betalainas sufran degradación ya que son termolábiles, Harivaindaran et al. (2008) obtuvieron el mayor contenido de betalainas a una temperatura de extracción de 100°C, esto debido a la capacidad de regeneración que tienen las betalainas, mediante la recondensación de los productos de hidrólisis lo que se asocia con la recuperación del color, es por esto que entre cada ciclo de extracción se hizo necesario el enfriamiento de la muestra.

Sin embargo, ningún método de extracción de pigmentos es selectivo, así como se extraen los pigmentos de interés con ellos también se obtienen otros compuestos polares (Braga, Seabra, Dias, & Sousa, 2013). De acuerdo a lo encontrado respecto a la composición de los cactus entre estos compuestos se pueden encontrar proteínas, azúcares y mucílagos (Florian C. Stintzing, Schieber, & Carle, 2001), éstos últimos tienen una consistencia viscosa que podría interferir en

los procesos de separación e identificación cromatográfica, por lo cual se hizo necesario precipitarlos añadiendo etanol al EC, esto disminuye la polaridad del medio y por lo tanto también disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos de las moléculas de carbohidratos que conforman los mucílagos, provocando su precipitación y/o coagulación, de manera que posteriormente se pueden retirar por centrifugación, obteniendo así los extractos purificados (EP).

4.4. Cuantificación de Betalaínas

Como se observa en la figura 7, ninguno de los dos extractos posee un pico de absorción máximo a 480 nm (pico característico de las betaxantinas), se infiere entonces que el nivel de concentración de las betaxantinas (pigmentos amarillos) es muy bajo y es muy difícil distinguirlas espectrofotométricamente de las betacianinas, por lo cual se cuantificaron únicamente las betacianinas mediante la metodología descrita en la sección 3.4. La tabla 4 muestra las absorbancias medidas para betacianinas a 538 nm.

Tabla 4. Absorbancias medidas a 538 nm para los EC y EP. Fuente: Esta Investigación.

Réplica	$A_{\lambda 538}$			
	<i>Opuntia stricta</i>		<i>Opuntia elatior</i>	
	<i>ECOS</i>	<i>EPOS</i>	<i>ECOE</i>	<i>EPOE</i>
1	0,849	0,847	0,660	0,681
2	0,845	0,841	0,639	0,587
3	0,862	0,842	0,676	0,697
Promedio	0,852	0,843	0,658	0,655
DE	0,009	0,003	0,019	0,059

Tabla 5. Contenido de Betacianinas para los EC y EP. Fuente: Esta Investigación.

Muestra	Betacianinas^a	Betacianinas^b	Betacianinas^c
ECOS*	0,574 ± 0,006	11,842 ± 0,124	1,931 ± 0,020
EPOS*	-	-	1,500 ± 0,006
ECOE*	0,064 ± 0,002	3,374 ± 0,095	0,182 ± 0,005

EPOE*	-	-	0,150 ± 0,014
--------------	---	---	---------------

^amg de betanina/g de fruto seco, ^bmg de betanina/100 g de fruto fresco, ^cmg de betanina/g extracto seco *Datos con ± DE de tres réplicas.

En la tabla 5 se observa el contenido de betacianinas para extractos crudos y purificados de las dos especies, se realizó la conversión de unidades con el fin de comparar con otras investigaciones. Después de realizar el análisis estadístico para comparación de medias haciendo uso de la prueba-t, en donde la t calculada para las muestras debía ser igual a 0,0 para no considerarlas diferentes, la t calculada fue de 145,784; por lo cual se concluye que existen diferencias significativas para el contenido de betacianinas de los EC de las dos especies (mg de betanina/g de fruto seco), también se calculó el valor-P (1,3279E-8) el cual es menor que 0,05, confirmando lo antes mencionado, por tanto el contenido de betacianinas en el ECOS es mucho mayor que el presentado en el ECOE. El análisis estadístico también se realizó para comparar el contenido de betacianinas dentro de la misma especie entre extractos crudos y purificados, para la *Opuntia stricta* ($t_{\text{calculado}}$:35,1118 y Valor-P:3,98635E-6) si existen diferencias significativas entre los dos extractos, siendo mayor el contenido en el Extracto Crudo lo cual no se esperaba ya que al realizar la purificación el contenido de betacianinas debería aumentar porque se eliminan los mucílagos que interfieren en la cuantificación, en este caso pudo ocurrir que al precipitar los mucílagos con etanol también precipitó el pigmento disminuyendo así su concentración (M. R. Castellar et al., 2006); para la *Opuntia elatior* también se observa que el contenido de betacianinas es mayor en el extracto crudo ($t_{\text{calculado}}$:3,86481 y Valor-P:0,01807289) que en el purificado.

El contenido de BC de la *Opuntia stricta* (11,842 ±0,124 mg betanina/ 100 g de fruto fresco) es menor que el contenido de BC de las tunas de cactus de esta misma especie analizadas por R. Castellar et al.,2003 y J. A. Fernández-López et al., 2010 (80- 67 mg betanina/ 100 g de fruto fresco), se debe resaltar que la metodología de extracción y los solventes, fueron diferentes a los utilizados en esta investigación.

Al comparar los valores de BC con los datos encontrados en 12 especies de *Opuntia* analizadas por Sáenz et al., 2012 y R. Castellar et al.,2003, se concluye que la concentración de betacianinas para el ECOS está dentro de los rangos reportados por estos autores, los cuales van de 113,9- 7,9 mg de betanina / 100 g de fruto fresco y 0,97 – 8,15 mg de betanina/ g de fruto seco; mientras

que el contenido de betacianinas para el ECOE ($3,374 \pm 0,095$ mg de betanina / 100 g de fruto fresco y $0,064 \pm 0,002$ mg de betanina/ g de fruto seco) está por fuera de los rango mencionado. Estas diferencias se pueden deber a la metodología de extracción: distintos tiempos de extracción, composición y cantidad de solvente empleado, además de factores que pueden influenciar en el contenido de betalaínas en los frutos de cactus como el cultivo o variedad, distribución de las frutas, etapa de maduración, clima y lugar geográfico de la producción (Sáenz et al., 2012).

4.5. Separación de betacianinas y betaxantinas

La separación de las fracciones (amarilla, FA y roja, FR) de las dos especies de cactus (FAOS, FAOE, FROS Y FAOE), se llevó a cabo de acuerdo con lo especificado en la Sección 3.5. Haciendo uso de cromatografía de columna en fase reversa, con fase estacionaria sílica C₁₈, las betalaínas se fraccionaron de acuerdo a las diferentes características de retención (dependientes de pH) de betaxantinas y betacianinas (F C Stintzing et al., 2002). En el fraccionamiento se observó que la FR se retuvo más en la fase estacionaria, mientras que la FA eluyó rápidamente con agua acidificada (pH 3), por lo que es evidente que los compuestos presentes en esta última fracción son los más polares. Cabe destacar que al realizar la cuantificación de las betalaínas se concluyó que el porcentaje de betaxantinas era bajo, sin embargo, al realizar la separación mediante cromatografía de columna, se observó una fracción de color amarillo por lo cual se hizo necesaria la elución de esta fracción y su posterior análisis.

4.6. Identificación de las betalaínas

La separación de las betalaínas presentes en las dos variedades de cactus se realizó mediante HPLC analítica de acuerdo con el protocolo mostrado en la sección 3.6.

Para la variedad *Opuntia stricta*, la muestra de EPOS presenta el cromatograma a 538 nm mostrado en la figura 13, en donde se observa la presencia de 4 picos correspondientes a betalaínas, identificados gracias a la comparación de sus tiempos de retención con patrones (Anexo D); las señales no numeradas no se tuvieron en cuenta porque su perfil en la región visible no tiene las características de los pigmentos en estudio.

El análisis permitió establecer que el pico 1 (14,51 min) corresponde a la betanina, la cual es una betacianina 5-O-glucosilada (figura 14.1) con un porcentaje de área del 42,30%, el pico 2 (16,49

min) se logró identificar como descarboxibetanina, molécula de betanina que presenta una descarboxilación (% área del 3,67%; Figura 14.2), el pico **3** presentó un tiempo de retención de 16,77 min y corresponde a la isobetanina, isómero de la betanina en el C-15 (Figura 14.3) el cual presentó el mayor porcentaje de área (44,24%), de acuerdo a literatura la presencia de estos isómeros en este tipo de extractos es simultánea y normalmente la betanina es quien se encuentra en mayor proporción (M. R. Castellar et al., 2012), por lo cual se debe tomar en cuenta que esta isomerización también puede acelerarse por el aumento de la temperatura o por la acción de algunos compuestos introducidos (Nemzer et al., 2011) . Finalmente se observa el pico **4** (19,16 min) con un % de área de 5,37%, que corresponde a la descarboxiisobetanina (Figura 14.d), compuesto que presenta la misma estructura de la isobetanina con una descarboxilación. Como se observa los porcentajes de área las betacianinas descarboxiladas están en menor proporción que la betanina e isobetanina, siendo la isobetanina el compuesto mayoritario, por lo cual se podría concluir que se presentan en bajos niveles de concentración en el extracto y podrían ser producto del proceso de degradación de la betanina, como lo mencionan en su trabajo Nemzer y colaboradores (Nemzer et al., 2011).

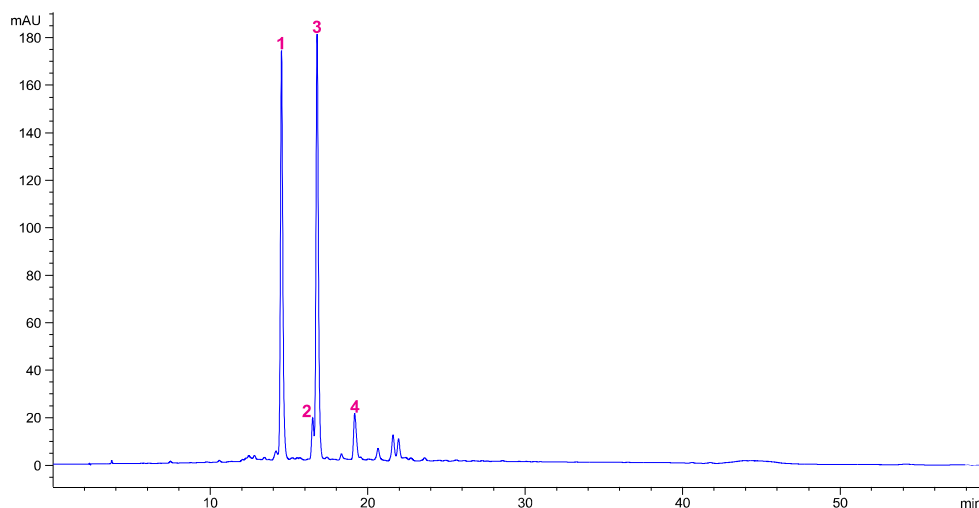


Figura 13. Perfil Cromatográfico a 538 nm del EPOS. Fuente: Esta investigación

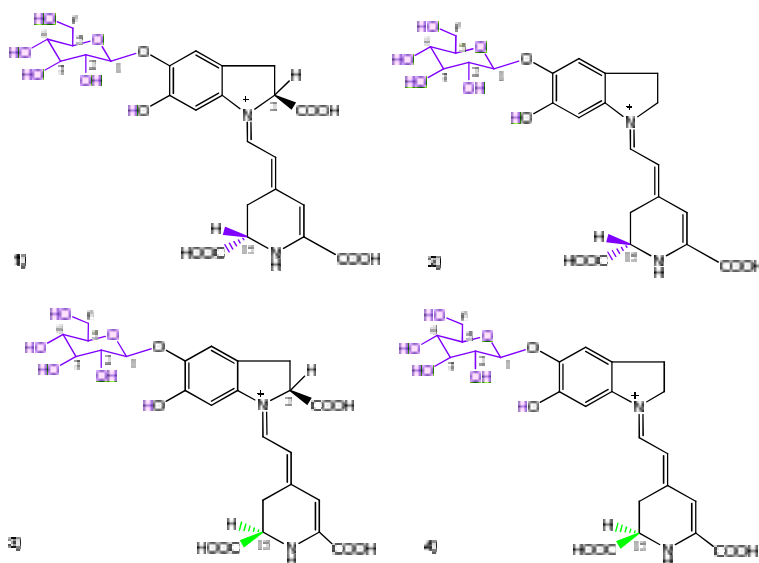


Figura 14. Estructura de las Betacianinas identificadas en EPOS

1) Betanina, 2) descarboxibetanina, 3) isobetanina y 4) descarboxiisobetanina. Fuente:

Modificado de: Khan & Giridhar (2015)

Los anteriores picos tienen máximos de absorción entre 502 y 534 nm, longitudes de onda características de las betacianinas, lo que indica inicialmente que los compuestos identificados en el EPOS son del tipo betacianinas (figura 15). La descarboxibetanina y descarboxiisobetanina presentan un desplazamiento hipsocrómico en sus espectros visibles lo que concuerda con lo reportado para betalainas que presentan una descarboxilación en C-2 (Florian C Stintzing & Carle, 2004).

Además la identidad de los compuestos **1** y **3** concuerda con los estudios realizados por Obón, Díaz-García, & Castellar (2011), quienes identificaron en *Opuntias* de esta misma variedad a la betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina, mientras que M. R. Castellar et al., (2012) identificaron la presencia de betanina, isobetanina y betanidina; J. A. Fernández-López et al., 2002 identificó como compuestos presentes en esta especie a la betanina e isobetanina, y Florian C. Stintzing et al. (2001) a la betanina y neobetanina.

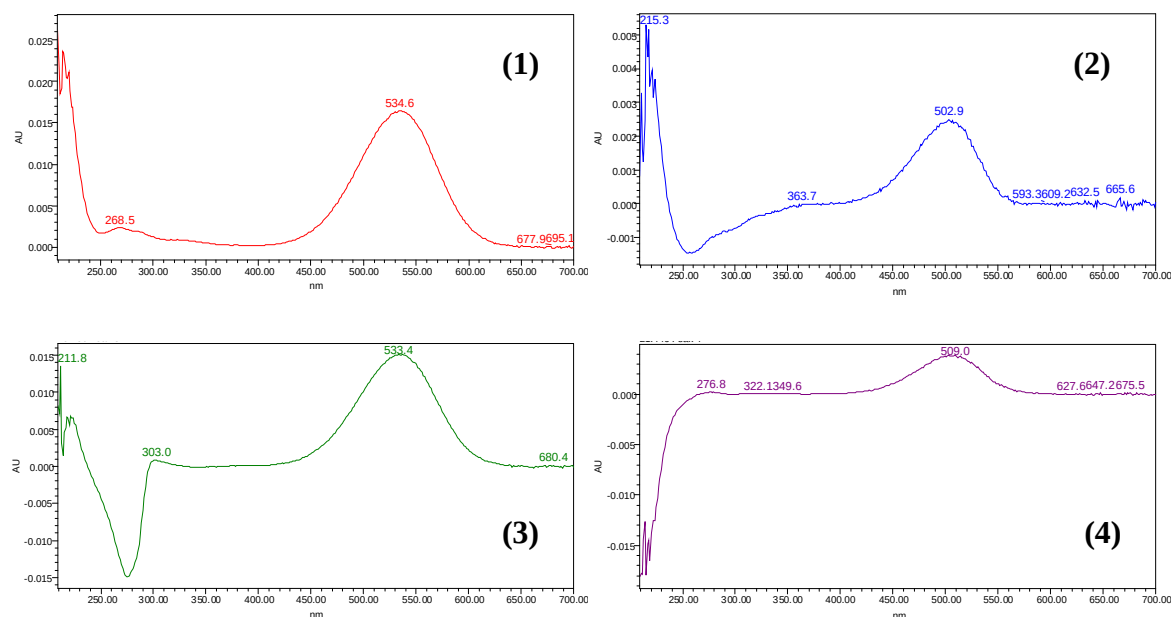


Figura 15. Espectros UV-Vis de los picos cromatográficos del EPOS. Fuente: Esta investigación

El perfil cromatográfico a 538 nm obtenido de la FR de la especie *Opuntia stricta* se muestra en la figura 16. En él se observan un total de 6 picos, de acuerdo a los t_R y a sus espectros UV-Vis (Anexo E) estos fueron identificados tentativamente (tabla 6), 4 de estos compuestos también están presentes en EPOS, adicionalmente se observan dos picos: el pico 5 a 22,61 min con un 19,12% de área total y el pico 6 a 22,97 min con un 9,69% de área y a pesar de que no se lograron identificar por la comparación de los t_R con patrones, al observar su espectro UV-Vis (Figura 17) éste presenta una absorción máxima a 534,6 nm, rango de absorción característico de las betacianinas, por lo cual se infiere que estos dos compuestos podrían ser betalaínas del tipo betacianinas.

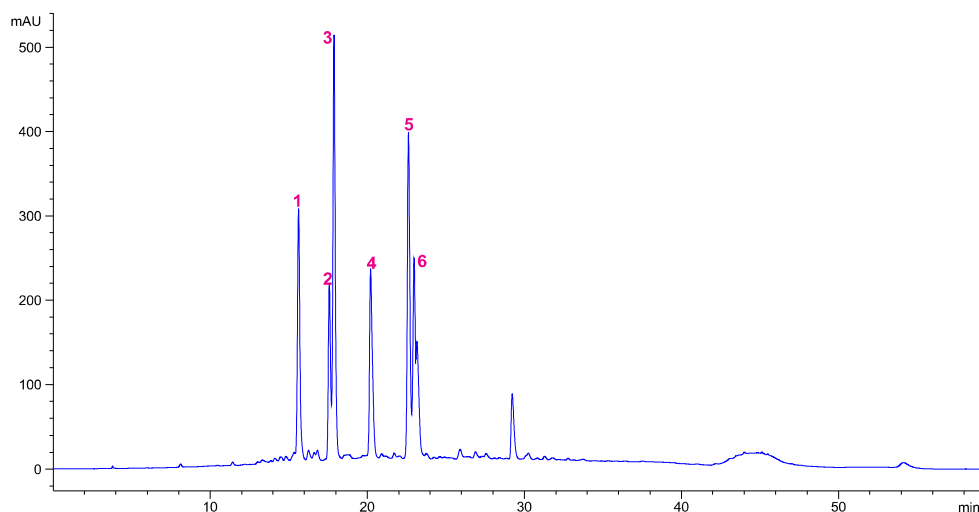


Figura 16. Perfil cromatográfico a 538 nm de la FR de *O. stricta*. Fuente: Esta investigación

Tabla 6. Compuestos identificados en la FROS a 538 nm. Fuente: Esta Investigación.

No. Pico	Nombre del Compuesto	Tiempo de Retención (min)	% Área
1	Betanina	15,62	16,96
2	Descarboxibetanina	17,57	10,94
3	Isobetanina	17,87	28,24
4	Descarboxiisobetanina	20,20	15,05
5	No identificado 1	22,61	19,12
6	No identificado 2	23,15	9,69

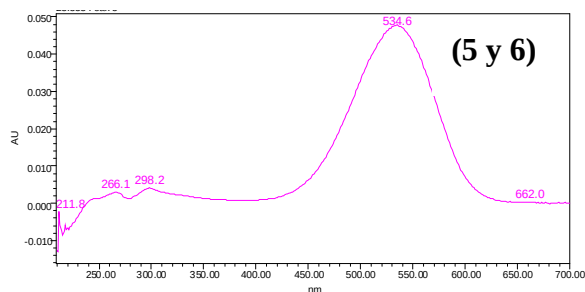


Figura 17. Espectro UV-Vis de los picos 5 y 6 de FROS. Fuente: Esta investigación.

Para esta misma muestra se presenta el cromatograma a 480 nm (Figura 18), en donde se pudo identificar con patrones el pico 7 de acuerdo al t_R (23,15 min) y al espectro Uv-Vis (Anexo F) y se concluye que este pico corresponde a la neobetanina (figura 19) molécula de betanina que presenta una deshidrogenación en los C-14 y C-15; este compuesto muestra un máximo visible similar a las betaxantinas alrededor de 480 nm; sin embargo presenta una estructura similar a las betacianinas (Florian C Stintzing & Carle, 2004). Este pico presenta una intensidad considerable, investigaciones previas han demostrado que este es un constituyente común de varias especies de plantas, como la remolacha roja (Alard, Wray, Grotjahn, Reznik, & Strkkt, 1985); la tuna (Florian C. Stintzing et al., 2005) y la pitaya (Esquivel et al., 2007), sin embargo, también puede ser considerado como un producto de la degradación térmica de betanina durante el procesamiento de las muestras (Nemzer et al., 2011)

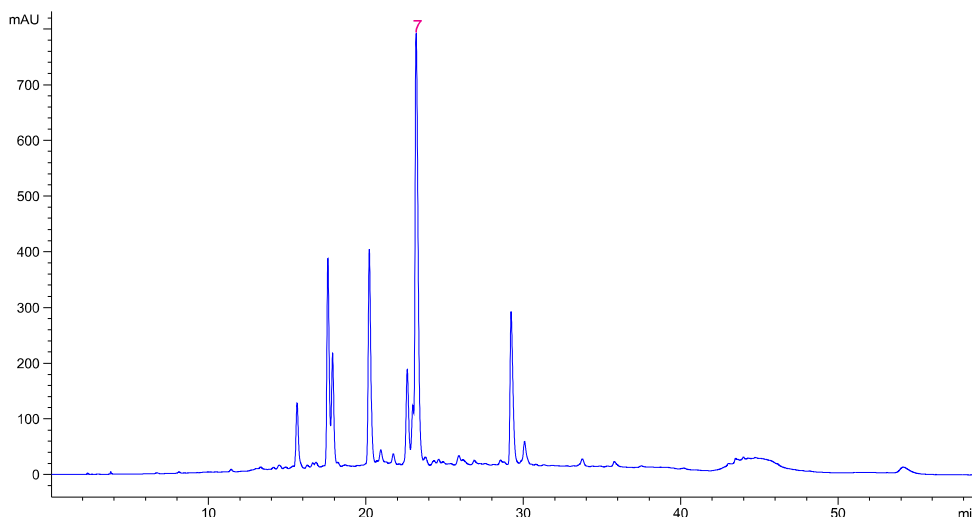


Figura 18. Perfil cromatográfico a 480 nm de la FR de *O. stricta*. Fuente: Esta investigación.

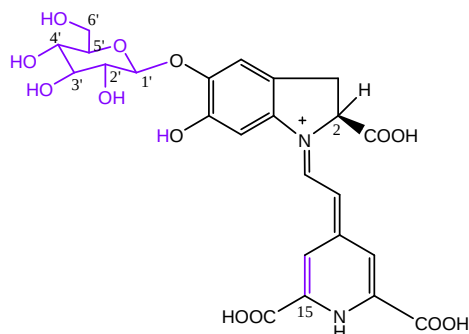


Figura 19. Estructura de la neobetanina, correspondiente al pico 7. Fuente: Modificado de: Florian C. Stintzing et al., (2001)

Teniendo en cuenta los compuestos identificados en la FROS se puede concluir que esta fracción corresponde únicamente a betacianinas lo que es coherente con el color que esta fracción presenta (rojo).

En los perfiles cromatográficos de la fracción amarilla de la *O. stricta* (FAOS), no se identificaron picos con absorbancias a 480 o 538 nm, por lo cual se concluye que en esta fracción no hay presencia significativa de betalainas y que su coloración amarilla es debida posiblemente a otros compuestos fenólicos no identificados, como los flavonoides de tipo chalcona las cuales presentan esta coloración.

Tomando en cuenta lo mencionado, se concluye que los compuestos mayoritarios tipo betalainas en los frutos de cactus *O. stricta*, son la betanina (0,78%), isobetanina (1,3%) y el compuesto desconocido numero 1 (0,88%) lo anterior expresado en g de betacianina en 100 g de extracto purificado.

Por otro lado para la variedad *Opuntia elatior*, el EPOE presentó el cromatograma a 538 nm mostrado en la figura 20, en él se observa la presencia de dos picos mayoritarios, los cuales se identificaron con patrones de acuerdo con sus t_R y espectros Uv-Vis (Anexo G): pico 1 (15,65 min) con un 51,70 % de área que corresponde a la betanina, y el pico 3 (17,90 min) con un porcentaje de área del 32,87 %, el cual corresponde a la isobetanina.

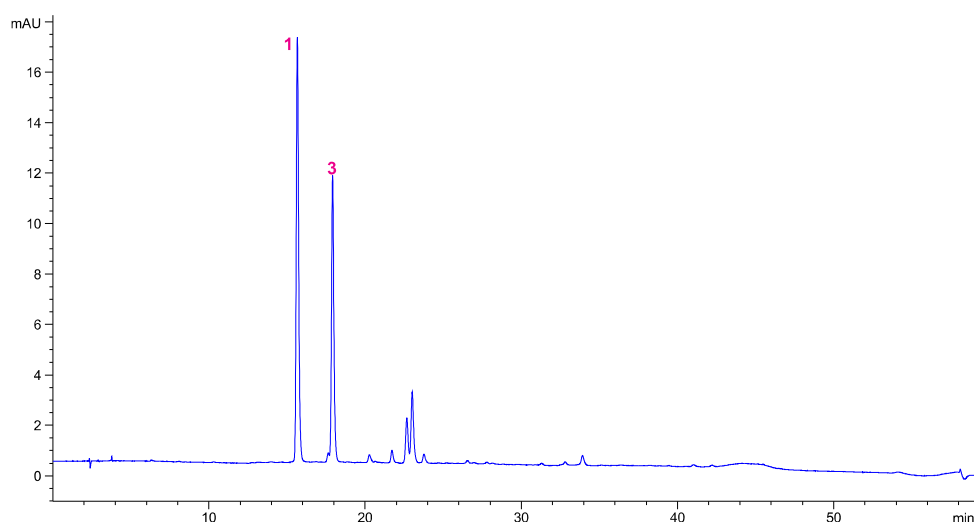


Figura 20. Espectro cromatográfico del EPOE a 538 nm. Fuente: Esta Investigación.

Para el EPOE también se identificó el pico 7 en el cromatograma a 480 nm, con un t_R de 23,00 min (espectro UV-Vis: anexo H), concluyendo que corresponde al compuesto neobetánina, sin embargo, en comparación con los demás picos, su porcentaje de área es menor.

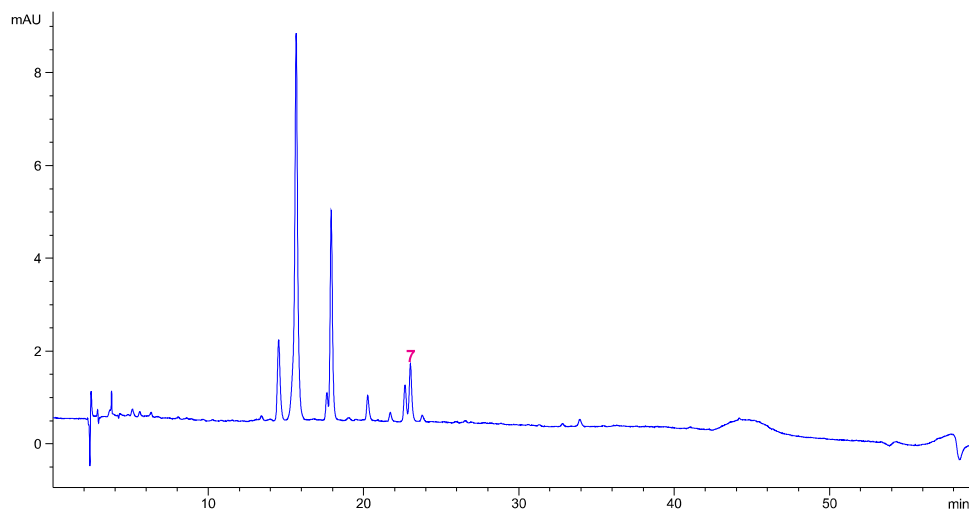


Figura 21. Cromatograma de EPOE a 480 nm. Fuente: Esta investigación.

De acuerdo con lo mencionado los compuestos presentes en EPOE son betanina, isobetánina y neobetánina, las tres betalaínas pertenecientes al grupo de las betacianinas: en trabajos desarrollados con esta especie: Sutariya & Saraf (2016), identificaron y aislaron betanina mientras que S. P. Chauhan et al. (2013) identificó a una betacianina: betanina en una alta concentración y a una betaxantina: indicaxantina en una concentración muy baja.

En el cromatograma a 538 nm mostrado para la FROE (figura 22), se observan 6 picos, de los cuales los 4 primeros fueron identificados (tabla 7) mientras que los dos últimos picos (picos 5 y 6) no se pudieron identificar, cabe resaltar que en cuanto a porcentajes de área estos últimos son los picos mayoritarios en esta muestra.

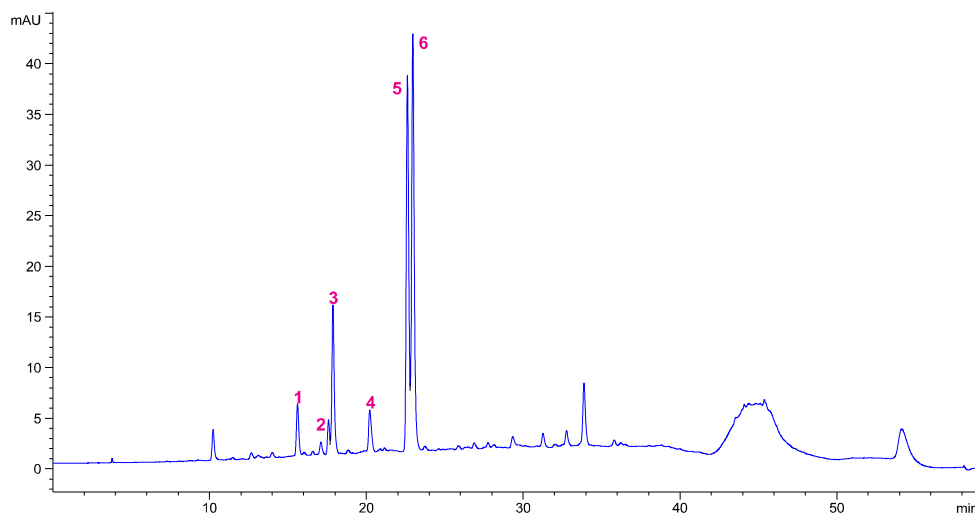


Figura 22. Cromatograma a 538 de la FROE. Fuente: Esta Investigación

Tabla 7. Compuestos identificados en la FROE. Fuente: Esta Investigación.

No. Pico	Nombre del Compuesto	Tiempo de Retención (t_R)	% Área
1	Betanina	15,60	3,93
2	Descarboxibetanina	17,58	2,39
3	Isobetanina	17,86	11,89
4	Descarboxiisobetanina	20,21	3,85
5	No identificado 1	22,61	30,73
6	No identificado 2	22,95	36,39

Como se observó en los espectros Uv-Vis los compuestos identificados son betacianinas (máximos de absorción alrededor de 538nm), lo cual se refleja en el color de la fracción, por tanto, se concluye que la FROE está compuesta mayoritariamente por betacianinas. Es importante considerar que los compuestos identificados en FROS y FROE son los mismos, sin embargo, las betacianinas identificadas en FROS (betanina, descarboxibetanina, isobetanina y descarboxiisobetanina) presentan mayor porcentaje de área que las encontradas en la misma fracción de la otra especie, mientras que los dos compuestos no identificados (picos 5 y 6) en FROE se encuentran en mayor concentración en esta fracción.

La FAOE presentó un cromatograma con algunos picos y estos no presentaron máximos de absorción a 480 nm, por lo cual se descartó la presencia de betaxantinas, que presentan color amarillo y a las cuales se esperaba que se atribuyera el color de esta fracción.

Tomando en cuenta lo mencionado, se concluye que los compuestos mayoritarios tipo betaláinas en los frutos de cactus *O. elatior*, son los compuestos desconocidos número 1 (1,33%) y número 2 (1,57%) lo anterior expresado en g de betacianina en 100 g de extracto purificado.

A continuación en la tabla 8 se resume los compuestos identificados en los extractos purificados y fracciones de las dos especies de *Opuntia* con sus porcentajes de área; la betanina e isobetanina se encuentran en las 4 muestras analizadas (EPOS, FROS, EPOE Y FROE), mientras que la Neobetanina solo se observó en la FROS y EPOE, las fracciones rojas de las dos especies presentan la mayor cantidad de compuestos (7 y 6 respectivamente) de los cuales se lograron identificar 5: betanina, descarboxibetanina, isobetanina, descarboxibetanina y Neobetanina.

Tabla 8. Compuestos identificados en las dos variedades de Cactus. Fuente: Esta Investigación.

No. Pico	Betaláina	<i>Opuntia stricta</i>		<i>Opuntia elatior</i>	
		EP*	FR*	EP*	FR*
1	Betanina ^a	42,30	16,96	51,70	3,93
2	Descarboxibetanina ^a	3,67	10,94	-	2,39
3	Isobetanina ^a	44,24	28,24	32,87	11,89
4	Descarboxiisobetanina ^a	5,37	15,05	-	3,85
5	No identificado 1 ^a	-	19,12	-	30,73
6	No identificado 2 ^a	-	9,69	-	36,39
7	Neobetanina ^b	-	No	No	-
		cuantificada		cuantificada	

* Porcentaje de área, ^a Betacianinas identificadas a 538 nm y ^b Betacianina identificada a 480 nm

4.7. Determinación de fenoles totales

Teniendo en cuenta que los frutos del cactus están enriquecidos en compuestos fenólicos (Florian C. Stintzing et al., 2001; Cota-Sánchez, 2016) a los cuales se les atribuye en parte la actividad antioxidante, estos se cuantificaron en los extractos y fracciones de las dos especies de cactus

(EC, EP, FA Y FR) empleando el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología descrita en la sección 3.7. Para llevar a cabo dicha cuantificación se hizo necesaria la construcción de una curva de calibrado, para lo cual se empleó como patrón ácido gálico (AG). Las concentraciones de dichas soluciones se prepararon en concentraciones de 10 a 180 ppm. Al realizar la reacción se generó una coloración azul característica del reactivo de Folin, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de los compuestos fenólicos. En la tabla 9 se presentan los valores de las absorbancias promedio, junto a sus desviaciones estándar (DE) para un n=3.

Tabla 9. Resultados del método de Folin- Ciocalteu para los patrones de AG. Fuente: Esta Investigación.

Concentración	A^b	DE^c
AG^a (ppm)	Promedio	
10	0,107	0,046
30	0,157	0,047
60	0,268	0,068
100	0,427	0,136
150	0,583	0,029
180	0,632	0,028

^a Ácido gálico, ^b Absorbancia (Promedio de tres replicas), ^c Desviación estándar de tres replicas.

La representación gráfica de la recta de calibrado construida a partir de los datos de la tabla 9, se muestra en la figura 23. Se concluye que para el rango de concentraciones de AG utilizado existe un alto grado de linealidad, que no sólo se aprecia visualmente sino también por medio del coeficiente de correlación de la curva de calibrado el cual es cercano a 1 (r: 0,9954, ver tabla 10) lo que indica una alta relación entre las variables, lo cual se considera estadísticamente significativo, puesto que el valor-P en la ANOVA es menor que 0,05, con un nivel de confianza del 95,0%.

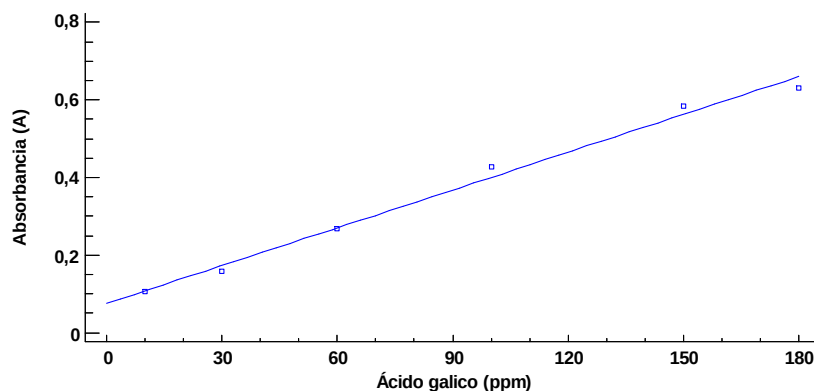


Figura 23. Curva de calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales. Fuente: esta investigación.

La ecuación que describe este ajuste lineal es la siguiente:

$$y (A) = 0,0752 + 0,00325 \text{ Ácido gálico (ppm)}$$

Los parámetros estadísticos, registrados en la tabla 10, permiten inferir que el modelo lineal establecido para la curva de calibración es confiable y puede ser utilizado para estimar la concentración fenólica de las muestras de ensayo por interpolación.

Tabla 10. Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método Folin Ciocalteu. Fuente: Esta Investigación.

Parámetros	Valores
Intercepto (a)	0,0752 ± 0,0166
Pendiente (b)	0,0032 ± 0,0002
Coeficiente de correlación (r)	0,9954
Coeficiente determinación (r ²)	99,0997 por ciento
Valor-P en la ANOVA	0,0000

Tabla 11. Contenido de fenoles totales en los extractos y fracciones obtenidos de los frutos de las dos variedades de Cactus. Fuente: Esta Investigación.

Muestra	Fenoles Totales (mg AG / g Muestra) ± DE ^a
<i>Opuntia stricta</i>	<i>Opuntia elatior</i>

EC	6,896 ± 0,433	3,042 ± 1,439
EP	5,864 ± 0,380	5,606 ± 0,218
FA	2,303 ± 0,058	2,521 ± 0,3511
FR	44,634 ± 0,770	44,641 ± 4,659

^a Desviación estándar de tres mediciones (n = 3).

Se realizó la interpolación y los cálculos para la concentración de fenoles totales en las muestras mencionadas, estos se muestran en la tabla 11. Después de realizar el análisis estadístico haciendo uso del programa *Statgraphics*, mediante la prueba de múltiples rangos para determinar si existen diferencias entre varias medias, en este caso las muestras de la misma especie y entre especies, se obtuvieron los siguientes resultados:

La tabla 12, muestra los resultados de la prueba de múltiples rangos para la especie *Opuntia stricta*, se observa que se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0. Se dice que existen diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras pertenecientes a esta especie con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$) por lo cual la fracción identificada como FROS (color rojo) es la que representa el mayor contenido de compuestos fenólicos (44,641 mg AG/g muestra) seguido del ECOS (6,896 mg AG/ g muestra) y el EPOS (5,864 mg AG/ g muestra).

El mayor contenido fenólico lo presenta la fracción roja, que como se dijo antes está formada mayoritariamente por betacianinas, las cuales presentan en su estructura varios grupos hidroxilo sobre estructuras aromáticas, las cuales aportan positivamente a esta prueba. Mientras que, la fracción amarilla presenta el menor contenido fenólico (2,303 mg AG/ g muestra), cabe destacar que en esta fracción no se identificaron betalainas.

Tabla 12. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones de *Opuntia stricta* (ECOS, EPOS, FAOS, FROS). Fuente: esta Investigación.

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FAOS	3	2,303	X
EPOS	3	5,86367	X
ECOS	3	6,89633	X
FROS	3	44,6343	X

Para la especie *Opuntia elatior* (Anexo I), la tendencia cambia ya que no existen diferencias significativas entre los EC, EP y FA de esta especie, sin embargo, se puede observar que el EC presentó un contenido fenólico ligeramente menor que el EP, que se puede ocasionar por proceso de precipitación de mucílagos, los cuales podrían aportar contenido fenólico al extracto del fruto; la única diferencia significativa está en la fracción identificada como FROE, la cual presenta el mayor contenido fenólico para esta especie (44,641 mg AG/ g muestra). Al hacer la prueba de múltiples rangos para las 8 muestras analizadas (Anexo J) se puede concluir que las fracciones con mayor contenido fenólico en las dos especies fueron las fracciones rojas, enriquecidas con BC, y entre ellas no existen diferencias estadísticamente significativas, en la tendencia le sigue el ECOS, y los EP de las dos especies los cuales tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas, finalmente se encuentran el ECOE, y las FA de las dos especies. De lo anterior se deduce que las fracciones con mayor contenido fenólico son las fracciones rojas y las de menor las fracciones amarillas, esta tendencia se presenta en las dos especies. Lo anterior se puede observar de mejor manera en el diagrama de barras de la figura 24.

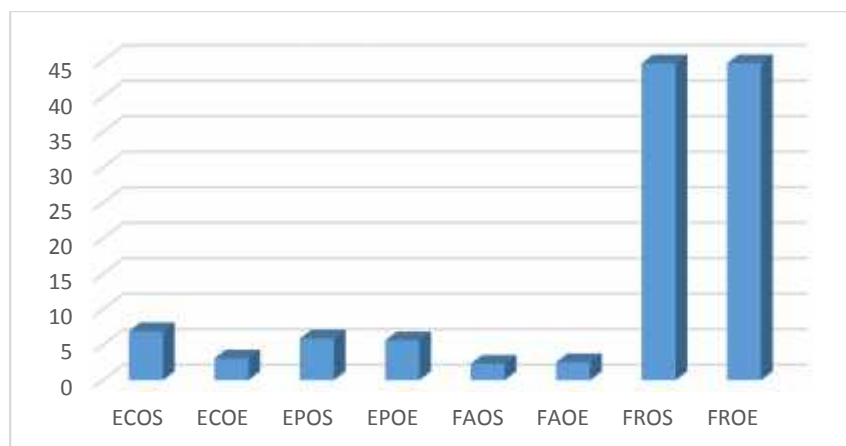


Figura 24. Diagrama de barras del contenido fenólico (mg AG/g Muestra) de extractos y fracciones obtenidos a partir de las tunas de dos variedades de cactus. Fuente: esta investigación.

Al comparar el contenido fenólico en 100 g de fruto fresco de las especies de investigación, con otras especies del mismo género (Tabla 13) se observa que los ECOS y ECOE presentan valores menores al rango presentado por las otras especies, lo anterior puede deberse a características propias de la especie y de su lugar de origen, así como al método de extracción empleado en la investigación.

Tabla 13. Contenido fenólico de extractos crudos en algunas especies del Género *Opuntia*. Fuente: Esta Investigación.

Espece	Fenoles Totales ^a	Método de Extracción / Solvente	Referencia
<i>Opuntia ficus-indica</i>	218,8 ± 2,9	Maceración / agua	Fernández-López et al., 2010
<i>Opuntia undulata</i>	164,6 ± 3,3	Maceración / agua	Fernández-López et al., 2010
<i>Opuntia Dillenii</i>	311,61 ± 12,29	Maceración / agua	Betancourt et al., 2017
<i>Opuntia stricta</i>	204,4 ± 4,2	Maceración / agua	Fernández-López et al., 2010
	42,292 ± 2,657	EAM / etanol 30%	Fuente: esta investigación
<i>Opuntia elatior</i>	56,527 ± 26,735	EAM / etanol 30%	Fuente: esta investigación

^a mg de AG/ 100 g fruta fresca

4.8. Determinación de la capacidad Antioxidante

Debido a la complejidad de las reacciones de los fitoquímicos, las actividades antioxidantes de los alimentos no pueden evaluarse con un solo método; por lo cual, se recomiendan al menos dos métodos de análisis para una mayor autenticidad (Schlesier, Harwat, Böhm, & Bitsch, 2002), es por esta razón que se escogieron dos métodos para determinar la capacidad antioxidante, los cuales son: TEAC y DPPH y se determinaron para los extractos y fracciones de las dos especies de cactus (EC, EP, FA y FR)

4.8.1. Actividad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

En este método los antioxidantes (EC, EP, FA y FR) decoloran al radical ABTS^{•+}, y esa decoloración es la que nos lleva a determinar la capacidad antioxidante equivalente a Trolox, un antioxidante conocido con el que se realiza una curva de calibración; las concentraciones de las soluciones de la curva se prepararon desde 0,4 hasta 3 mM de trolox, una vez reacciona el trolox con el radical, se obtienen diferentes valores de Absorbancia, los cuales se encuentran registrados en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados del método de TEAC con patrones de Trolox. Fuente: Esta Investigación.

Concentración	A ^a	DE ^b
Trolox (mM)	Promedio	
0	0,869	0,010
0,4	0,772	0,009
0,9	0,615	0,012
1,4	0,507	0,015
1,9	0,379	0,028
2,4	0,251	0,054
3	0,132	0,027

^aAbsorbancia (Promedio de tres replicas), ^bDesviación estándar de tres replicas.

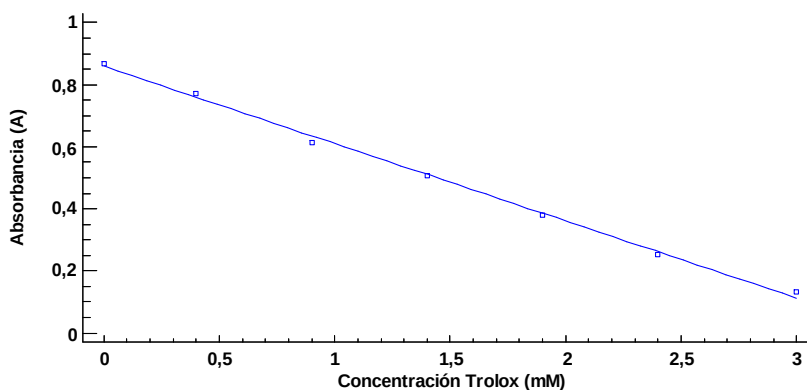


Figura 25. Curva de calibración con trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).

Fuente: esta investigación

Los datos de la tabla 13 se representan gráficamente en la figura 25, obteniendo de ella la ecuación de la regresión lineal mostrada a continuación:

$$y (A) = 0,8591 - 0,2489 \text{ Concentración Trolox (mM)}$$

Los parámetros estadísticos se resumen en la tabla 14. El coeficiente r cercano a -1 indica que existe una correlación relativamente alta e inversa entre las variables (concentración y absorbancia), es decir que a medida que la concentración de antioxidante (trolox) aumenta, la absorbancia del radical ABTS decrece, lo anterior es estadísticamente significativo de acuerdo con el valor-P calculado el cual es menor a 0,05 con un nivel de confianza del 95%. El r^2 es el porcentaje de variación de la variable de respuesta (absorbancia) que explica su relación con la variable predictora (Concentración) en este caso el r^2 indica que el modelo ajustado explica 99,7195% de la variabilidad en la absorbancia. Adicionalmente como control positivo, se determinó la TEAC del ácido ascórbico (un antioxidante de referencia), el cual presentó un valor de TEAC de $1,001 \pm 0,207$ mM Trolox/ g de muestra, que comparado con lo reportado por Re et al., (1999) ($1,05 \pm 0,02$) presenta un error del 5%.

Tabla 15. Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método TEAC. Fuente: Esta investigación.

Parámetros	Valores
------------	---------

Intercepto (a)	0,8591 ± 0,0103
Pendiente (b)	- 0,2489 ± 0,0059
Coefficiente de correlación (r)	- 0,9986
Coefficiente determinación (r²)	99,7195 por ciento
Valor-P en ANOVA	0,0000

Una vez se tiene la ecuación de la regresión lineal, se calculó por interpolación la concentración equivalente a trolox de las muestras a analizar (EC, EP, FA y FR) de las dos especies, datos que se encuentran registrados en la tabla 16.

Tabla 16. Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox de los extractos y fracciones obtenidos de los frutos de las dos variedades de Cactus. Fuente: Esta Investigación.

Muestra	TEAC	
	(mmol Trolox / g Muestra) ± DE^a	
	<i>Opuntia stricta</i>	<i>Opuntia elatior</i>
EC	0,177 ± 0,013	0,206 ± 0,005
EP	0,218 ± 0,040	0,278 ± 0,003
FA	0,070 ± 0,006	0,095 ± 0,001
FR	1,721 ± 0,091	2,235 ± 0,142

^a Desviación estándar de tres replicas.

También se realizó el análisis estadístico de múltiples rangos para los resultados de este ensayo, inicialmente para comparar los valores de TEAC entre muestras de la misma especie y finalmente entre las muestras de ambas especies, así:

Los resultados de la prueba de múltiples rangos para la especie *Opuntia stricta* (Anexo K) muestran que se identificaron 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en 3 columnas. Se concluye entonces que existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p<0,05) entre: la FROS la cual representa la mayor capacidad antioxidante con este método (1,721 mM Trolox/g muestra) seguido de los EPOS y ECOS con valores de 0,218 y 0,177 mM Trolox/g muestra, respectivamente (entre estas muestras no existen diferencias estadísticamente significativas), finalmente se encuentra la FAOS, la cual presentó la menor capacidad antioxidante (0,070 mM Trolox/g muestra).

Para la especie *Opuntia elatior* de acuerdo a la prueba de múltiples rangos (Anexo L) se observa la siguiente tendencia $FR > EP-EC > FA$, se destaca que el valor de TEAC de la FROE es aproximadamente 8 y 11 veces mayor que los valores de TEAC de EP y EC respectivamente, y 24 veces mayor que el valor de TEAC de la fracción amarilla de esta especie, la cual presentó la menor capacidad antioxidante con un valor de 0,095 mM Trolox/g muestra.

Al realizar la comparación entre los extractos y fracciones de las dos especies (Anexo M) se concluye que la muestra más antioxidante es la FROE, seguida por la FROS, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de TEAC de los EP y EC de las dos especies, y las fracciones con menor actividad antioxidante son las FA de las dos especies, lo anterior se puede observar en el diagrama de barras, mostrado a continuación:

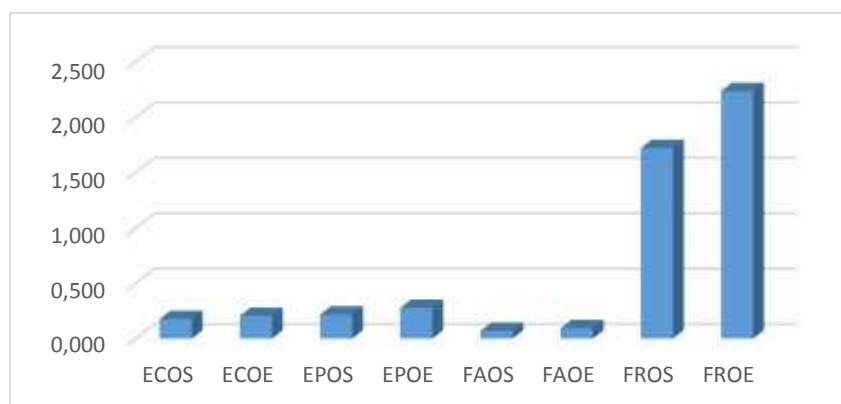


Figura 26. Diagrama de barras de la TEAC de extractos y fracciones obtenidos a partir de las tunas de dos variedades de cactus. Fuente: Esta Investigación.

Fuente: esta investigación

Al realizar la comparación de los valores de TEAC de las especies de estudio, con los valores reportados para otras especies (tabla 17) se concluye que los frutos de *Opuntia stricta* y *Opuntia elatior* tiene una capacidad antioxidante que se encuentra dentro del rango reportado para otras especies del mismo género.

Tabla 17. Valores TEAC para los Extractos crudos de los frutos de algunas variedades del Género *Opuntia*. Fuente: Esta Investigación.

Especie	TEAC ^a	Referencia
<i>Opuntia ficus-indica</i>	6,70 ± 0,73	Fernández-López et al.,

		2010
<i>Opuntia undulata</i>	1,58 ± 0,41	Fernández-López et al.,
		2010
<i>Opuntia Dillenii</i>	0,314 ± 0,003	Betancourt et al., 2017
<i>Opuntia stricta</i>	5,98 ± 0,24	Fernández-López et al.,
		2010
	1,087 ± 0,078	Fuente: esta investigación
<i>Opuntia Elatior</i>	3,823± 0,093	Fuente: esta investigación

^a mmol Trolox/g fruta fresca

Se destaca que la capacidad de captura del radical libre ABTS^{•+} sigue la misma tendencia presentada en el contenido fenólico (FR > EP > EC > FA) para las dos especies: como se observa en el gráfico de la figura 27, con un coeficiente de correlación de r^2 : 0,9988 para la variedad *Opuntia stricta*:

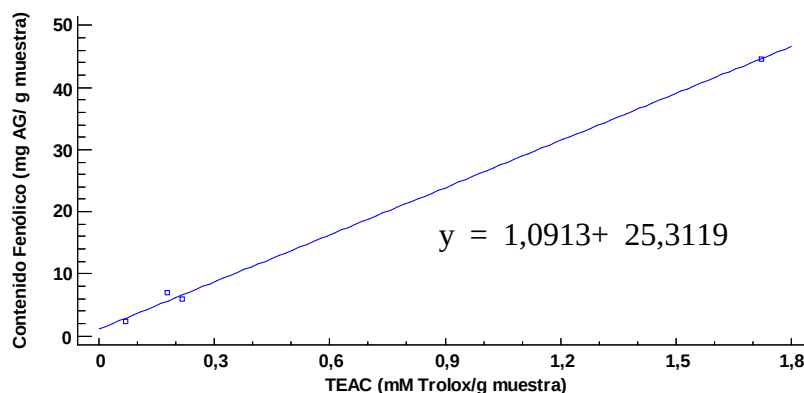


Figura 27. Gráfica de correlación la actividad antioxidante equivalente a Trolox y entre el contenido fenólico, en la especie *Opuntia stricta*. Fuente: esta investigación

La tendencia antes mencionada también se presentó para la variedad *Opuntia elatior* (Anexo N), mostrando un coeficiente de correlación de 0,9994.

4.8.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

Se siguió la metodología descrita en la sección 3.8.2, para este método fue necesario evaluar la capacidad antioxidante de 4 concentraciones de cada una de las muestras a tratar, con estos resultados se realizó la gráfica de absorbancia del % de inhibición del DPPH frente a la

concentración de las muestras, estableciendo así las curvas estándar (curvas dosis-respuesta) que se muestran a continuación:

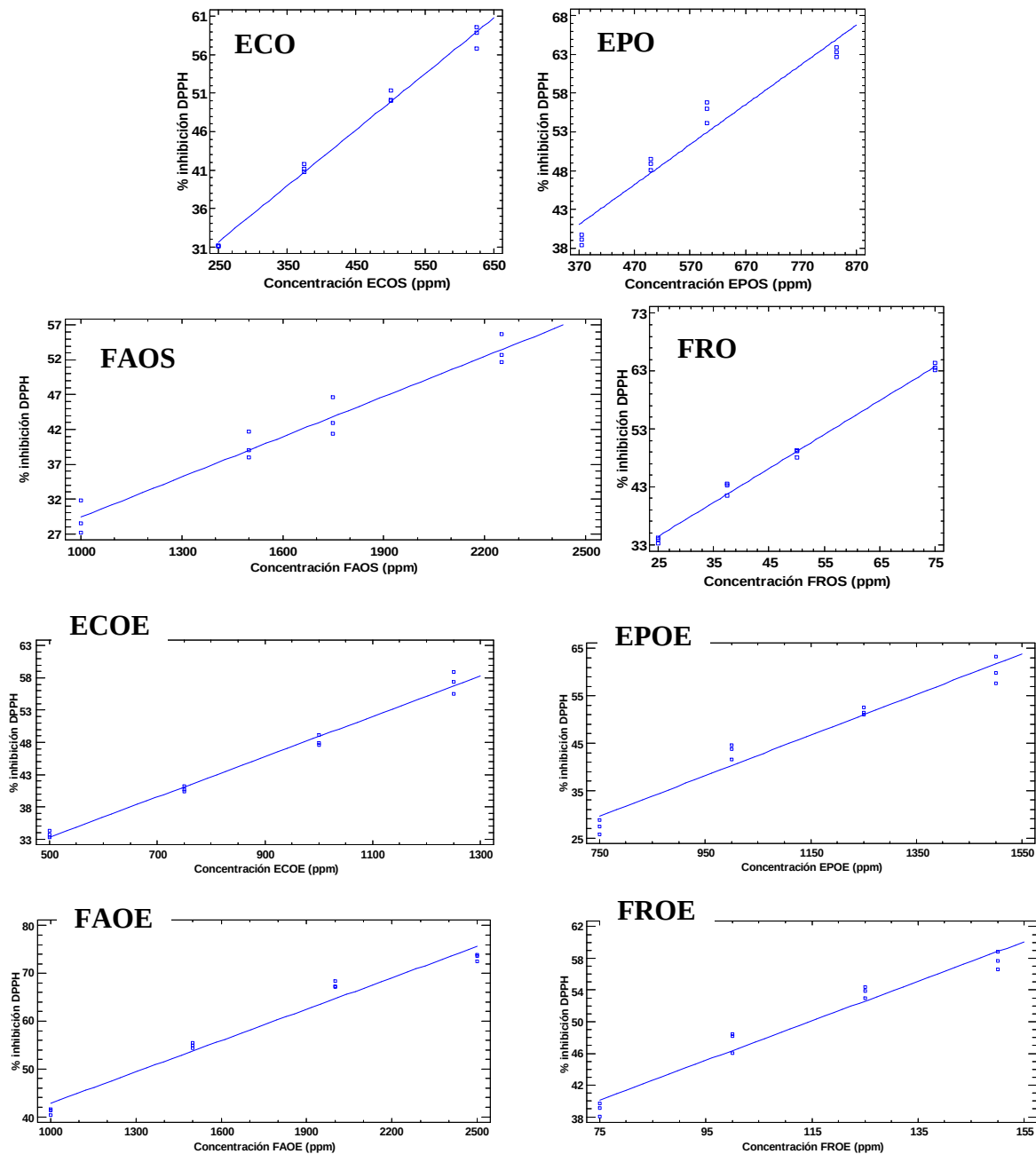


Figura 28. Curvas de Calibración para los extractos y fracciones de las dos especies.

Fuente: Esta Investigación

Tabla 18. Parámetros estadísticos de las curvas de calibración para los extractos (EC y EP) y fracciones de las dos especies (FA y FR). Fuente: Esta Investigación.

Parámetros	<i>Opuntia stricta</i>				<i>Opuntia elatior</i>			
	EC	EP	FA	FR	EC	EP	FA	FR
Intercepto (a)	13,324	21,891	10,109	19,649	17,651	-2,621	20,996	21,430
Desviación estándar (S_a)	0,940	2,421	2,232	0,764	1,002	3,313	2,286	1,866
Pendiente (b)	0,073	0,052	0,019	0,589	0,031	0,043	0,022	0,249
Desviación estándar (S_b)	0,002	0,004	0,001	0,015	0,001	0,003	0,001	0,0161
Coefficiente de correlación (r)	0,9961	0,9709	0,9772	0,9967	0,9939	0,9785	0,9841	0,9798

Modelo lineal, ecuación de la forma % inhibición DPPH = a + b Concentración de muestra (ppm)

Con las ecuaciones de las regresiones lineales, cuyos parámetros se muestran en la tabla 18 se realizó el cálculo del EC₅₀, el cual es una medida ampliamente utilizada para expresar el poder antioxidante para el método de DPPH y se define como la concentración de antioxidante necesaria para disminuir la concentración de DPPH[•] en un 50%. Cuanto menor sea el valor de EC₅₀, mayor será la actividad antioxidante potencial (Cai et al., 2003). Los valores de EC₅₀ calculados están registrados en la tabla 19 y representados gráficamente en la figura 29.

Tabla 19. EC₅₀ de los extractos y las fracciones de las dos especies de cactus. Fuente: Esta Investigación.

Muestra	EC ₅₀ ± DE ^a	
	<i>Opuntia stricta</i>	<i>Opuntia elatior</i>
EC	501,489 ± 11,854	1035,269 ± 26,805
EP	543,843 ± 9,447	1227,077 ± 31,830
FA	2069,709 ± 110,908	1327,806 ± 24,962
FR	51,557 ± 0,513	114,560 ± 3,687

^a Desviación estándar de tres replicas.

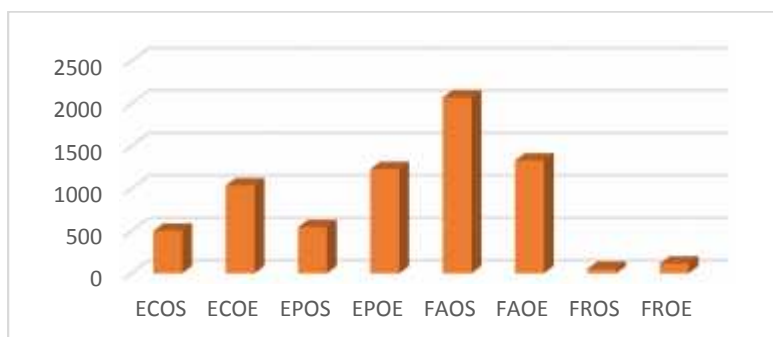


Figura 29. Diagrama de barras de valores de EC₅₀ (ppm) de extractos y fracciones obtenidos a partir de *Opuntia stricta* y *Opuntia elatior*. Fuente: esta investigación

Para las muestras pertenecientes a la variedad *Opuntia stricta* la cual presenta el menor valor de EC₅₀ es decir, la mayor actividad antioxidante fue la FROS, de acuerdo al análisis estadístico (anexo O) existen diferencias significativas entre este valor y los EC₅₀ de ECOS y EPOS y la menor actividad antioxidante la presenta la FAOS. Para la otra variedad los valores de EC₅₀ de las 4 muestras presentan diferencias estadísticamente significativas (Anexo P) presentando la siguiente tendencia FROE < ECOE < EPOE < FAOE, es decir la FR es la más antioxidante y la menos antioxidante la FA. Finalmente se realizó la comparación entre las muestras de las dos especies (Anexo Q), presentando la siguiente tendencia en la actividad antioxidante según el método de DPPH: FROS~FROE > ECOS ~ EPOS > ECOE > EPOE > FAOE > FAOS.

En la tabla 20, se resumen el contenido de BC, el contenido fenólico, y la actividad antioxidante por dos métodos: TEAC y DPPH para cada especie: de donde se concluye que la especie que tiene mayor contenido de betacianinas es la *Opuntia stricta* y las fracciones rojas de ambas especies (FROS y FROE) presentaron mayor contenido fenólico y actividad antioxidante por los dos métodos.

Tabla 20. Contenido de BC, Contenido Fenólico Total y Actividad Antioxidante de Extractos y fracciones de las dos especies de *Opuntia*. Fuente: Esta Investigación.

Extracto / Fracción	Contenido de BC (mg de betanina/g	Contenido Fenólico (mg AG/ g extracto	Actividad antioxidante <i>in vitro</i>	
			TEAC (mmol trolox/ g extracto	DPPH (EC ₅₀ ppm)

	extracto seco)	o fracción)	o fracción)	
ECOS	1,931 ± 0,020	6,896 ± 0,433	0,177 ± 0,013	501,489 ± 11,854
EPOS	1,500 ± 0,006	5,864 ± 0,380	0,218 ± 0,040	543,843 ± 9,447
FAOS	-	2,303 ± 0,058	0,070 ± 0,006	2069,709 ± 110,908
FROS	-	44,634 ± 0,770	1,721 ± 0,091	51,557 ± 0,513
ECOE	0,182 ± 0,005	3,042 ± 1,439	0,206 ± 0,005	1035,269 ± 26,805
EPOE	0,150 ± 0,014	5,606 ± 0,218	0,278 ± 0,003	1227,077 ± 31,830
FAOE	-	2,521 ± 0,351	0,095 ± 0,001	1327,806 ± 24,962
FROE	-	44,641 ± 4,659	2,235 ± 0,142	114,560 ± 3,687

4.9. Estabilidad química de los extractos crudos (EC)

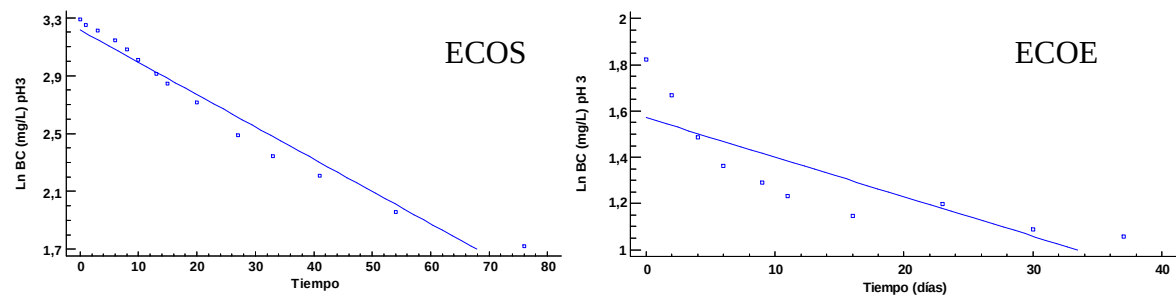
Se evaluó la estabilidad del ECOS y ECOE, frente a factores como: pH a 3, pH del extracto acuoso (ECOS: 4,26 y ECOE: 4,77) y pH 7, en ausencia de luz y presencia de aire, a temperatura ambiente (18°C), durante un período de almacenamiento de 4 meses.

Se graficó el Ln de la concentración de BC (mg/L) en función del tiempo para las diferentes condiciones de almacenamiento para cada especie (Figura 30). Los tratamientos se realizaron por duplicado; se usó el análisis de regresión lineal para obtener la velocidad de degradación (k), representada con la pendiente de la gráfica, los datos se expresan como el valor $\pm$ desviación estándar. El tiempo de vida media se calculó con la siguiente ecuación:

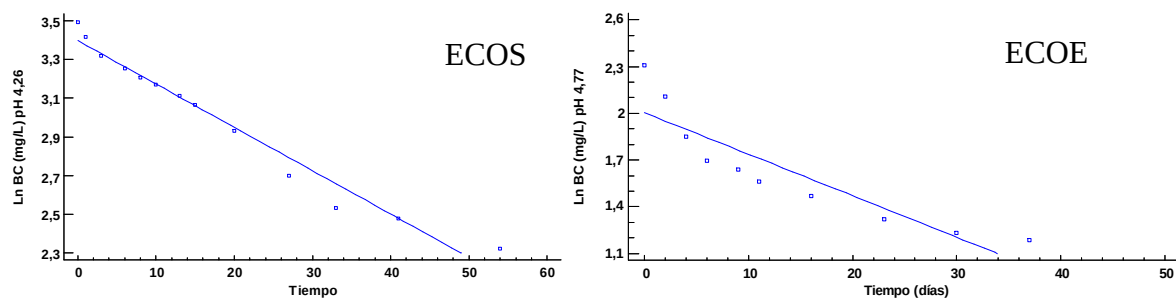
$$t_{1/2} = \ln 0,5 / k$$

Donde $t_{1/2}$ = tiempo de vida media (días); k = constante de velocidad de reacción. En la Figura 30 y la tabla 21 se observa el comportamiento cinético de los extractos ECOS y ECOE, sometidos a las condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente.

a) Almacenamiento a pH 3



b) Almacenamiento a pH de los extractos acuosos (ECOS: 4,26 y ECOE: 4,77)



c) Almacenamiento a pH 7

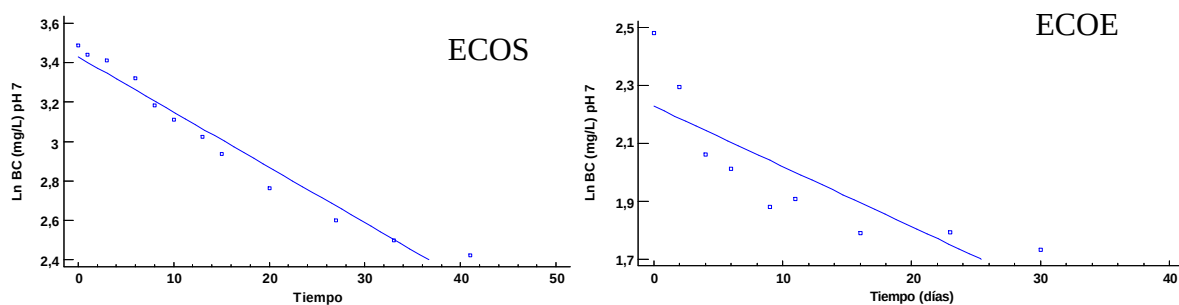


Figura 30. Comportamiento Cinético del proceso de degradación de ECOS y ECOE.

A pH 3, pH de los extractos acuosos y pH 7, en ausencia de luz, presencia de aire y temperatura ambiente (18°C). Fuente: esta investigación.

Tabla 21. Parámetros Cinéticos de degradación de betacianinas para los extractos ECOS y ECOE a diferente pH. Fuente: Esta Investigación.

pH	Extracto	K (10^{-3} Días ⁻¹)	t _{1/2} (Días)
3	ECOS	22,316 ± 1,179	31,061 ± 0,792
	ECOE	17,083 ± 3,885	40,575 ± 1,226

4,26	ECOS	22,360 ± 1,211	30,995 ± 1,627
4,77	ECOE	26,671 ± 4,502	25,989 ± 1,436
7	ECOS	28,052 ± 1,756	24,710 ± 0,782
	ECOE	20,835 ± 5,232	33,268 ± 1,354

De acuerdo a los resultados mostrados, la degradación de las BC de las dos especies, presenta una cinética de primer orden, resultado que está de acuerdo con lo reportado por otras investigaciones (R. Castellar et al., en 2003; M. R. Castellar, Obón, & Fernández-López, 2006 y Rodríguez-Sánchez et al., 2017). Como se observa en la tabla 19, a pH 3 el extracto que presentó mayor estabilidad (menor valor de K y mayor tiempo de vida media) fue el ECOE, para el pH de la solución acuosa el ECOS fue más estable que el ECOE y finalmente a pH 7, el ECOE es más estable. De lo anterior se concluye que el ECOS presenta la mayor estabilidad a pH 3 y 4,26 con un tiempo de vida media de 31 días aproximadamente, lo anterior concuerda con lo reportado por R. Castellar et al., 2003, quienes concluyeron que las betacianinas de *Opuntia stricta* mostraron ser más estables a pH 5; por otro lado, el ECOE fue más estable a pH 3 con un tiempo de vida media de 40 días.

Además, se utilizaron 4 variables respuesta: contenido de Betacianinas, contenido fenólico y actividad antioxidante por el método de TEAC y DPPH, los resultados de este análisis se muestran en la tabla 22 y 23; con cada una de estas variables se realizó análisis de varianza, presentando los resultados que se muestran a continuación:

Tabla 22. Contenido Fenólico y Actividad antioxidante de los ECOS almacenados. Fuente: Esta Investigación.

Tiempo	pH 3				pH 4,26				pH 7			
	CB ^a	CF ^b	TEAC ^c	DPPH ^d	CB ^a	CF ^b	TEAC ^c	DPPH ^d	CB ^a	CF ^b	TEAC ^c	DPPH ^d
0	1,072 ±	2,862 ±	0,163 ±	740,652 ±	1,446 ±	3,174 ±	0,184 ±	689,415 ±	1,338 ±	3,126 ±	0,181 ±	1049,301 ±
	0,046	0,290	0,006	25,090	0,157	0,005	0,003	53,900	0,403	0,305	0,026	128,203
20	0,609 ±	2,606 ±	0,118 ±	842,816 ±	0,758 ±	3,639 ±	0,133±	774,717 ±	0,649 ±	2,813 ±	0,120 ±	2057,685 ±
	0,112	0,392	0,004	90,901	0,170	0,101	0,008	115,717	0,200	0,239	0,001	845,647
92	0,197 ±	2,347 ±	0,104 ±	1011,056 ±	0,302 ±	3,267 ±	0,133 ±	1107,455 ±	0,389 ±	2,354 ±	0,103 ±	-
	0,009	0,247	0,018	40,933	0,012	0,018	0,012	174,325	0,005	0,141	0,015	-
121	0,194 ±	1,426 ±	0,082 ±	1384,136 ±	0,286 ±	2,593 ±	0,097 ±	1234,121 ±	0, 327 ±	1,937 ±	0,074 ±	-
	0,014	0,040	0,006	249,947	0,022	0,036	0,003	39,644	0,057	0,407	0,018	-

^a Contenido de Betacianinas (mg BC/ g EC), ^b contenido fenólico (mg AG/ g EC), ^c mmol trolox/g EC y ^d EC₅₀: ppm

Tabla 23. Contenido Fenólico y Actividad antioxidante de los ECOE almacenados. Fuente: Esta Investigación

Tiempo	pH 3				pH 4,26				pH 7			
	CB ^a	CF ^b	TEAC ^c	DPPH ^d	CB ^a	CF ^b	TEAC ^c	DPPH ^d	CB ^a	CF ^b	TEAC ^c	DPPH ^d
0	0,125 ±	2,401 ±	0,236 ±	1374,690 ±	0,203 ±	2,032 ±	0,229 ±	1212,960 ±	0,239 ±	3,627 ±	0,206 ±	1722,222 ±
	0,013	0,573	0,033	96,940	0,032	0,037	0,009	41,341	0,030	0,345	0,029	46,543
11	0,069 ±	3,334 ±	0,231 ±	1590,220 ±	0,096 ±	3,445 ±	0,226 ±	1487,027 ±	0,135 ±	3,188 ±	0,166 ±	2740,044 ±
	0,001	0,506	0,021	21,606	0,011	0,348	0,010	211,287	0,015	0,450	0,032	180,089
94	0,059 ±	3,794 ±	0,216 ±	1773,465 ±	0,062 ±	4,435 ±	0,217 ±	1792,216 ±	0,127 ±	3,605 ±	0,187 ±	2437,811 ±
	0,007	0,305	0,015	124,541	0,008	0,598	0,006	143,747	0,010	0,330	0,014	158,097
119	0,056 ±	3,555 ±	0,213 ±	2281,865 ±	0,061 ±	4,320 ±	0,215 ±	2252,275 ±	0,128 ±	3,117 ±	0,200 ±	4360,897 ±
	0,010	0,295	0,003	123,891	0,007	0,643	0,006	216,440	0,009	0,541	0,017	220,456

^a Contenido de Betacianinas (mg BC/ g EC), ^b contenido fenólico (mg AG/ g EC), ^c mmol trolox/g EC y ^d EC₅₀: ppm

Para el ECOS, con el análisis de varianza se concluye que tanto el pH como el tiempo de almacenamiento tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de BC ($P < 0,05$) con un nivel de confianza de 95%. Entre los valores medios del contenido de BC para el pH se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) a pH 3 y pH 4,26 y 7, presentándose mayor contenido de BC en los dos últimos valores de pH (anexo R), se debe tener en cuenta que los ensayos se realizaron en presencia de aire, factor que de acuerdo a lo reportado por Attoe & Von Elbe, (1985) tiene un efecto significativo que disminuye el contenido de betalaínas, también se realizaron en ausencia de luz, ya que la presencia de ésta afecta significativamente la estabilidad de las betalaínas (Herbach et al., 2006); entonces bajo estas condiciones y de acuerdo a los resultados para el ECOS durante el almacenamiento por 121 días se presenta mayor estabilidad y por ende mayor contenido de betalaínas a pH del extracto acuoso (4,26) y pH 7.

Para el contenido fenólico, y actividad antioxidante, se realizaron medidas en los días 0, 20, 92 y 121 mostrando los siguientes resultados:

Los análisis de varianza para el contenido fenólico (Anexo S) y TEAC (Anexo T) del ECOS, mostraron que tanto el pH como el tiempo de almacenamiento presentan un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido fenólico y sobre el TEAC (los valores de $P < 0,05$) con un nivel de confianza del 95%. En cuanto al contenido fenólico y el TEAC el mayor valor medio se presentó para pH 4,26, presentando diferencias estadísticamente significativas respecto a pH 3 y 7. Para el análisis de varianza del DPPH (Anexo U) para este extracto se encontró que ni el pH ni el tiempo de almacenamiento presentan efecto significativo sobre el valor del EC_{50} , cabe destacar que en la parte experimental a tiempo de almacenamiento 92 y 121 días las soluciones de ECOS a pH 7, tomaron un color café el cual afectó la medida de absorbancia (absorbancia mayor que el control) para el método de DPPH, por lo cual estos dos valores no se tuvieron en cuenta en el análisis de resultados.

En el análisis de varianza para el ECOE (Anexo V) se encontró que tanto el pH como el tiempo de almacenamiento tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de BC ($P < 0,05$) con un nivel de confianza de 95%. Entre los valores medios del contenido de BC a los tres niveles de pH se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$), presentándose mayor contenido de BC a pH 7, seguido de pH 4,77 y finalmente pH 3. Para el contenido

fenólico, y actividad antioxidante, se realizaron medidas en los días 0, 20, 92 y 121 mostrando los resultados:

En el análisis de varianza para el contenido fenólico del ECOE (Anexo W) ni el pH ni el tiempo afectan significativamente (los valores de $P < 0,05$; con un nivel de confianza del 95%) este parámetro, esto debido a que el contenido fenólico en los 3 valores de pH y en el tiempo en el que fueron almacenados presentó la misma tendencia, inicialmente de aumento y después de disminución. Caso contrario a lo sucedido en el TEAC, al analizar esta variable (Anexo X), se obtuvo que el tiempo no afecta significativamente la actividad antioxidante del ECOE por este método, mientras que el pH si lo hace, presentando un valor medio mayor a pH 3 y 4,77. Finalmente al evaluar los valores de EC_{50} obtenidos (Anexo Y), se tiene que estos se ven afectados significativamente tanto por el pH como por el tiempo de almacenamiento, presentando los menores valores de EC_{50} y por tanto la mejor actividad antioxidante a pH 3 y 4,77.

Al tomar en cuenta todos los parámetros evaluados, se concluye que las condiciones en las que las BC en extractos son más estables, obtiene el mayor contenido de BC, contenido fenólico y la mayor actividad antioxidante en los métodos TEAC y DPPH son: para el ECOS: este extracto se debe almacenar a pH de solución acuosa (4,26) y entre menor sea el tiempo de almacenamiento mayores serán los valores inicialmente mencionados. Para el ECOE el pH más adecuado para su almacenamiento es el pH de la solución acuosa (4,77) ya que presenta el segundo valor más alto en el contenido de BC, en cuanto a contenido fenólico éste no se ve afectado ni por el tiempo ni por el pH y la actividad antioxidante por los dos métodos presenta los mejores valores a pH 4,77.

4.10. Estabilidad de los Extractos crudos Encapsulados

Se evaluó la estabilidad de los extractos crudos encapsulados: EEOS y EEOE, en presencia de aire, ausencia de luz y temperatura ambiente (18°C), para lo cual se determinó el contenido de BC, el contenido fenólico y la actividad antioxidante por el método TEAC, los resultados se muestran en la tabla 24. No se determinó la actividad antioxidante por el método de DPPH ya que en este método se utiliza una solución de DPPH en etanol al 80%, solución que generó un precipitado en las muestras lo cual interfirió en la medida de absorbancia. Debido a la poca cantidad de extractos encapsulados (EEOS: 0,800 g y EEOE: 0,600 g), no fue posible realizar un

duplicado de los ensayos, por tanto, se tomó una medida para la determinación de cada parámetro.

Tabla 24. Contenido de BC, Contenido Fenólico Total y Actividad Antioxidante de Extractos encapsulados de las dos especies de *Opuntia*. Fuente: Esta Investigación.

Extracto	Tiempo de almacenamiento (días)	Contenido de BC (mg de betanina/g extracto seco)	Contenido Fenólico (mg AG/ g extracto o fracción)	TEAC (mmol trolox/ g extracto o fracción)
EEOS	0	0,506	0,948 ± 0,202	0,063 ± 0,003
	7	0,452	0,931 ± 0,018	0,052 ± 0,001
	14	0,488	0,747 ± 0,090	0,053 ± 0,001
	21	0,477	1,054 ± 0,054	0,062 ± 0,004
	35	0,462	0,957 ± 0,090	0,063 ± 0,007
	49	0,488	1,085 ± 0,049	0,064 ± 0,007
	77	0,494	0,957 ± 0,090	0,063 ± 0,007
	92	0,471	1,460 ± 0,108	0,070 ± 0,003
	116	0,464	1,393 ± 0,511	0,063 ± 0,001
EEOE	0	0,081	1,737 ± 0,080	0,104 ± 0,013
	7	0,120	1,561 ± 0,043	0,103 ± 0,006
	35	0,113	1,611 ± 0,081	0,100 ± 0,009

De acuerdo a los resultados, se deduce que la encapsulación de los extractos mantiene a los pigmentos (betalaínas) protegidos del ambiente, lo cual genera que su concentración, en este caso contenido de BC (mg de betanina/g extracto encapsulado) no presente cambios significativos durante el tiempo de almacenamiento (EEOS: 116 días y EEOE: 35 días), dicha tendencia también se evidenció con el contenido fenólico y la actividad antioxidante por el método de TEAC, de lo anterior se concluye que la encapsulación es un buen método para estabilizar a las betalaínas frente a factores ambientales que favorecen su degradación, como lo

es la presencia de aire, lo cual concuerda con lo reportado por autores como Obón, Castellar, Alacid, & Fernández-López (2009) para otras especies del género *Opuntia*.

CONCLUSIONES

Mediante Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC- DAD) y el uso de estándares fue posible identificar en los extractos y fracciones de los frutos de cactus *Opuntia stricta* Haw, *O. stricta* 5 betacianinas: Betanina (0,78%), Descarboxibetanina (0,50 %), Isobetanina (1,30 %), Descarboxiisobetanina (0,69 %) y Neobetanina (no cuantificada) (g de betacianina en 100 g de extracto purificado) y en *Opuntia elatior* Mill 5 betacianinas: Betanina (0,17%), Descarboxibetanina (0,10 %), Isobetanina (0,51%), Descarboxiisobetanina (0,17 %) y Neobetanina (no se cuantificó). De esta manera, la betacianina mayoritaria para las dos especies se asignó como Isobetanina. En general, para cada betacianina se identificó su correspondiente isómero.

En las dos especies estudiadas, se realizó la cuantificación únicamente del contenido de betacianinas, ya que no se presentó un máximo de absorción a 480 nm (longitud característica de las betaxantinas) por lo cual se infiere que las betaxantinas se encontraban en cantidades pequeñas. La especie que presentó mayor contenido de betacianinas fue la *Opuntia stricta* con un valor de $11,842 \pm 0,124$ mg de betanina/100 g fruto fresco.

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos crudos (ECOS y ECOE), purificados (EPOS y EPOE) y las dos fracciones (FAOS, FAOE, FROS y FROE) de cada especie frente a los radicales ABTS y DPPH demostró que las fracciones rojas de las dos especies (en donde se identificaron principalmente betacianinas) fueron las más activas para capturar radicales libres, seguido por el EP, EC y FA en las dos especies. Adicionalmente se evidenció el mismo orden decreciente en los resultados de contenido fenólico.

Se determinaron los valores de pH más favorables para el almacenamiento de los extractos crudos acuosos de las dos especies (teniendo en cuenta el mayor tiempo de vida media y menor constante de velocidad), para el ECOS el pH óptimo fue 3 y 4,26, con un $t_{1/2}$:31 días; mientras que para el ECOE fue pH 3 $t_{1/2}$: 40 días, en ausencia de luz y presencia de aire a 18°C. Los mayores valores de contenido fenólico y actividad antioxidante (TEAC y DPPH) se obtuvieron cuando los dos extractos se encontraban al pH de su solución acuosa (ECOS: 4,26 y ECOE: 4,76)

La microencapsulación es un buen método para estabilizar a las betalaínas frente a factores ambientales que aceleran su degradación, como lo es la presencia de aire, ya que al almacenar los encapsulados de las dos especies: EEOS y EEOE durante 116 y 35 días respectivamente (ausencia de luz y presencia de aire a 18°C), no se observaron diferencias en el contenido de betacianinas, contenido fenólico y valor TEAC.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar la identificación de los compuestos 5 y 6, mayoritarios en la FROE, mediante técnicas como HPLC/MS; dichos compuestos pueden contribuir a la alta capacidad antioxidante y contenido fenólico que presenta esta fracción. Así como de las fracciones amarillas de ambas especies.

Realizar un estudio detallado de la estabilidad de los microencapsulados frente a otros factores de almacenamiento que también afectan la degradación de betalaínas como: temperatura y presencia de luz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alard, D., Wray, V., Grotjahn, L., Reznik, H., & Strkkt, D. (1985). Neobetanin : Isolation And Identification From Beta Vulgaris. *Phytochemistry*, 24(10), 2383–2385.
- Anderson, E., Aquino- Pérez, G., Barbera, G., Basile, F., Salem, H., Bobich, E., ... Casas, A. (2002). *Cacti Biology and uses*. (P. S. Nobel, Ed.). Berkeley, Los Angeles, Londres.
- Arnold, L. E., Lofthouse, N., & Hurt, E. (2012). Artificial Food Colors and Attention-Deficit/Hyperactivity Symptoms: Conclusions to Dye for. *Neurotherapeutics*, 9(3), 599–609. <http://doi.org/10.1007/s13311-012-0133-x>
- Attoe, E. ., & Von Elbe, J. . . (1985). Oxygen Involvement in Betanine Degradation : Effect of Antioxidants, 50, 106–110.
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2365–2376. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x>
- Bastos, E. L., & Goncalves, L. C. P. (2017). Microwave-Assisted Extraction of Betalains. In *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 245–268). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-809380-1.00009-7>
- Benavides P, D. S. (2017). Estudio químico comparativo de los extractos de betalainas aislados por extracción tradicional con disolventes y radiación de microondas a partir de los frutos de dos especies de cactus colombiano. Universidad de Nariño.
- Betancourt, C., Cejudo-bastante, M. J., Francisco, J., & Hurtado, N. (2017). Pigment composition and antioxidant capacity of betacyanins and betaxanthins fractions of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl) Haw cactus fruit. *Food Research International*. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.007>
- Bhupinder, Singh & Bahadur, S. H. (2014). Chemical composition, functional properties and processing of Beetroot —a review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, Volume 5, 5(1), 679–684. Retrieved from <http://www.ijser.org/researchpaper\Chemical-composition-functional-properties-and->

- Braga, M. E. M., Seabra, I. J., Dias, A. M. A., & Sousa, H. C. (2013). Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products. In *Natural Product Extraction Principles and Applications* (pp. 231–284). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00021-8>
- Brand-Wiliams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30, 25–30.
- Burrows, A. (2009). Palette of Our Palates: A Brief History of Food Coloring and Its Regulation. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 8, 394–408.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294. <http://doi.org/10.1021/jf030045u>
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2005). HPLC Characterization of Betalains from Plants in the Amaranthaceae. *Journal of Chromatographic Science*, 43, 454–460.
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R., & Corke, H. (1998). Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse Amaranthus species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2063–2070. <http://doi.org/10.1021/jf9709966>
- Cardoso-Ugarte, G. A., Sosa-Morales, M. E., Ballard, T., Liceaga, A., & San Martín-González, M. F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 276–282. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.025>
- Castellanos- Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5758–5764.
- Castellar, M. R., Obón, J. M., & Fernández-López, J. A. (2006). The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of*

- the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 122–128. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2285>
- Castellar, M. R., Solano, F., & Obón, J. M. (2012). Betacyanin and Other Antioxidants Production During Growth of *Opuntia stricta* (Haw.) Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67(4), 337–343. <http://doi.org/10.1007/s11130-012-0316-y>
- Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2772–2776. <http://doi.org/10.1021/jf021045h>
- Castro-Muñoz, R., Barragán-Huerta, B. E., & Yáñez-Fernández, J. (2015). Use of gelatin-maltodextrin composite as an encapsulation support for clarified juice from purple cactus pear (*Opuntia stricta*). *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 242–248. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.042>
- Chauhan, S. P., Sheth, N. R., Rathod, I. S., Suhagia, B. N., & Maradia, R. B. (2013). Phytochemical Screening of Fruits of *Opuntia elatior* mill. *American Journal of Pharmtech Research*, 3(2), 1–16.
- Chauhan, S. P., Sheth, N. R., & Suhagia, B. N. (2015). Analgesic and Anti-inflammatory action of *Opuntia elatior* Mill fruits. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 6(2), 75. <http://doi.org/10.4103/0975-9476.159025>
- Chauhan, S., Sheth, N., Jivani, N., Rathod, I., & Shah, P. (2010). Biological actions of *Opuntia* species. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 1(2), 146. <http://doi.org/10.4103/0975-8453.75064>
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Abert, M., Tamara, A., & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Analytical Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.021>
- Choo, W. S. (2018). Betalains: Application in Functional Foods. In J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Bioactive Molecules in Food* (pp. 1–28). http://doi.org/doi.org/10.1007/978-3-319-54528-8_38-1
- Cota-Sánchez, J. H. (2016). Nutritional Composition of the Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) Fruit. In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 691–712). Elsevier Inc.

<http://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00028-3>

- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. ., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments : Carotenoids , Anthocyanins , and Betalains — Characteristics , Biosynthesis , Processing , and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289.
- Díaz Medina, E. M., Rodríguez Rodríguez, E. M., & Díaz Romero, C. (2007). Food Chemistry Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits. *Food Chemistry*, 103, 38–45. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.064>
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Schini-Kerth, V. B., & Rimbach, G. (2015). Betanin-A food colorant with biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*. <http://doi.org/10.1002/mnfr.201400484>
- Esquivel, P. (2004). Los Frutos de las Cactáceas y su Potencial como Materia Prima. *Agronomía Mesoamericana*, 15(2), 215–219.
- Fathordoobady, F., Mirhosseini, H., Selamat, J., & Manap, M. Y. A. (2016). Effect of solvent type and ratio on betacyanins and antioxidant activity of extracts from *Hylocereus polyrhizus* flesh and peel by supercritical fluid extraction and solvent extraction. *Food Chemistry*, 202, 70–80. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.121>
- Fernández-López, J. A., Almela, L., Obón, J. M., & Castellar, R. (2010). Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 253–259. <http://doi.org/10.1007/s11130-010-0189-x>
- Fernández-López, J. A., Castellar, R., Obón, J. M., & Almela, L. (2002). Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia*, 56(9–10), 591–595. <http://doi.org/10.1007/BF02497675>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.
- Galati, E. M., Mondello, M. R., Giuffrida, D., Dugo, G., Miceli, N., Pergolizzi, S., & Taviano, M. F. (2003). Chemical Characterization and Biological Effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L .) Mill . Fruit Juice: Antioxidant and. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25 mL), 4903–4908.

- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2010). Stabilization of the bioactive pigment of opuntia fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10646–10652. <http://doi.org/10.1021/jf101695f>
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural Plant Pigments with Potential Application in Functional Foods. *LWT - Food Science and Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- Georgiev, V., Ilieva, M., Bley, T., & Pavlov, A. (2008). Betalain production in plant in vitro systems. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(5), 581–593. <http://doi.org/10.1007/s11738-008-0170-6>
- Harivaindaran, K. V., Rebecca, O. P. S., & Chandran, S. (2008). Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <http://doi.org/10.3923/pjbs.2008.2259.2263>
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain Stability and Degradation — Structural and Chromatic Aspects. *Journal of Food Science and Technology*, 71(4), 41–50. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x>
- Huang, A. S., & Von Elbe, J. H. (1987). Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine, 52(6), 1689–1693.
- Itankar, P. R., Sontakke, V. A., Tauqueer, M., & Charde, S. S. (2014). Antioxidant potential and its relationship with polyphenol content and degree of polymerization in *Opuntia elatior* Mill. fruits. *AYU*, 35(4), 423–427. <http://doi.org/10.4103/0974-8520.159010>
- Kanarek, R. B. (2011). Artificial food dyes and attention deficit hyperactivity disorder. *Nutrition Reviews*, 69(7), 385–391. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00385.x>
- Kanner, J., Harel, S., & Granit, R. (2001). Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178–5185. <http://doi.org/10.1021/jf010456f>
- Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, 197, 1280–1285.

<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>

- Khan, M. I., & Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *PHYTOCHEMISTRY*, 117, 267–295. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.008>
- Kotadiya, R., Patel, U. D., Chauhan, V. B., Patel, H. B., Chirag, M., Bhatt, P. R., ... Husbandry, A. (2017). In-vitro antioxidant and antidiabetic activity of hydro alcoholic extract of *Opuntia elatior* fruit as well as quercetin, 6(2), 1028–1035.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos 1. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 25(4), 726–732.
- Manchali, S., Murthy, K. N. C., Nagaraju, S., & Neelwarne, B. (2013). Stability of Betalain Pigments of Red Beet. In *Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications* (pp. 55–74). New York: Springer Science+Business Media New. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-3458-0>
- Martins, N., Roriz, L. C., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. (2017). Coloring attributes of betalains: a key emphasis on stability and future applications. *Food & Function*, 1–46. <http://doi.org/10.1039/C7FO00144D>
- Matkowski, A. (2008). Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advances*, 26(6), 548–560. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1996). Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS•+ Radical Cation Assay. *Free Radical Research*, 26, 195–199.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2), 211–219.
- Moreno, D. A., García-Viguera, C., Gil, J. I., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 261–280. <http://doi.org/10.1007/s11101-007-9084-y>
- Nemzer, B., Pietrzkowski, Z., Spórna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michalowski, T., & Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root

- (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chemistry*, 127(1), 42–53. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.081>
- Obón, J. M., Castellar, M. R., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2009). Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *Journal of American History*, 90(2), 471–479. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.07.013>
- Obón, J. M., Díaz-García, M. C., & Castellar, M. R. (2011). Anthocyanin-betacyanin fingerprinting and detection of synthetic red pigment adulteration, for Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 760–771. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.03.012>
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., & Osorio, C. (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 187, 174–181. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.090>
- Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Osorio, C., & Nazareno, M. A. (2016). Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food Chemistry*, 202, 373–382. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.115>
- Parra, R. / U. N. del C. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63(2), 5669–5684. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/25055/37055>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J.Agric.Food Chem*, 53, 4290–4302. <http://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Ramyashree, M., Shivabasavaiah, & H, K. R. (2012). Ethnomedicinal value of *Opuntia elatior* fruits and its effects in mice. *Journal of Pharmacy Research*, 5(8), 4554–4558.
- 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 Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237.
- Reynoso, R., Garcia, F. A., Morales, D., & Mejia, E. G. (1997). Stability of betalain pigments from a Cactacea Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2884–2889. <http://doi.org/10.1021/jf960804r>
- Robert, P., Torres, V., García, P., Vergara, C., & Sáenz, C. (2015). The encapsulation of purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) pulp by using polysaccharide-proteins as encapsulating agents. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 1039–1045. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.038>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26. <http://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
- Rodriguez-amaya, D. B. (2018). Betalains (pp. 1–6). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21607-7>
- Rodríguez-sánchez, J. A., Cruz, M. T., & Barragán-huerta, B. E. (2017). Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus* : Stability and use in food. *Food REsearch*, 91, 63–71. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.023>
- Sáenz, C., Cancino, B., & Robert, P. (2012). Red betalains from *Opuntia* spp: Natural colorants with potential applications in foods. *Israel Journal of Plant Sciences*, 60, 291–299. <http://doi.org/10.1560/IJPS.60.2.291>
- Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M. R., Martin-Martinez, E. S., & Zepeda, L. G. (2013). Extraction, Stability, and Separation of Betalains from *Opuntia joconostle* cv. Using Response Surface Methodology. *Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11995–12004. <http://doi.org/10.1021/jf401705h>
- Schlesier, K., Harwat, M., Böhm, V., & Bitsch, R. (2002). Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research*, 36(2), 177–187. <http://doi.org/10.1080/10715760290006411>
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15(1), 19–38. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.004>

- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., ... Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442–451. <http://doi.org/10.1021/jf048751y>
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2001). Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *European Food Research and Technology*, 212(4), 396–407. <http://doi.org/10.1007/s002170000219>
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002). Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry*, 77(1), 101–106. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00374-0](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00374-0)
- Stintzing, F. C., 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(8), 2302–2307. <http://doi.org/jf011305f> [pii]
- Stintzing, F., Schieber, A., & Carle, R. (2003). Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology*, 216, 303–311. <http://doi.org/10.1007/s00217-002-0657-0>
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247–269. [http://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00564-2](http://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2)
- Sutariya, B., & Saraf, M. (2016). Betanin, isolated from fruits of *Opuntia elatior* Mill attenuates renal fibrosis in diabetic rats through regulating oxidative stress and TGF- β pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.048>
- Technologies, A. (2007). Guía de selección de columnas Agilent ZORBAX para HPLC. Alemania.
- Veggi, P. C., Martinez, J., & Meireles, M. A. A. (2013). Fundamentals of Microwave Extraction. In *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice* (pp. 15–52). New York: Springer Science+Business Media. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3>

Vergara, C., Saavedra, J., Sáenz, C., García, P., & Robert, P. (2014). Microencapsulation of pulp and ultrafiltered cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) extracts and betanin stability during storage. *Food Chemistry*, 157, 246–251. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.037>

Von Elbe, J. ., Maing, I.-Y., & Amundson, C. H. (1974). Color stability of betanin, 39, 334–337.

ANEXOS

Anexo A. Coloración azul característica de la reacción de Folin Ciocalteu para la determinación del contenido fenólico



Anexo B. Coloración azul característica de la reacción del radical ABTS con los antioxidantes



Anexo C. Carta del herbario



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL-29
Bogotá D.C., 06 de febrero de 2017

Señores
Nelson Humberto Hurtado
Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica muestras

Cordial Saludo,

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

Nombre	FAMILIA	Nº. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Opuntia stricta</i> (Haw.) Haw.	CACTACEAE	595149	Nelson Hurtado Gutiérrez et al.	01	J. L. Fernández-Alonso/2017
<i>Opuntia elaeagnifolia</i> Mill.	CACTACEAE	595148	Nelson Hurtado Gutiérrez et al.	02	J. L. Fernández-Alonso/2017

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

Cordialmente,

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano -COL
E-mail: herbacol_fcboq@unal.edu.co

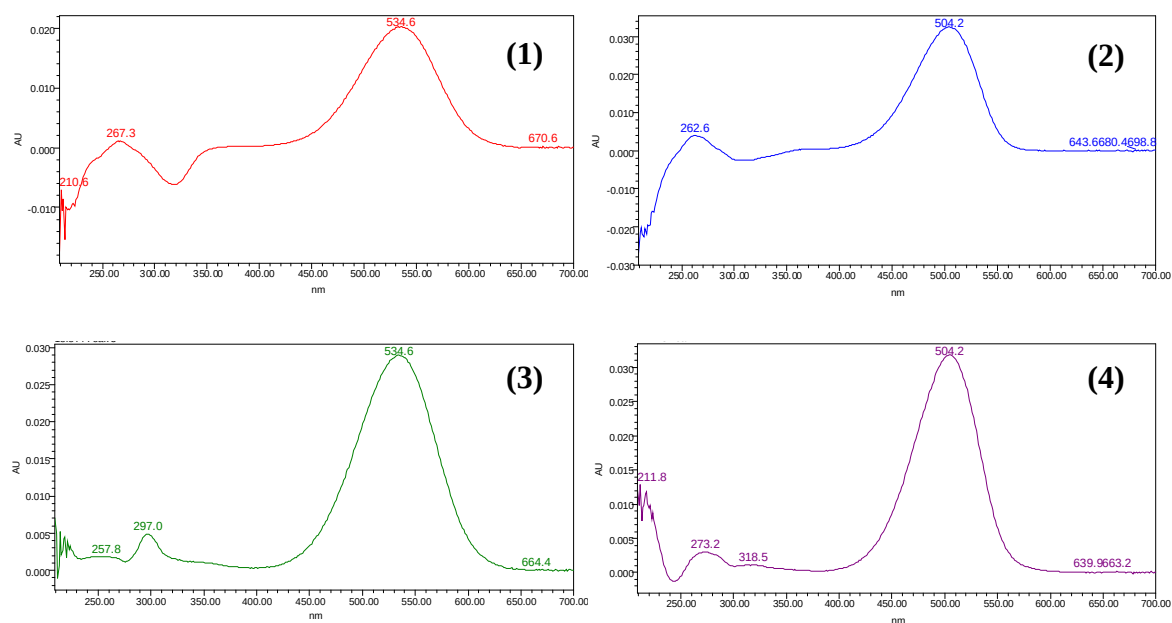
Univ. Andino 122
Bogotá, Colombia

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222
Commutador: (57-1) 316 8000 Ext. 11538 - 11518 Fax: 11538
Correo electrónico: herbacol_fcboq@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

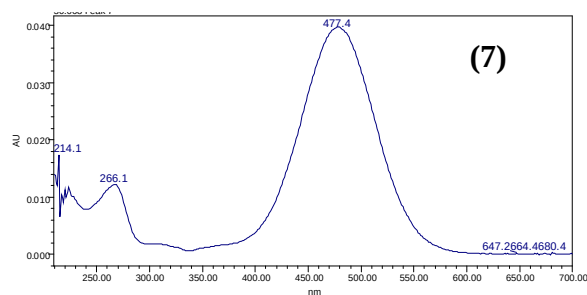
Anexo D. Tiempos de Retención de los patrones de Betalaínas.

Tiempo retención (min)	Compuesto
15.62	Betanina
17.57	Descarboxibetanina
17.87	Isobetenina
20.20	Descarboxiisobetanina
23.15	Neobetanina (480 nm)

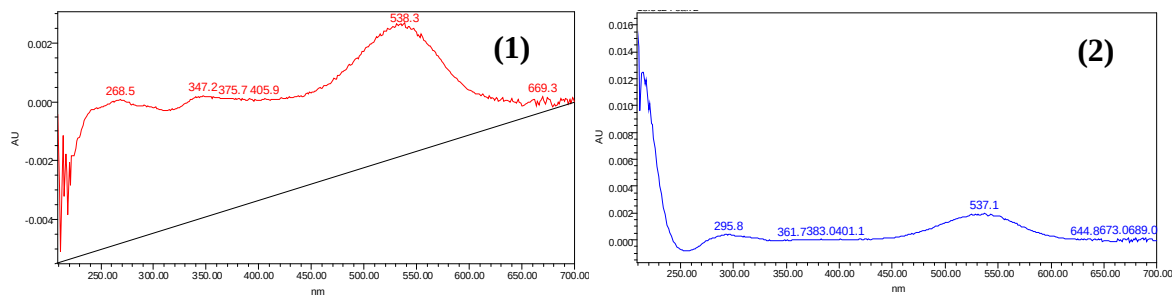
Anexo E. Espectros UV-Vis de los picos cromatográficos de la FROS.



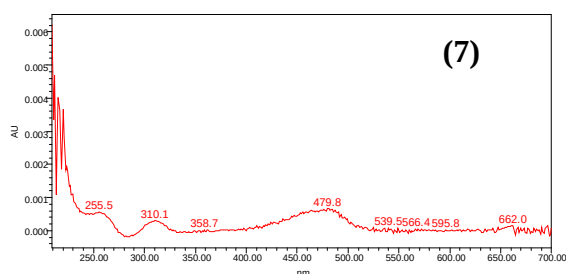
Anexo F. Espectro UV-Vis del pico 7 de la FROS.



Anexo G. Espectros UV- Vis de los picos identificados en EPOE



Anexo H. Espectro UV-Vis del pico 7 del EPOE



Anexo I. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones de *Opuntia elatior* (ECOE, EPOE, FAOE, FROE).

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra.	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FAOE	3	2,52033	X
ECOE	3	3,04267	X
EPOE	3	5,606	X
FROE	3	44,641	X

Anexo J. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones de las dos variedades de cactus

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FAOS	3	2,303	X

FAOE	3	2,52033	X
ECOE	3	3,04267	XX
EPOE	3	5,606	XX
EPOS	3	5,86367	XX
ECOS	3	6,89633	X
FROS	3	44,6343	X
FROE	3	44,641	X

Anexo K. Prueba de Múltiple Rangos para la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) en los extractos y fracciones de *Opuntia stricta* (ECOS, EPOS, FAOS, FROS).

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FAOS	3	0,0706667	X
ECOS	3	0,177333	X
EPOS	3	0,218	X
FROS	3	1,72133	X

Anexo L. Prueba de Múltiple Rangos para la TEAC en los extractos y fracciones de *Opuntia elatior* (ECOE, EPOE, FAOE, FROE).

Método: 95,0 porcentaje LSD

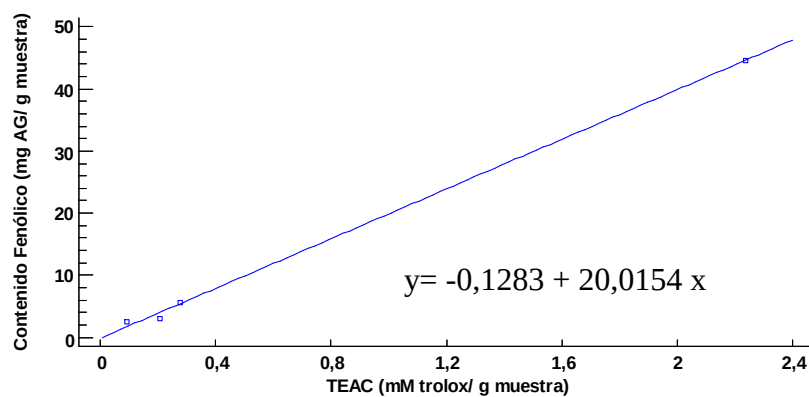
	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FAOE	3	0,0946667	X
ECOE	3	0,205667	XX
EPOE	3	0,277333	X
FROE	3	2,23567	X

Anexo M. Prueba de Múltiple Rangos para la TEAC en los extractos y fracciones de las dos variedades de cactus.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FAOS	3	0,0706667	X
FAOE	3	0,0946667	XX
ECOS	3	0,177333	XX
ECOE	3	0,205667	X
EPOS	3	0,218	X
EPOE	3	0,277333	X
FROS	3	1,72133	X
FROE	3	2,23567	X

Anexo N. Gráfica de correlación la actividad antioxidante equivalente a Trolox y entre el contenido fenólico, en la especie *Opuntia elatior*



Anexo O. Prueba de Múltiple Rangos para la Actividad Antioxidante por el método de DPPH en los extractos y fracciones de *Opuntia stricta* (ECOS, EPOS, FAOS, FROS).

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FROS	3	51,543	X
ECOS	3	501,86	X
EPOS	3	543,706	X
FAOS	3	2069,46	X

Anexo P. Prueba de Múltiple Rangos para la Actividad Antioxidante por el método de DPPH en los extractos y fracciones de *Opuntia elatior* (ECOE, EPOE, FAOE, FROE).

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FROE	3	114,56	X
ECOE	3	1036,28	X
EPOE	3	1227,08	X
FAOE	3	1327,32	X

Anexo Q. Prueba de Múltiple Rangos para la Actividad Antioxidante por el método de DPPH en los extractos y fracciones de las dos variedades de cactus.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FROS	3	51,543	X
FROE	3	114,56	X
ECOS	3	501,86	X
EPOS	3	543,706	X
ECOE	3	1036,28	X
EPOE	3	1227,08	X
FAOE	3	1327,32	X
FAOS	3	2069,46	X

Anexo R. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido de BC en el ECOS almacenado.

Análisis de Varianza para Contenido de Betacianinas - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	0,20967	2	0,104835	37,69	0,0000

B:Tiempo	5,07777	15	0,338518	121,69	0,0000
RESIDUOS	0,0834552	30	0,00278184		
TOTAL (CORREGIDO)	5,3709	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Contenido de Betacianinas por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	16	0,621062	0,0131858	X
7	16	0,753125	0,0131858	X
4,26	16	0,768188	0,0131858	X

Anexo S. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en el ECOS almacenado.

Análisis de Varianza para Contenido Fenólico - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	1,56042	2	0,780208	13,85	0,0056
B:Tiempo	2,21446	3	0,738154	13,11	0,0048
RESIDUOS	0,337891	6	0,0563152		
TOTAL (CORREGIDO)	4,11277	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Contenido Fenólico por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	4	2,31025	0,118654	X
7	4	2,5575	0,118654	X

4,26	4	3,16825	0,118654	X
------	---	---------	----------	---

Anexo T. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el TEAC del ECOS almacenado.

Análisis de Varianza para TEAC - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón -F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	0,000940167	2	0,000470083	9,28	0,0146
B:Tiempo	0,0131727	3	0,00439089	86,71	0,0000
RESIDUOS	0,000303833	6	0,0000506389		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0144167	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para TEAC por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	4	0,11675	0,00355805	X
7	4	0,1195	0,00355805	X
4,26	4	0,13675	0,00355805	X

Anexo U. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante por el método de DPPH del ECOS almacenado.

Análisis de Varianza para DPPH - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	839232,	2	419616,	5,70	0,0675

B:Tiempo	657440,	3	219147,	2,97	0,1598
RESIDUOS	294653,	4	73663,3		
TOTAL (CORREGIDO)	1,4949E6	9			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para DPPH por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4,26	4	951,427	135,705	X
3	4	994,665	135,705	X
7	2	1764,64	214,568	X

Anexo V. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido de BC en el ECOE almacenado.

Análisis de Varianza para Contenido Betacianinas - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	0,0322225	2	0,0161112	98,70	0,0000
B:Tiempo	0,0430652	13	0,00331271	20,29	0,0000
RESIDUOS	0,00424419	26	0,000163238		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0795318	41			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Contenido Betacianinas por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	14	0,0730714	0,00341465	X
4,77	14	0,0965	0,00341465	X

7	14	0,139929	0,00341465	X
---	----	----------	------------	---

Anexo W. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en el ECOE almacenado.

Análisis de Varianza para Contenido fenólico - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	0,167178	2	0,0835891	0,21	0,8158
B:Tiempo	2,64347	3	0,881156	2,22	0,1864
RESIDUOS	2,3804	6	0,396733		
TOTAL (CORREGIDO)	5,19104	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Contenido fenólico por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
3	4	3,271	0,314934	X
7	4	3,38425	0,314934	X
4,77	4	3,558	0,314934	X

Anexo X. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para el TEAC del ECOS almacenado.

Análisis de Varianza para TEAC - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	0,00293617	2	0,00146808	9,94	0,0125
B:Tiempo	0,000571	3	0,000190333	1,29	0,3610

RESIDUOS	0,0008865	6	0,00014775		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00439367	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para TEAC por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	4	0,18975	0,00607762	X
4,77	4	0,22175	0,00607762	X
3	4	0,224	0,00607762	X

Anexo Y. Análisis de Varianza y Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante por el método de DPPH del ECOS almacenado.

Análisis de Varianza para DPPH - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH	3,20488E6	2	1,60244E6	8,68	0,0169
B:Tiempo	3,66938E6	3	1,22313E6	6,63	0,0248
RESIDUOS	1,10749E6	6	184581,		
TOTAL (CORREGIDO)	7,98175E6	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para DPPH por pH

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4,77	4	1686,12	214,815	X
3	4	1755,06	214,815	X
7	4	2815,24	214,815	X