

BETALAÍNAS DEL FRUTO DE PITAYA AMARILLA (*Selenicereus megalanthus*):
IDENTIFICACIÓN, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.

ANGÉLICA MARÍA DELGADO JURADO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015

BETALAÍNAS DEL FRUTO DE PITAYA AMARILLA (*Selenicereus Megalanthus*):
IDENTIFICACIÓN, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.

ANGÉLICA MARÍA DELGADO JURADO

Trabajo de Grado presentado al comité curricular del departamento de Química
como requisito parcial para optar el título de Químico

Director
NELSON HUMBERTO HURTADO GUTIERREZ
Ph. D. en Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2015

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo son de responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1º del acuerdo No 324 del 11 de Octubre de 1996, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de Aceptación

Nelson Humberto Hurtado Gutierrez
Director

Silvia Cruz Sánchez
Jurado

Juan José Lozada Castro
Jurado

Pasto, Noviembre del 2015

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada en primer lugar a Dios por estar siempre presente en mi vida, a mi familia: mis padres “Álvaro y Margoth”, mis tíos “Livio y Fanny” que son unos segundos padres para mí, mi abuelito “Gerardo”, y mis hermanos “David, Santiago, Pablo y María”, ustedes han sido los principales promotores de mis sueños, brindándome su apoyo absoluto en cada momento de mi vida. A mi abuelita María que a pesar de nuestra distancia física, siempre está conmigo cuidándome desde el cielo.

Angelica.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi apoyo incondicional

A mi director, Dr. Nelson Hurtado por su apoyo y orientación en el transcurso de esta investigación

A la Vicerrectoría de investigaciones, posgrados y relaciones internacionales (VIPRI), de la Universidad de Nariño, por el apoyo financiero para la realización de esta investigación.

A los profesores del departamento de química por haber aportado en mi formación académica.

Al personal de la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño, por su colaboración, en especial, a los químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez.

A mis padres “Álvaro y Margoth”, mis tíos “Livio y Fanny”, mis abuelitos Gerardo y María y mis hermanos, David, Santiago, Pablo y María, por su apoyo incondicional, en cada momento de mi vida.

A mis amigos con quienes pude compartir momentos gratos en la carrera, Natalia, Maritza, Daniela, Ángela, Jesica, Francisco, Erwin, Franklin...

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	23
1. OBJETIVOS	25
1.1 OBJETIVO GENERAL	25
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
2. ESTADO DEL ARTE.....	26
3. MARCO TEÓRICO	31
3.1 FAMILIA DE LAS CACTÁCEAS	31
3.1.1 Cactáceas trepadoras.....	32
3.1.2 Tunas (<i>Opuntia spp.</i>)	32
3.1.3 Pereskias (columnares)	33
3.2 PITAYA AMARILLA	33
3.2.1 Taxonomía y características del fruto	33
3.2.2 Madurez del fruto.	35
3.2.3 Distribución geográfica y temporada de mayor distribución.....	35
3.3 BETALAÍNAS.....	36
3.3.1 Estructura Química	36
3.3.1.1 Betacianinas	37
3.3.1.1.1 Neobetacianinas y derivados.....	39
3.3.1.2 Betaxantinas	40

3.3.2 Biosíntesis.....	42
3.3.3 Métodos de extracción, separación y purificación de betalaínas	44
3.3.4 Métodos de detección y caracterización de betalaínas.....	47
3.3.5 Factores Que Afectan La Estabilidad De Las Betalaínas	49
3.3.5.1 Estructura del pigmento	50
3.3.5.2 Efecto del pH	50
3.3.5.3 Actividad del agua (A_w)	51
3.3.5.4 Efecto del oxígeno y agentes antioxidantes.....	52
3.3.5.5 Efecto de cationes metálicos y agentes quelantes	52
3.3.5.6 Efecto de la luz	53
3.3.5.7 Temperatura	53
3.3.6 Actividad antioxidante	55
3.3.6.1 Método TEAC	56
3.3.6.1.1 Oxidación de betalaínas por el radical ABTS.....	57
3.3.7 Fenoles totales.....	58
3.4 OTROS TIPOS DE PIGMENTOS NATURALES.....	59
3.4.1 Clorofilas	59
3.4.2 Carotenoides.....	60
3.4.3 Flavonoides.....	61
3.4.3.1 Antocianinas	63
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
4.1 RECOLECCIÓN MATERIAL VEGETAL	64

4.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	65
4.3 ENSAYOS PRELIMINARES	65
4.4 EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS.....	66
4.4.1 Obtención extracto crudo (ECM) con metanol acidificado	66
4.4.2 Obtención extracto crudo (ECA) con acetato de etilo	66
4.5 PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS.....	67
4.5.1 Purificación extracto crudo ECM.....	67
4.5.2 Purificación extracto crudo ECA	68
4.6 ANÁLISIS POR HPLC ANALÍTICO.....	68
4.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE MASAS (HPLC-MS-ESI)	69
4.8 PURIFICACIÓN DEL PIGMENTO MAYORITARIO POR HPLC-SEMI PREPARATIVA.....	69
4.9 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis.....	70
4.10 DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO RMN- ¹ H PARA EL COMPONENTE MAYORITARIO	70
4.11 FENOLES TOTALES	70
4.12 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> POR EL MÉTODO TEAC	71
4.13 ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS.....	72
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	74
5.1 PIGMENTOS TIPO BETALAÍNA	74
5.1.1 Ensayos preliminares.....	74

5.1.2 Características iniciales del fruto de pitaya amarilla (<i>Selenicereus megalanthus</i>).....	75
5.1.3 Extracción y purificación de los pigmentos tipo betalaína.....	75
5.1.4 Análisis por HPLC modo analítico del extracto EPM.....	76
5.1.5 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).....	78
5.1.6 Separación del compuesto mayoritario 2 por HPLC en modo semipreparativo.....	81
5.1.7 Elucidación Estructural.....	82
5.1.7.1 Compuesto 2.....	82
5.1.7.2 Compuesto 5.....	86
5.1.7.3 Compuesto 8.....	87
5.1.7.4 Compuestos no identificados.....	89
5.1.8 Fenoles totales.....	91
5.1.9 Determinación de la actividad antioxidante <i>in-vitro</i> por el método ABTS	93
5.1.10 Estabilidad.....	96
5.2 PIGMENTOS TIPO CAROTENOIDE.....	101
CONCLUSIONES.....	104
PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	105
RECOMENDACIONES.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	107
ANEXOS.....	119

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Algunas especies de plantas productoras de betalaínas en el orden de caryophyllales	26
Tabla 2. Algunas cactáceas de mayor comercialización y su ubicación geográfica	31
Tabla 3. Tiempos de retención, datos espectroscópicos y de espectrometría de masas de productos de degradación de Hilocerenina	55
Tabla 4. Clasificación de los flavonoles	62
Tabla 5. Tiempos de retención y porcentajes de área de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto EPM	77
Tabla 6. Masas moleculares ($[M+H]^+$) de los compuestos identificados	79
Tabla 7. Masa molecular ($[M+H]^+$) y λ_{max} de algunas betaxantinas reportadas	80
Tabla 8. Desplazamientos químicos de los protones del azúcar de betanina, filocactina e hilocerenina, reportados en la literatura	84
Tabla 9. Características de compuestos encontrados en la cáscara de pitaya amarilla	91
Tabla 10. Resultados de la prueba de Folin Ciocalteau con patrones de ácido gálico	92
Tabla 11. Contenido de fenoles totales de los extractos ECM y EPM	92
Tabla 12. Cantidad de fenoles totales en algunas frutas de la familia de las cactáceas	93
Tabla 13. Decoloración del catión radical ABTS con patrones de trolox	94
Tabla 14. Resultados de TEAC para los de los extractos estudiados y el patrón ácido ascórbico	95

Tabla 15. Actividad antioxidante (TEAC) de algunas frutas de la familia de las cactáceas	96
Tabla 16. parámetros cinéticos de degradación de betalainas para los extractos ECM y EPM en diferentes condiciones de almacenamiento	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. (a) Planta de pitaya amarilla (<i>Selenicereus megalanthua</i>); (b) cladodios; (c) flor; y (d) fruto	34
Figura 2. Partes del fruto de pitaya amarilla	35
Figura 3. Tabla de color de pitaya amarilla	35
Figura 4. Estructura química del ácido betalámico	36
Figura 5. Estructura química de la betalaína	37
Figura 6. Estructura de betanina y betanidina	38
Figura 7. Estructura de la isobetanina e isobetanidina	38
Figura 8. Estructura de Hilocerenina.....	38
Figura 9. Estructura de la Filocactina.....	39
Figura 10. Estructura de neobetacianinas	41
Figura 11. Estructura de la indicaxantina.....	41
Figura 12. Estructura de la (a) Vulgaxantina I; (b) Vulgaxantina II.....	40
Figura 13. Estructura de Miraxantina III y V.....	42
Figura 14. Ruta biosintética de betalaínas.....	43
Figura 15. Ruta biosintética de betalaínas a partir de derivados de dopamina en raíces de <i>Beta bulgaris</i>	44
Figura 16. Estructura de la resina XAD-7	46
Figura 17. Estructura fase C-18.....	47
Figura 18. Desplazamiento químico por RMN ⁻¹ H de betanina.....	48
Figura 19. Desplazamiento químico por RMN ⁻¹ H de indicaxantina	49

Figura 20 Factores que rigen la estabilidad de las betalainas	50
Figura 21. Hidrólisis de betanina en ácido betalámico y ciclodopa-5-O-glucósido.....	51
Figura 22. Rutas frecuentes de descarboxilación y deshidrogenación de betanina que ocurran posiblemente.....	54
Figura 23. ABTS. Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico	56
Figura 24. Formación del catión radical ABTS.....	57
Figura 25. Oxidación de betanina por acción del catión radical ABTS.....	58
Figura 26. Estructura química clorofila <i>a</i> y <i>b</i>	59
Figura 27. Estructura química carotenos. (a) α - caroteno; (b) β -caroteno	60
Figura 28. Estructura química xantofilas. (a) Luteína; (b) Zeaxantina.....	61
Figura 29. Espectro de absorción UV-Vis de carotenoides.....	61
Figura 30. Estructura química flavonoides.....	62
Figura 31. Estructura química antocianina.....	63
Figura 32. Muestreo pitaya amarilla, municipio San Lorenzo	64
Figura 33. Procesamiento material vegetal.....	65
Figura 34. Obtención extracto crudo ECM de pitaya amarilla con metanol	66
Figura 35. Obtención extracto crudo ECA de pitaya amarilla con acetato de etilo	67
Figura 36. Purificación del extracto crudo ECM.....	67
Figura 37. Fraccionamiento del extracto crudo ECA.....	68
Figura 38. Pigmento mayoritario purificado por HPLC-semi preparativa	70
Figura 39. Espectro UV-VIS del extracto crudo de pitaya amarilla proveniente del Valle del Cauca	75

Figura 40. Espectro UV-VIS del extracto purificado de pitaya amarilla proveniente del municipio San Lorenzo	76
Figura 41. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximo de absorción a 410nm.....	76
Figura 42. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos del 1 al 4 presentes en el extracto EPM.....	77
Figura 43. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximos de absorción a 480nm	78
Figura 44. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 5.....	78
Figura 45. Perfil cromatográfico a 410 nm.....	79
Figura 46. Perfil cromatográfico a 480 nm.....	79
Figura 47. Perfil cromatográfico del sólido FP con máximos de absorción a 410 nm por HPLC-analítico.....	81
Figura 48. Perfil cromatográfico del sólido FP con máximos de absorción a 280 nm.....	81
Figura 49. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximos de absorción a 280 nm	82
Figura 50. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 2.....	82
Figura 51. Espectro RMN-1H del compuesto mayoritario 2, del fruto de pitaya amarilla.....	83
Figura 52. Estructura de β -glucosa.....	84
Figura 53. Espectro de masas del compuesto 2.....	85
Figura 54. Estructura de deshidrogenada descarboxilada–neohilocerenina propuesta para el compuesto 2 (a) descarboxilada en la posición 2; (b) descarboxilada en la posición.....	86
Figura 55. Espectro de masas del compuesto 5.....	87

Figura 56. Estructura de 2-decarboxi neohilocerenina propuesta para el compuesto 5	87
Figura 57. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximo de absorción a 280 nm.....	88
Figura 58. Espectro de masas del compuesto 8.....	88
Figura 59. Estructura de ciclodopa-5-O-(6'-O-3''-hidroxi-3'metilglutatil) β -glucosido propuesta para el compuesto 8	88
Figura 60. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 8.....	89
Figura 61 Espectro de masas del compuesto 1 con Tr de 30.433 min	89
Figura 62. Espectro de masas del compuesto 1' con Tr de 31.067min	90
Figura 63. Espectro de masas del compuesto 6 con Tr de 24min	90
Figura 64. Espectro de masas del compuesto 6' con Tr de 27.5min	90
Figura 65. Espectro de masas del compuesto 6'' con Tr de 27.867 min.....	90
Figura 66. Curva calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales	92
Figura 67. Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante por el método TEAC	94
Figura 68. Comportamiento cinético del proceso de degradación de ECM y EPM, a pH 3, 5 y 7, en presencia y ausencia de luz (PL; AL)	97
Figura 69. Variación de los tiempos de vida media para los extractos ECM y EPM, respecto a las diferentes condiciones de almacenamiento	101
Figura 70. Espectro UV-Vis del extracto crudo ECA.....	102
Figura 71. Perfil cromatográfico a 480nm del extracto EPA por HPLC-analítico	103
Figura 72. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto tipo xantofila presente en EPA.....	103

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Tabla de medias por mínimos cuadrados para la constante de velocidad con intervalos de confianza del 95.0%, en extracto crudo (ECM)...	119
Anexo B. Pruebas de múltiple rangos para la constante de velocidad por Luz, en ECM.	119
Anexo C. Pruebas de múltiple rangos para la constante de velocidad por pH, en ECM.	119
Anexo D. Grafico de interacciones y 95% de Fisher LSD, en ECM	120
Anexo E. Tabla de medias por mínimos cuadrados para la constante de velocidad con intervalos de confianza del 95.0%, del extracto purificado (EPM).....	120
Anexo F. Pruebas de múltiple rangos para la constante de velocidad por Luz, en ECM.	121
Anexo G. Pruebas de múltiple rangos para la constante de velocidad por pH, en ECM.	121
Anexo H. Grafico de interacciones y 95% de Fisher LSD, en ECM	121

RESUMEN

En el trabajo de investigación se aislaron, purificaron e identificaron mediante espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS) los pigmentos tipo betalaínas presentes en la cáscara de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*), proveniente del municipio de san Lorenzo, valorando además en los extractos aislados la capacidad antiradical y su contenido fenólico.

Los frutos objeto de este trabajo se seleccionaron, de acuerdo con la norma NTC 3554, con un grado de madurez 5. El extracto crudo se aisló del fruto mediante maceración química con metanol-agua acidificada (95:5) y posteriormente se purificó mediante retención selectiva de los componentes sobre una columna empacada con resina XAD-7 y finalmente mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Para la identificación del compuesto mayoritario se emplearon técnicas como: espectrometría de masas (HPLC-MS), espectroscopía UV-Vis y resonancia magnética nuclear (RMN-¹H), identificándose como compuesto más probable la a la deshidrogenada descarboxilada-neohilocerenina, se sugiere además la presencia de los compuestos minoritarios 2-decarboxi neohilocerenina y ciclodopa-5-O-(6'-O-3''-hidroxi-3'etilglutatil) β-glucósido. En la cáscara del fruto están presentes además xantófilas de color amarillo.

Con el propósito de valorar el contenido fenólico y la capacidad antiradical de los diferentes extractos aislados del fruto se implementaron metodologías como la de Folin Ciocalteau y Capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) respectivamente. Se encontró que efectivamente el proceso de retención selectiva sobre columna cromatográfica incrementó el contenido de compuestos polifenólicos en los extractos, presentando además una mayor TEAC.

Finalmente, mediante un estudio cinético se estableció que el extracto crudo (ECM) es más estable que el extracto purificado (EPM). De acuerdo a las condiciones de almacenamiento estudiadas, el ECM mostró una mayor estabilidad cuando una solución acuosa se almacena a pH 5 y en ausencia de luz.

ABSTRACT

In the research work was isolated, purified and identified by mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) type pigments betalains present in the peels of yellow pitaya (*Selenicereus megalanthus*), from municipality of San Lorenzo, valuing: Also in extracts isolated antiradical capacity and phenolic content.

The fruits of this work object are selected according to the NTC 3554 standard with a degree of maturity 5. The crude extract was isolated by chemical maceration of the fruit with acidified methanol-water (95: 5) and then purified by retention selective components on a packed column with XAD-7 resin and finally by high performance liquid chromatography (HPLC).

For the identification of the main compound techniques as employed: mass spectrometry (HPLC-MS), UV-Vis spectroscopy and nuclear magnetic resonance (H^1 -NMR) and identified as compound more likely to dehydrogenated decarboxy-neohylocerenin, it is suggested: Moreover, the presence of minority compounds 2-decarboxy-neohylocerenin and cyclo-Dopa 5-O-(6'-O-3''-hydroxy-3'''-methylglutaryl)- β -glucoside. In the peel of the fruit are present: addition of yellow xanthophylls.

In order to evaluate the phenolic content and antiradical capacity of different extracts of the fruit isolated methodologies such as Folin Ciocalteu and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) respectively were implemented. Actually found the process of selective chromatographic column Increase retention on the content of polyphenolic compounds in the extracts, featuring: besides a TEAC mayor.

Finally, through the kinetic study established that the crude extract (ECM) is more stable than the purified extract (EPM). According to storage conditions studied, the ECM showed a mayor stability when an aqueous solution is pH 5 and stored in darkness.

GLOSARIO

ACILACIÓN: Incorporación de un grupo acilo en la molécula de un compuesto orgánico

ACILO: Grupo derivado de un oxoácido, normalmente un ácido carboxílico, por eliminación de al menos un grupo hidroxilo. Tiene como fórmula RCO-, donde R está enlazado al átomo de carbono con un enlace sencillo.

ANTIOXIDANTE: Compuestos que neutralizan químicamente productos activos del metabolismo, tales como radicales libres, que pueden causar daño al cuerpo humano y seres vivos.

BETALAÍNAS: Pigmentos naturales nitrogenados, derivados del ácido betalámico, responsables de la coloración amarilla y rojo violeta de flores, frutos y hojas. Se dividen en betacianinas y betaxantinas.

BETACIANINAS: Pigmentos betaláinicos de color púrpura, se caracterizan por la conjugación de ácido betalámico con una estructura de ciclo-dopa, generalmente se encuentran glicosiladas.

BETAXANTINAS: Pigmentos betaláinicos de color amarillo, se caracterizan por la conjugación de ácido betalámico con aminoácidos o las correspondientes aminas.

CAROTENOIDES: Pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides, dan principalmente los colores rojo, amarillo y anaranjado. Se pueden clasificar en carotenos y xantófilas.

CAROTENOS: Pigmentos tipo carotenoides, con estructuras hidrocarbonadas, dan principalmente la coloración amarilla, roja o naranja.

COSY: Técnica de resonancia magnética bidimensional, de correlación homonuclear, útil para averiguar que espín está acoplado con otros espines.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC): Es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

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

GLICOSILADO: En la estructura molecular, se encuentra enlazado un azúcar diferente a la glucosa.

GLUCOSILADO: En la estructura molecular, se encuentra enlazada como azúcar una glucosa.

HMBC: Técnica de resonancia magnética bidimensional, establece la correlación entre protones y un heteroátomo X separados por 2 o 3 enlaces.

HSQC: Técnica de resonancia magnética bidimensional, se da correlaciones heteronucleares a un enlace.

NEOBETACIANINAS: Betacianinas deshidrogenadas en la posición 14,15, poseen una coloración amarilla.

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR PROTÓNICA (RMN-¹H): Técnica de resonancia magnética unidimensional, basada en las propiedades magnéticas del núcleo de hidrógeno.

TOCSY: Espectroscopía de total correlación, suministra correlaciones entre espines directamente acoplados al igual que COSY, pero incluye además correlaciones entre todos los espines de un sistema, aún los que no estén directamente acoplados.

XANTÓFILA: Pigmentos tipo carotenoide, de coloración amarillo y pardo, que pueden contener en su estructura carbonada grupos como hidroxilo, metoxi, carboxi, ceto o epoxi.

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
AG	Ácido gálico
AL	Ausencia de luz
CC	Cromatografía de columna
COSY	Espectroscopía de correlación
ECM	Extracto crudo obtenido con metanol
ECA	Extracto crudo obtenido con acetato de etilo
EPA	Extracto purificado con acetato de etilo
EPM	Extracto purificado con metanol
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HMG	3- hidroxí-3-metilglutaril
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
HPLC-MS-ESI	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas, por ionización electrónica
HSQC	Correlación heteronuclear de único cuanto
J	Constante de acoplamiento
K	Constante de degradación
λ_{\max}	Longitud de onda de máxima absorbancia
PL	Presencia de luz
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
TEAC	Equivalentes trolox de capacidad antioxidante
Tr	Tiempo de retención

INTRODUCCIÓN

Hoy en día se ha investigado el efecto tóxico de los colorantes sintéticos en el ser humano, descubriendo que son responsables de trastornos hepáticos y de aprendizaje, entre otros, por lo que su uso ha sido restringido en la industria alimentaria. Es así como el estudio de los pigmentos naturales para desplazar sustancias sintéticas, se ha convertido en un área de gran interés científico¹.

Los pigmentos tipo betalaína son una buena opción para ser usados como colorantes en alimentos solubles en agua² entre los que se encuentran bebidas refrescantes, mermeladas, gelatinas, lácteos entre otros, además constituyen indudablemente una opción interesante dado su gama de colores, desde el anaranjado amarillento al rojo violáceo³. Tienen ciertas ventajas por su estabilidad en un ámbito de pH de 3 a 7, lo que haría a este tipo de pigmentos ideales para su uso como colorantes en productos alimenticios de acidez baja y neutra⁴⁵. También son conocidas por su capacidad antioxidante que según diversas publicaciones científicas generan beneficios para la salud humana^{6 7}, por lo que su consumo se asocia a la protección contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo⁸, entre las que se encuentran: aterosclerosis, parkinson, alzheimer entre otras⁹.

¹ DOWNHAM, Alison y COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. En: International Journal of Food Science and Technology. Febrero, **2000**, vol. 35, no. 1, p. 5-22.

² STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: Trends in Food Science & Technology. Enero, **2004**, vol. 15, no. 1, p.19-38.

³ AZEREDO, Henriette. Betalains: properties, sources, applications, and stability -a review. En: Food Science and Technology. Diciembre, **2009**, vol. 44, no. 12, p. 2365-2376.

⁴ ESQUIVEL, Patricia. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. En: Agronomía Mesoamericana. Junio, **2004**, vol. 15, no. 2, p. 215-219.

⁵ YAHIA, E. M. (Ed.) y SÁENZ C. Cactus pear *Opuntia* species. En: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical, Vol. 2 fruits: açai to citrus. Cambridge, **2011**, 297 p.

⁶FEUGANG, Jean Magloire, *et al.* Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. En: Frontiers in Bioscience. Septiembre, **2006**, vol. 11, p. 2574-2589.

⁷ STINTZING, Florian C., *et al.* Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Enero, **2005**, vol. 53, no. 2, p. 442-451.

⁸ STRACK, Dieter; VOGT, Thomas y SCHLIEMANN, Willibald. Recent advances in betalain research. En: Phytochemistry, Febrero, **2003**, vol. 62, no. 3, p. 247-269.

⁹ GUERRA, Elejalde. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. En: Anales de medicina interna. Junio, **2001**, vol. 18, no. 6, doi: 10.4321/s0212-71992001000600010.

Se han empezado a explorar fuentes alternativas que contienen pigmentos tipo betalainas, entre géneros de la familia Cactácea¹⁰. Sin embargo en pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) no hay estudios en la composición química, estabilidad, capacidad antiradical y contenido fenólico, no obstante este fruto puede ser una fuente promisoría de colorantes alimentarios, especialmente en la gama de los amarillos hidrosolubles que son más escasos que los pigmentos rojos¹¹. Hasta la fecha en esta gama de colores, los más utilizados indudablemente son los carotenos, que son pigmentos con una escasa solubilidad en agua¹².

La pitaya amarilla es una especie que se cultiva en Colombia, cuyo fruto amarillo ovoide, está cubierto de protuberancias con espinas cortas. La pulpa blanca o translúcida, es de sabor muy agradable y contiene muchas semillas negras¹³, pertenece a la familia de las cactáceas, del orden caryophyllales¹⁴.

El presente trabajo se enfocó en el estudio y caracterización de los pigmentos mayoritarios tipo betalaina presentes en la cáscara del fruto de pitaya amarilla cultivada en el municipio de San Lorenzo, en el Departamento de Nariño-Colombia, así como el análisis del contenido fenólico, actividad antioxidante y evaluación del comportamiento de los extractos coloreados de la cáscara, sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento, que dan una idea de su posible aplicación como materia prima en aditivos alimenticios, siendo la cáscara de pitaya un material de desecho. Estos estudios podrían a futuro apoyar investigaciones relacionadas con su extracción a escala industrial lo que contribuiría al desarrollo económico de la región.

¹⁰ BROCKINGTON, Samuel, *et al.* Complex pigment evolution in the Caryophyllales. En: *New Phytologist*. Junio, **2011**, vol. 190, no. 4, p. 854-864.

¹¹ NAZARENO, Mónica y PADRÓN PEREIRA, Carlos Alberto. Nuevas tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de las cactáceas en la elaboración de alimentos. Componentes funcionales y propiedades antioxidantes. En: *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Julio, **2011**, vol. 2, no. 1, p. 202-238.

¹² AZAREDO. Op. Cit., p. 23

¹³ LEON, Jorge. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. Costa Rica, Agroamerica, **2000**, 81 p.

¹⁴ ESQUIVEL. Op. Cit., p. 23

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar los pigmentos tipo betalaínas presentes en la cáscara de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) y valorar su capacidad como antioxidantes

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un método de extracción de los pigmentos tipo betalaínas presentes en la cáscara de pitaya (*Selenicereus megalanthus*)
- Aislar y purificar las betalaínas mayoritarias presentes en el extracto crudo de la cáscara de pitaya cultivada en el Departamento de Nariño mediante el uso de técnicas como cromatografía de columna (CC), cromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).
- identificar químicamente las betalaínas mayoritarias del extracto mediante las técnicas UV-Vis, HPLC-masas y RMN.
- Evaluar la estabilidad del extracto frente a la presencia y ausencia de luz, en diferentes condiciones de pH
- Estudiar la capacidad antioxidante de las betalaínas aisladas en la cáscara de la fruta del *Selenicereus megalanthus* mediante la técnica TEAC, actividad antioxidante equivalente a Trolox.

2. ESTADO DEL ARTE

Las betalaínas representan una opción interesante en el uso como colorantes en alimentos solubles en agua¹⁵. Son compuestos nitrogenados y se dividen en betacianinas (desde el rojo hasta el violeta), y betaxantinas (desde el amarillo hasta el naranja), absorben a longitudes de onda máxima entre 534-555nm y 460-480nm, respectivamente¹⁶, están exclusivamente presentes en la mayoría de familias bajo el orden de Caryophyllales, como en cactáceas^{17 18 19 20 21}, amaranthaceae, Chenopodiaceae entre otros, en raíces, frutos y flores²². En la tabla 1, se muestra algunas plantas de las especies del orden de caryophyllales productoras de betalaínas.

Tabla 1. Algunas especies de plantas productoras de betalaínas en el orden de caryophyllales

Familia	Especie	Betalaínas reportadas		
		Betacianinas	Betaxantinas	Referencia
Cactaceae	Hylocereus polyrhizus (Pitaya rojo-púrpura)	Betanina Isobetanina Filocactina Isofilocactina Hilocerenina Isohilocerenina	Indicaxantina Portulacaxantina II Miraxantina V Leucine-bx, Isoleucine-bx , Fenilalanina-bx	Wybraniec <i>et al</i> ²³ . Wybraniec <i>et al</i> ²⁴ .

¹⁵ AZAREDO. Op. Cit., p. 23.

¹⁶ STINTZING, Florian C., *et al*. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. En: Food and Chemical. Febrero, **2004**, vol. 65, no. 4, p. 415-422.

¹⁷ MABRY, Tom J. Selected Topics from Forty Years of Natural Products Research: Betalains to Flavonoids, Antiviral Proteins, and Neurotoxic Nonprotein Amino Acids. En: Journal of Natural Products. Diciembre, 2001, vol. 64, no. 12, p. 1596-1604.

¹⁸ BROCKINGTON. Op. Cit., p. 23.

¹⁹ BROCKINGTON, Samuel, *et al*. Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. En: New Phytologist. Septiembre, **2015**, vol. 207, no. 4, p. 1170-1180.

²⁰ KHAN, Mohammad Imtiyaj y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: Phytochemistry. Septiembre, **2015**, vol. 117, p. 267-295.

²¹ CRAWLEY, Sunny y HILU, Khidir. Caryophyllales: Evaluating phylogenetic signal in *trnK* intron versus *matK*. En: Journal of Systematics and Evolution. Septiembre, **2012**, vol. 50, no. 5, p. 387-410.

²² KHAN. Op. Cit., p. 26.

²³ WYBRANIEC, Sawomir, *et al*. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. En: Phytochemistry. Diciembre, **2001**, vol. 58, no. 8, p. 1209-1212.

²⁴ WYBRANIEC, Sławomir, *et al*. Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. En: Journal of Chromatography A. Octubre, **2009**, vol. 1216, no. 41, p. 6890-6899.

Cactaceae	Opuntia ficus-indica (pera de Cactus)	Betanina Isobetanina Filocactina Neobetanina	Indicaxantina Vulgaxantina I Vulgaxantina II Miraxantina II	Stintzing, <i>et al</i> ²⁵ . Stintzing, <i>et al</i> ²⁶ .
	<i>Schlumbergera buckleyi</i> . (Cactus de navidad)	Filocactina Isofilocactina Ac. betalámico Betanina Betacianina Diacilada	Vulgaxantina I	Kobayashi, <i>et al</i> ²⁷ .
Amaranthaceae	Amaranthus tricolor	Amarantina, Isoamarantina		Zhu, <i>et al</i> ²⁸ .
Chenopodiaceae	Beta vulgaris (Remolacha roja)	Betanina Isobetanina Betanidina Isobetanidina Neobetanina	Vulgaxantina (I, II), Indicaxantina,	Kujala, <i>et al</i> ²⁹ .
Portulacaceae	Portulaca grandiflora (Moss rose)		Dopaxantina Vulgaxantina I, Portulacaxantina II, Miraxantina V, Indicaxantina	Gandía, <i>et al</i> ³⁰ .

*La estructura de algunas betalaínas reportadas, se pueden observar más adelante en las figuras 4-13.

Las betalaínas además de su relevancia como colorantes, tienen efectos positivos para la salud de los seres humanos cuando son usados en alimentos, esto se debe a sus actividades farmacológicas tales como antioxidante, anti-cáncer, y antimicrobiana, a diferencia de los colorantes sintéticos que pueden provocar efectos adversos para la salud³¹, los extractos de remolacha están incluidos como

²⁵ STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *En: European Food Research and Technology*. Marzo, **2001**, vol. 212, no. 4, p. 396-407.

²⁶ STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography– Electro spray Ionization Mass Spectrometry. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marzo, **2002**, vol. 50, no. 8, p. 2302–2307.

²⁷ KOBAYASHI, Naoko, *et al*. Betalains from Christmas cactus. *En: Phytochemistry*. Junio, **2000**, vol. 54, no. 4, p. 419-426.

²⁸ ZHU, Fan, *et al*. Influence of Amaranthus Betacyanin Pigments on the Physical Properties and Color of Wheat Flours. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Agosto, **2008**, vol. 56, no. 17, p. 8212-8217.

²⁹ KUJALA, Tytti S., *et al*. Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. *En: European Food Research and Technology*. Abril, **2002**, vol. 214, no. 6, p. 505-510.

³⁰ GANDÍA HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA CARMONA, Francisco. Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *En: Planta*. Noviembre, **2005**, vol. 222, no. 4, p. 586-593.

³¹ GENGATHARAN, Ashwini; DYKES, Gary y CHOO, Wee Sim. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *En: Food Science and Technology*. Diciembre, **2015**, vol. 64, no. 2, p. 645-649.

uno de los diez vegetales con mayor poder antioxidante³², hay también evidencia creciente de una poderosa actividad del fruto de *Opuntia*³³. La actividad antioxidante de betanina y de su aglicona, la betanidina, se manifestó también mediante la inhibición in vitro de la peroxidación lipídica, que hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos, con concentraciones muy bajas de betalaína. En cuanto a su actividad anticáncer, se ha demostrado el efecto inhibitor del extracto de remolacha en tumores, de piel y pulmón, en ratones³⁴. Esta actividad también fue comprobada sobre tumores de ovario, cervicales y vejiga in vitro e in vivo en ratones con cáncer de ovario con un extracto de fruto de cactus (*Opuntia*), a la cual contribuirían las betalaínas como principios activos más importantes, según la investigación de Castellar³⁵.

La mayor fuente comercial que contiene betalaínas es la remolacha, de donde se obtiene un pigmento rojo violáceo, con compuestos mayoritariamente hidrosolubles como la betanina (roja)³⁶, que se encuentra en una proporción de 75 a 95% del total de betalaínas y es la más estudiada hasta la fecha, fue aislada por primera vez en 1957 por Wyler y Dreiding e independientemente en ese mismo año por Schmidt y Schönleben. Otras betacianinas en remolacha son: isobetanina, betanidina e isobetanidina. Las estructuras de estos pigmentos fueron establecidas en 1965 por Wilcox y Piatelli^{37 38}. Además en la remolacha se ha encontrado betaxantinas como vulgaxantina I y vulgaxantina II (tabla 1)³⁹.

Los extractos aislados de la remolacha tienen la desventaja de poseer un sabor particular debido a la presencia de geosmina y algunas pirazinas, que producen aversión, al agregarla a alimentos tales como los lácteos⁴⁰. Debido a esto se ha empezado a explorar fuentes alternativas que contienen pigmentos tipo betalaínas, entre géneros de la familia Cactaceae, que directa o indirectamente, constituyen una fuente importante de colorantes con aplicaciones principalmente en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética⁴¹. De acuerdo a la literatura

³² HALVORSEN, Bente, *et al.* A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. En: Journal of Nutrition. Marzo, **2002**, vol. 132, no. 3, p. 461-471.

³³ FEUGANG. Op. Cit., p. 23.

³⁴ KAPADIA, Govind J., *et al.* Chemoprevention of lung and skin cancer by Beta vulgaris (beet) root extract. En: Cancer Letters. Febrero, 1996, vol. 100, no. 1-2, p. 211-214.

³⁵ CASTELLAR, Rosario, *et al.* Fermentation of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits for betalains concentration. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Mayo, **2008**, vol. 56, no.11, p.4253–4257.

³⁶ AZAREDO. Op. Cit., p. 23.

³⁷ PIATTELLI, M. y IMPERATO, F. Betacyanins of the family cactaceae. En: Phytochemistry, Agosto, **1969**, vol. 8, no. 8, p. 1503-1507.

³⁸ STRACK. Op. Cit., p. 23.

³⁹ KUJALA. Op. Cit., p. 27.

⁴⁰ AZAREDO. Op. Cit., p. 23.

⁴¹ HERNÁNDEZ, Héctor M. La vida en los desiertos mexicanos. México, Secretaría de Educación Pública, **2006**, 111 p.

científica los pigmentos de estos frutos son más aceptables organolépticamente que el de las remolachas, ya que no tienen un sabor desagradable⁴².

Se han publicado algunos estudios sobre la composición química en cactáceas⁴³, logrando separar de los extractos crudos dos fracciones, una de color rojo y otra de color amarillo que corresponden a betacianinas y betaxantinas respectivamente. Además, compuestos que se creía eran producto de degradación, como las betacianinas deshidrogenados y/o descarboxilados, que exhiben desplazamientos hipsocrómicos en sus máximos de absorción, se han hallado como componentes genuinos de las plantas^{44 45}, como la neobetanina (14,15-dehidrobetanina), que se caracteriza por un color amarillo (λ_{max} alrededor de 470 nm), identificada en cactáceas como *Opuntia ficus-indica*, *Zygocactus truncatus*, *Rhipsalis warmingiana*⁴⁶, Nopal.⁴⁷, al igual que en otros miembros del orden de Caryophyllales⁴⁸, como la planta de *Boerhavia erecta*⁴⁹, en raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris*), *Portulaca grandiflora*, frutos de *Phytolacca bogotensis*⁵⁰. También se ha encontrado como un pigmento minoritario, la 2-descarboxi-betanidina en *Beta vulgaris*, flores de *Carpobrotus Acinaciformis*⁵¹.

En cuanto a la composición química de la cáscara de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) de la familia de las cactáceas, que es el motivo de esta investigación, Kugler *et al*⁵², detectaron un amino compuesto “Dopa” por espectrometría de masas, que es un precursor de betalainas, sin embargo no hay estudios de los pigmentos betalainicos que podrían estar presentes en el fruto.

⁴² AZAREDO. Op. Cit., p. 23.

⁴³ STINTZING. Op. Cit., p. 27.

⁴⁴ SPÓRNA, A., *et al.* Liquid chromatographic techniques in separation of betacyanins and their derivatives from red beet roots (*Beta vulgaris* L.). *En: Challenges of Modern Technology*. Enero, **2010**, vol. 1, no. 1, p. 19-22.

⁴⁵ KHAN. Op. Cit., p. 26.

⁴⁶ ALARD, Doris, *et al.* Neobetanin: isolation and identification from *Beta vulgaris*. *En: Phytochemistry*. **1985**, vol. 24, no. 10, p. 2383-2385.

⁴⁷ HERBACH, Kirsten, M.; STINTZING, Florian y CARLE, Reinhold. Betalain Stability and Degradation-Structural and Chromatic Aspects. *En: Journal of Food Science*. Mayo, **2006**, vol. 71, no. 4, p. R41-R50.

⁴⁸ STRACK, Dieter; ENGEL, Ute y WRAY, Victor. Neobetanin: A new natural plant constituent. *En: Phytochemistry*. **1987**, vol. 26, no. 8, p. 2399-2400.

⁴⁹ STINTZING, Florian C., *et al.* Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. *En: Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*. Febrero, **2004**, vol. 59, no. 1-2, p. 1-8.

⁵⁰ ALARD. Op. Cit., p. 29.

⁵¹ PIATTELLI, M. y IMPELLIZZERI, G. 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrotus acinaciformis*. *En: Phytochemistry*. Diciembre, **1970**, vol. 9, no. 12, p. 2553-2556.

⁵² KUGLER, Florian, *et al.* Determination of free amino compounds in betalainic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Mayo, **2006**, vol. 54, no. 12, p. 4311-4318.

Algunas de las investigaciones realizadas hasta la fecha, son sobre fenología⁵³, aminoácidos⁵⁴, ácidos grasos de semillas a los que se les atribuye un efecto laxante⁵⁵, se ha observado además los efectos de la etapa de maduración después del almacenamiento sobre la calidad del fruto (contenido de cáscara, pérdida de peso, acidez titulable)⁵⁶. Perea *et al*⁵⁷ refiere que los frutos poseen alcaloides como la cactina (hordeina) y tiramina, y se les reconoce a ambos propiedades antisépticas y la primera se referencia como cardiotónico. La Universidad de Sevilla en colaboración con el grupo de investigación GIPIB de la Universidad de Nariño, efectuó un estudio relacionado con el color, de los extractos de pitaya amarilla, encontrándose que es una fuente potencial y promisorio como colorante para alimentos, cuando el extracto se adiciona a productos agroalimentarios de baja acidez, con un rango de pH de 4-6. También se encontró que era necesario conservar a temperaturas bajas, los extractos ajustados a pH ácido con el fin de evitar los cambios de tono (h_{ab}) y luminosidad (L^*)⁵⁸.

⁵³ JIANG Y. L.; LIN T. S.; LEE C. L.; YEN C. R.; YANG W. J., Phenology, canopy composition, and fruit quality of yellow pitaya in Tropical Taiwan. En: HortScience. Noviembre , **2011**, vol. 46, no. 11, p. 1497-1502.

⁵⁴ KUGLER. Op. Cit., p. 29.

⁵⁵ CHEMAH, T. C., *et al*. Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids. En: Food Research International. Noviembre, **2010**, vol. 17, no. 4. p. 1003-1010.

⁵⁶ NERD, Avinoam y MIZRAHI, Yosef. The effect of ripening stage on fruit quality after storage of yellow pitaya. En: Postharvest Biology and Technology. Febrero, **1999**, vol. 15, no. 2, p. 99-105.

⁵⁷ PEREA DALLOS, Margarita *et al*. Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales. Colombia, Universidad Nacional de Colombia, **2010**, 581 p.

⁵⁸ CEJUDO BASTANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson; DELGADO, Angélica y HEREDIA, Francisco. Potential use new Colombian sources of betalains. Effect of the acidity and temperature on the color and betalain content of yellow pitaya (*Selenicereus megalanthus*). En: Food Research International. **2015**, sometido.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. FAMILIA DE LAS CACTÁCEAS

Las cactáceas son una familia constituida por alrededor de 1600 especies. Los miembros de esta familia se encuentran en forma nativa desde Chile y Argentina hasta Canadá. Dentro de las cactáceas existen alrededor de 35 especies que tienen potencial como cultivo para obtención de frutos. Algunos son descritos en la tabla 2⁵⁹.

Tabla 2. Algunas cactáceas de mayor comercialización y su ubicación geográfica.

Nombre botánico	Nombre común	Distribución
<i>Hylocereus costarricensis</i>	Pitahaya	América central
<i>Hylocereus paolyrhi</i>	Pitahaya	América central
<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Pitahaya	América central
<i>Hylocereus purpusii</i>	Pitahaya	América central
<i>Hylocereus undatus</i>	Pitahaya	América central
<i>Myrtilloactus geometrizarans</i>	Pitaya (Jiotilla)	México
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Prickly pear	América tropical
<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.	Prickly pear	América tropical
<i>Selenicereus megalanthus</i>	Pitaya	Colombia e Israel
<i>Stenocereus gummosus</i>	Pitaya agria	Sonoran
<i>Stenocereus stellatus</i>	Pitaya	México

Fuente: ESQUIVEL, Patricia. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. En: Agronomía Mesoamericana. Junio, **2004**, vol. 15, no. 2, p. 215-219.

En la mayoría de familias que pertenecen al orden Caryophyllales como las cactáceas, existen ciertos sinamorfismos como la presencia de betalaínas, un tipo de pigmentos nitrogenados derivados de la tirosina, este tipo de pigmentos reemplaza a las antocianinas en flores y frutos de las plantas^{60 61 62}, Brockington, *et al* (2011)⁶³ y (2015)⁶⁴, describen en un árbol evolutivo la clase de pigmentos

⁵⁹ ESQUIVEL. Op. Cit., p. 23.

⁶⁰ CASTELLANOS SANTIAGO, Elena y YAHIA, Elhadi. Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Junio, **2008**, vol. 56, no. 14, p. 5758-5764.

⁶¹ AZEREDO. Op. Cit., p. 23.

⁶² CRAWLEY. Op. Cit., p. 26.

⁶³ BROCKINGTON. Op. Cit., p. 23.

⁶⁴ BROCKINGTON. Op. Cit., p. 26.

encontrados en las familias del orden Caryophyllales, donde las cactáceas son clasificadas entre las familias con este tipo de pigmentos betalaínicos.

Las cactáceas comestibles se pueden clasificar en tres tipos: pitayas (trepadoras), tunas, y pereskias (columnares).

3.1.1. Cactáceas trepadoras.

Los frutos de las cactáceas trepadoras denominadas de esta forma debido a su hábito de crecimiento en el cual utilizan árboles como soporte físico, se conocen en Latinoamérica como pitaya o pitahaya. Los de este grupo contienen pequeñas semillas digeribles. La cáscara puede tener o no espinas, pero las espinas se remueven fácilmente durante la maduración. La pitaya, conocida como fruta del dragón, pera de fresa o pitaya roja, crece en ambientes tropicales, dentro de las que se distinguen *Hylocereus undatus* (cáscara roja, pulpa blanca), *H. polyrhizus* (cáscara roja y pulpa roja), *H. costarricensis* (cáscara roja y pulpa roja). La cáscara es generalmente roja mientras que el color de la pulpa puede variar de rojo-purpura hasta blanco. Aparte de la pitaya roja, se comercializa la pitaya amarilla (cáscara amarilla y pulpa blanca), la cual es de igual manera una cactácea trepadora⁶⁵, pero por las notorias diferencias de color, presencia o no de espinas, forma de tallo de sus frutos, con relación a las otras pitayas, pertenece a una especie de otro género, *Selenicereus megalanthus*, cuyo cultivo se realiza en mayor medida en Colombia e Israel, siendo originaria de Suramérica⁶⁶.

3.1.2. Tunas (*Opuntia spp.*).

Del genero *Opuntia* se obtienen frutos comestibles y su cultivo se logra en terrenos áridos. Actualmente se cultiva a nivel comercial en México, Chile Argentina, Colombia y Perú⁶⁷. Se conocen casi 300 especies del género opuntia. Entre ellas se encuentran, *Opuntia ficus-indica*, *O. amyclaea*, *O. xocnostle*, entre otras. La que más se cultiva en distintas partes del mundo es *Opuntia ficus-indica*, conocida también como nopal o tuna ⁶⁸, el fruto es ovoide, la pulpa es jugosa y dulce, y contiene numerosas semillas, se puede encontrar en una amplia gama de colores, que puede variar desde el blanco, amarillo, naranja, rojo y purpura⁶⁹.

⁶⁵ ESQUIVEL. Op. Cit., p. 23.

⁶⁶ CORPOICA. Ed. Pitaya Cosecha y Postcosecha. Colombia, **2003**, 3, 22-23 p.

⁶⁷ PARISH, John y FELKER, Peter. Fruit quality and production of cactuspear (*Opuntia spp.*) fruit clones selected for increased frost hardiness. En: *Journal of Arid Environments*. Septiembre, **1997**, vol. 37, no. 1, p.123-143.

⁶⁸ SÁENZ, Carmen. Utilización agroindustrial del nopal. Roma: Food & Agriculture Org, **2006**, 4-5 p.

⁶⁹ AQUINO BOLAÑOS, Elia Nora, *et al.* Caracterización fisicoquímica de siete variedades de tuna (*Opuntia spp.*) color rojo-violeta y estabilidad del pigmento de las dos variedades con mayor concentración, En: *Investigación y ciencia- Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Mayo-Agosto, **2012**, vol. 20, no. 55, p. 3-10.

3.1.3. Pereskias (columnares).

De las cactáceas, las columnares, denominadas así debido a la forma de la planta. Pueden tener diferentes tonalidades (blanco, rosado, naranja, rojo, púrpura), contienen semillas pequeñas, suaves y comestibles, siendo la especie de mayor importancia comercial *Stenocereus queretaroensis*⁷⁰.

La investigación se centra en el estudio de pigmentos tipo betalainas del fruto de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*), que pertenece al grupo de las cactáceas trepadoras.

3.2. PITAYA AMARILLA

La pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*), se caracteriza por tener una corteza color amarillo con espinas, pequeñas semillas negras y pulpa blanca⁷¹.

3.2.1. Taxonomía y características del fruto.

La clasificación taxonómica para las especies *Selenicereus megalanthus* es la siguiente⁷².

Reino: Plantae
Súper división: Spermatophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Caryophyllales
Familia: Cactaceae
Subfamilia: Cactoideae
Tribu: Hylocereae
Género: *Selenicereus*
Especie: *Selenicereus megalanthus* (Haw.)
Nombre común: Pitaya Amarilla

Descripción: la pitaya amarilla es una planta trepadora (Figura 1a), nativa del norte de América del Sur, cuyo principal proveedor es Colombia. A los tallos que sustituyen las hojas, se los llama cladodios, encargados de realizar la fotosíntesis, tienen un color verde, y son cóncavos entre las areólas (pequeñas protuberancias

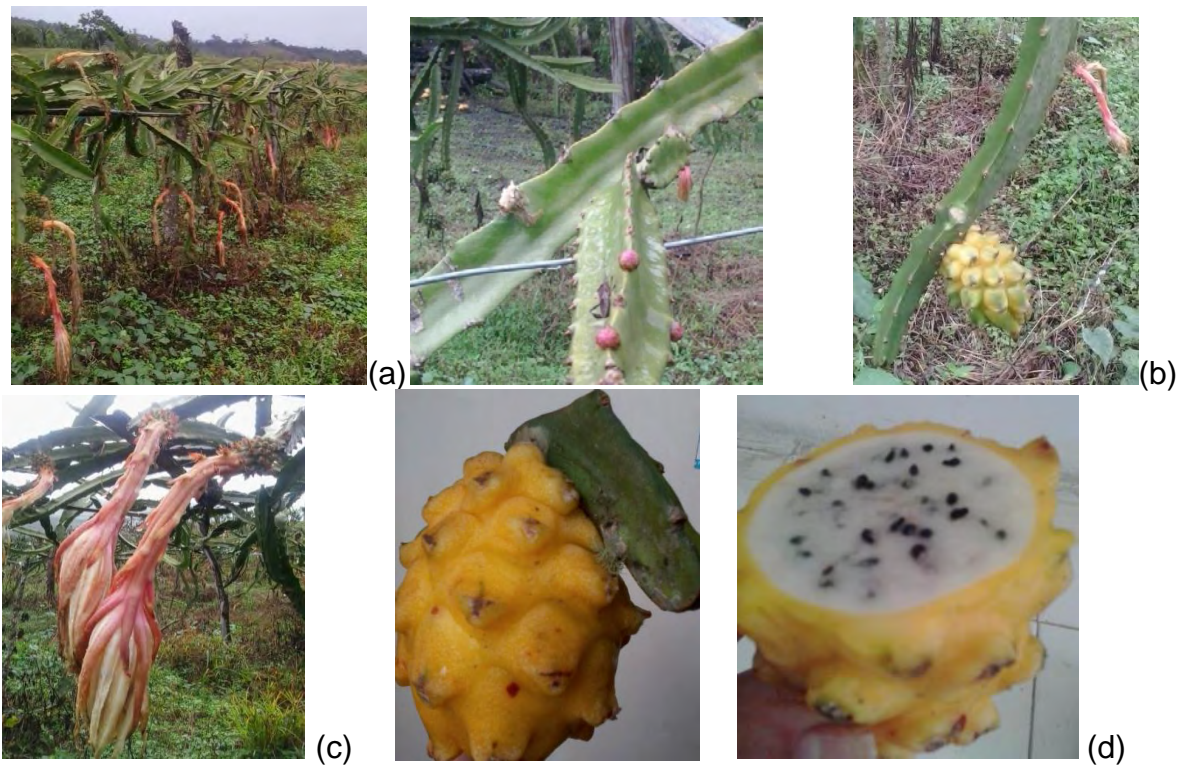
⁷⁰ ESQUIVEL. Op. Cit., p. 23.

⁷¹ MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Características y estructura de los frutales de exportación en Colombia. Bogotá, Observatorio Agrocadenas, **2002**, 22 p.

⁷² SUÁREZ ROMÁN, R. S. Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *selenicereus megalanthus* (haw.) britten & rose y pitahaya roja *hylocereus polyrhizus* (haw.) britten & rose. Trabajo de maestría en Ciencias Agrarias-Fitomejoramiento. Palmira: Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, **2011**, p.31-36.

donde surgen los grupos de espinas) (Figura 1b)⁷³. Las flores son grandes, la parte superior es en forma de copa, se compone de muchos segmentos, los inferiores amarillentos y angostos, los superiores anchos y blancos (Figura 1c), florecen en horas de la noche y se cierran en las primeras horas de la mañana. El fruto es amarillo, ovoide a elipsoidal, cubierto de protuberancias llamadas mamilas, en la base de estas nacen espinas cortas. La pulpa blanca o translúcida, es de sabor muy agradable y contiene muchas semillas negras⁷⁴ (Figura 1d), las partes del fruto se muestran en la figura 2. El peso de los frutos varía entre 70 y 390 gramos, el diámetro entre 4,5 y 9 cm, la longitud entre 8 y 14 cm, y la cáscara gruesa representa entre el 40 y el 55% del peso total⁷⁵

Figura 1. (a) Planta de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthua*); (b) cladodios; (c) flor; y (d) fruto.



Fuente: esta investigación

⁷³ MEDINA, Jorge Alberto *et al.* Generalidades del cultivo. En: Manual técnico: Tecnología para el manejo de pitaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran en Colombia. Colombia, Corpoica, **2013**, 17-18 p.

⁷⁴ LEON. *Op. Cit.*, p. 23.

⁷⁵ CHICA, M.; GARCÍA U. y ROJAS, J. M. Caracterización físico-mecánica de las frutas frescas. En: Caracterización y normalización de los recipientes de cosecha y empaques de comercialización de frutas en Colombia. Chinchiná, Caldas, Cenicafé, **2005**, 166 p.

Figura 2. Partes del fruto de pitaya amarilla.



Fuente: MEDINA, Jorge Alberto *et al.* Generalidades del cultivo. En: Manual técnico: Tecnología para el manejo de pitaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran en Colombia. Colombia, Corpoica, **2013**, 17-18 p.

3.2.2. Madurez del fruto.

La madurez del fruto de pitaya amarilla se aprecia visualmente por su color externo. En la figura 3, se relacionan los cambios del color, con los diferentes estados de madurez⁷⁶.

Figura 3. Tabla de color de pitaya amarilla.



Fuente: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS Y CERTIFICADOS (ICONTEC). Frutas frescas. Pitahaya amarilla. NTC 3554, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Cenicafé. Bogotá, **1996**, 5-6 p.

3.2.3. Distribución geográfica y temporada de mayor distribución.

La amplia distribución geográfica que tienen las diferentes especies de pitaya indica su gran capacidad de adaptación a distintas condiciones ambientales, se desarrollan mejor en los climas cálidos subhúmedos, y secos, pero no soporta las bajas temperaturas. La pitaya amarilla de Colombia se encuentra entre 1180 y 1932 msnm, a temperaturas de 18 a 24 °C.

La producción de pitaya amarilla tiene dos cosechas, una de febrero a marzo y la otra de julio a agosto por lo que hay épocas de sobreoferta y de escasez. Por esta razón la disponibilidad de pitaya es limitada en algunos meses del año, aunque se

⁷⁶ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS Y CERTIFICADOS (ICONTEC). Frutas frescas. Pitahaya amarilla. NTC 3554, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Cenicafé. Bogotá, **1996**, 5-6 p.

ha tratado de cultivar la fruta en diferentes zonas altitudinales para extender la producción durante un periodo más largo en el año⁷⁷.

En cuanto a la composición en pitaya amarilla, no hay estudios, por lo que el interés se centra en extraer e identificar químicamente los pigmentos tipo betalaína de la cáscara del fruto.

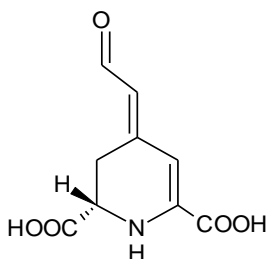
3.3. BETALAÍNAS

Las betalaínas son moléculas complejas solubles en agua, se almacenan en la vacuola de células vegetales, contienen nitrógeno y se derivan de la tirosina⁷⁸. Hasta el momento no se han hallado betalaínas y antocianinas juntas en la misma planta, ni aún dentro de la misma familia. Sin embargo pueden coexistir con otra clase de pigmentos como los flavonoides⁷⁹.

3.3.1. Estructura química.

Químicamente son moléculas derivadas del ácido betalámico (Figura 4), cuya estructura se muestra en la figura 5⁸⁰. Se dividen en betacianinas (desde el rojo hasta el violeta) y betaxantinas (desde el amarillo hasta el naranja)⁸¹.

Figura 4. Estructura química del ácido betalámico.



Fuente: BADUI DERGAL, Salvador. Química de los alimentos. 3 ed. Mexico: Pearson Education, **1993**, 377-405 p.

⁷⁷ SUÁREZ. Op. Cit., p. 33.

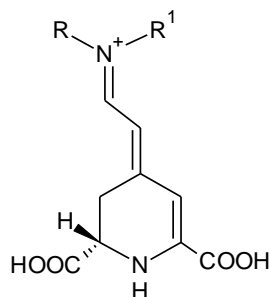
⁷⁸ MILLER, Renee; OWENS, Simon J. y RØRSLETT, Bjørn. Plants and colour: Flowers and pollination. *En: Optics and Laser Technology*. Marzo, **2011**, vol. 43, no. 2, p. 282-294.

⁷⁹ SING DE UGAZ, O. L.; colorantes naturales, fondo editorial 1^a, Perú, **1997**, 119-131

⁸⁰ BADUI DERGAL, Salvador. Química de los alimentos. 3 ed. Mexico: Pearson Education, **1993**, 377-405 p.

⁸¹ STINTZING. Op. Cit., p. 26.

Figura 5. Estructura química de la betalaína.



Fuente: BADUI DERGAL, Salvador. Química de los alimentos. 3 ed. Mexico: Pearson Education, 1993, 377-405 p.

3.3.1.1. Betacianinas.

Las betacianinas son pigmentos de color púrpura, generalmente se consideran glicósidos, su principal componente es la betanina (figura 6). Todas las betacianinas pueden ser derivadas de dos núcleos básicos, la betanidina (figura 6) y la isobetanidina (Figura 7), cuya diferencia es la posición del hidrogeno en el carbono 15, se caracteriza por una estructura de ciclo-dopa, glicosilada en uno de los grupos hidroxilos localizados en la posición cinco o seis^{82 83}. La unidad de azúcar más común es la glucosa y menos frecuente la soforosa y la ramnosa. Es también común que se encuentren aciladas con grupos sulfuro, malónico, 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG), p-cumárico, ferulico, cafeico, sinápico entre otros⁸⁴. Algunas de las betacianinas aciladas que se han reportado son hilocerenina (betanina acilada con HMG) (figura 8) y filocactina (betanina acilada con el grupo malonil) (Figura 9)^{85 86}

Las betacianinas son ópticamente activas por los dos carbonos quirales C-2 y C-15. Su naturaleza es polar por contener tres grupos carboxilos, además de un grupo fenólico. Absorben a una longitud máxima de entre los 534 y 555nm^{87 88}.

⁸² FENNEMA, Owen R. Química de los alimentos. 2 ed. España, Acribia, 1993, 640-655 p.

⁸³ BADUI. Op. Cit., p. 36.

⁸⁴ SING. Op. Cit., p. 36.

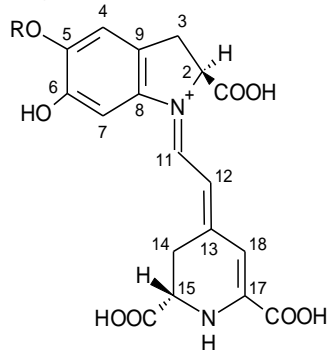
⁸⁵ CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Identification and Distribution of Simple and Acylated Betacyanins in the Amaranthaceae. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Abril, 2001, vol. 49, no. 4, p. 1971-1978.

⁸⁶ KHAN. Op. Cit., p. 26.

⁸⁷ FENNEME. Op. Cit., p. 36.

⁸⁸ BADUI. Op. Cit., p. 36.

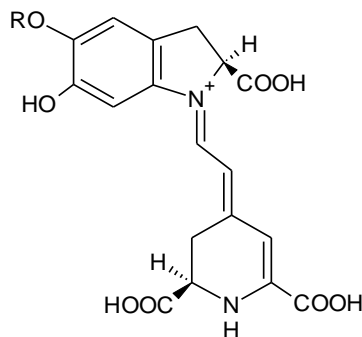
Figura 6. Estructura de betanina y betanidina.



Betanina R=Glucosa
Betanidina R=H

Fuente: BADUI DERGAL, Salvador. Química de los alimentos. 3 ed. Mexico: Pearson Education, 1993, 377-405 p.

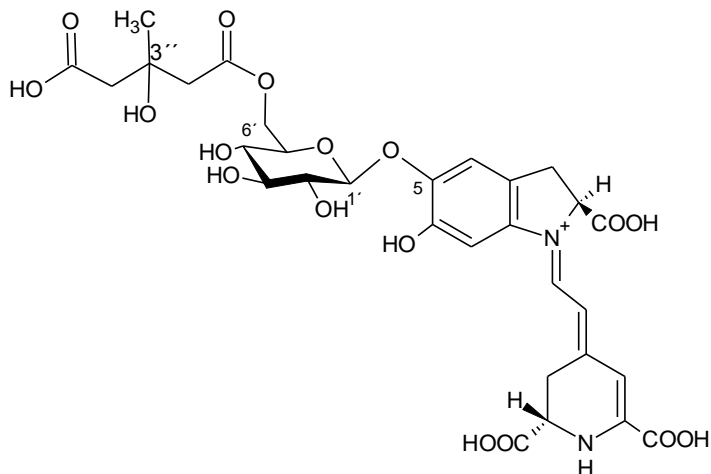
Figura 7. Estructura de la isobetanina e isobetanidina.



Isobetanina R=Glucosa
Isobetanidina R=H

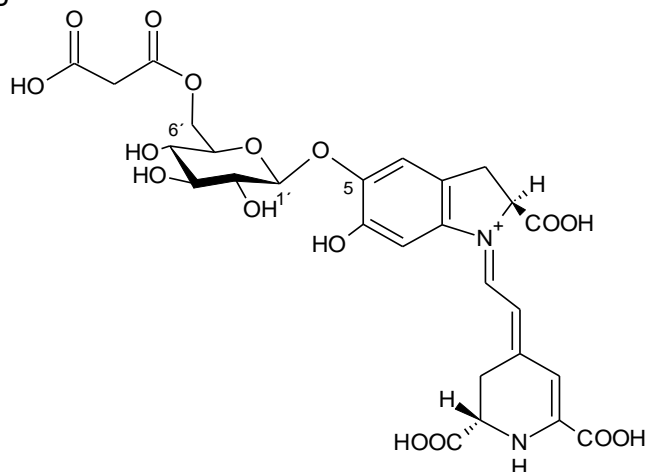
Fuente: BADUI DERGAL, Salvador. Química de los alimentos. 3 ed. Mexico: Pearson Education, 1993, 377-405 p.

Figura 8. Estructura de Hilocerenina.



Fuente: KHAN, Mohammad Imtiyaj y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: *Phytochemistry*. Septiembre, 2015, vol. 117, p. 267-295.

Figura 9. Estructura de la Filocactina.



Fuente: KHAN, Mohammad Imtiyaj y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: *Phytochemistry*. Septiembre, **2015**, vol. 117, p. 267-295.

3.3.1.1.1. Neobetacianinas y derivados.

Las neobetacianinas son betacianinas deshidrogenadas en la posición 14,15 (Figura 10), tienen características espectrales similares a las betaxantinas. A pesar de ser agrupados estructuralmente con los betacianinas, exhiben desplazamientos hipsocrómicos en sus máximos de absorción a 450-490 nm⁸⁹, no tiene centro quiral C-15 a diferencia de todos los demás betacianinas⁹⁰. La desprotonación de betalaínas se puede dar tras someterse bajo la influencia de un tratamiento térmico o debido a la oxidación del aire, sin embargo también se encuentran como componentes genuinos de las plantas^{91 92}, como la neobetainina que se caracterizan por un color amarillo (λ_{max} alrededor de 470 nm). Las neobetacianinas pueden además estar deshidrogenadas en la posición 2,3, exhibiendo un efecto hipsocrómico en su máximo de absorción a 408-422 nm⁹³. Recientes estudios también han mostrado la posibilidad de generación de compuestos descarboxilados a partir de neobetacianinas⁹⁴, donde la escisión de un grupo carboxilo disminuye los máximos de absorción por la deslocalización de electrones π , sin embargo la deshidrogenación es la principal responsable de los cambios de color⁹⁵.

⁸⁹ WYBRANIEC, Sławomir y MIZRAHI, Yosef. Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Julio, **2005**, vol. 53, no. 17, p. 6704-6712.

⁹⁰ MABRY, Tom J., *et al.* The conversion of betanidin and betanin to neobetainidin derivatives. En: *Tetrahedron*, **1967**, vol. 23, no. 7, p. 3111-3127.

⁹¹ SPÓRNA. Op. Cit., p. 29.

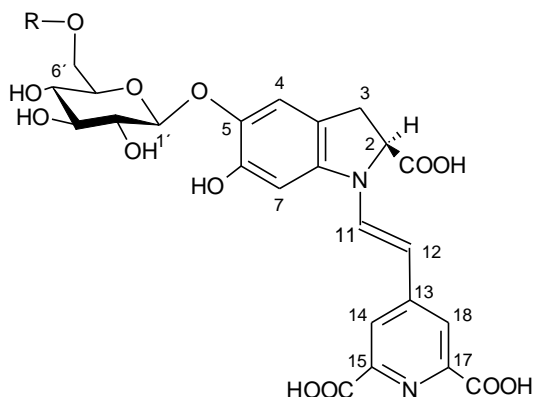
⁹² KHAN. Op. Cit., p. 26.

⁹³ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 26.

⁹⁴ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 39.

⁹⁵ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

Figura 10. Estructura de neobetacianinas.



R=H Neobetacianina

R= COCH₂C(OH)(CH₃)CH₂COOH Neohilocerenina

R= COCH₂COOH neofilocactina

Fuente: WYBRANIEC, Sławomir y MIZRAHI, Yosef. Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Julio, **2005**, vol. 53, no. 17, p. 6704-6712.

Como se ya se mencionó, estos compuestos no solo se encuentran en forma natural en las plantas sino que también son producto de degradación por lo que de ellos se hablará más adelante.

3.3.1.2. Betaxantinas.

Las betaxantinas son pigmentos amarillos que absorben a una longitud de onda máxima que varía entre 460 y 480nm. Estructuralmente son muy semejantes a las betacianinas, por la presencia del ácido betalámico, solo difieren de ellas en que el grupo indol es sustituido por un aminoácido o un grupo amino⁹⁶. Las betaxantinas son más lábiles que las betacianinas en relación 1:10. La primera betaxantina aislada y caracterizada por Piatelli y Minale en 1964 a partir de los frutos del cactus *Opuntia ficus-indica* fue la indicaxantina (figura 11), cuyo aminoácido es la prolina⁹⁷. Posteriormente, de la remolacha se ha aislado dos betaxantinas llamadas vulgaxantina I y II (Figura 12), ambas difieren en que la prolina ha sido sustituida por glutamina y ácido glutámico, respectivamente⁹⁸. También se ha aislado miraxantina III (tiramina-betaxantina) y V (dopamina-betaxantina) (Figura 13) en flores de *Mirabilis jalapa*, en acelga coloreada, *Beta vulgaris* entre otros⁹⁹.

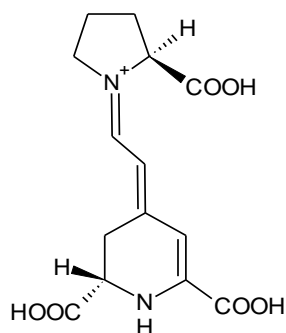
⁹⁶ BADUI. Op. Cit., p. 36.

⁹⁷ PIATTELLI. Op. Cit., p. 28.

⁹⁸ BADUI. Op. Cit., p. 36.

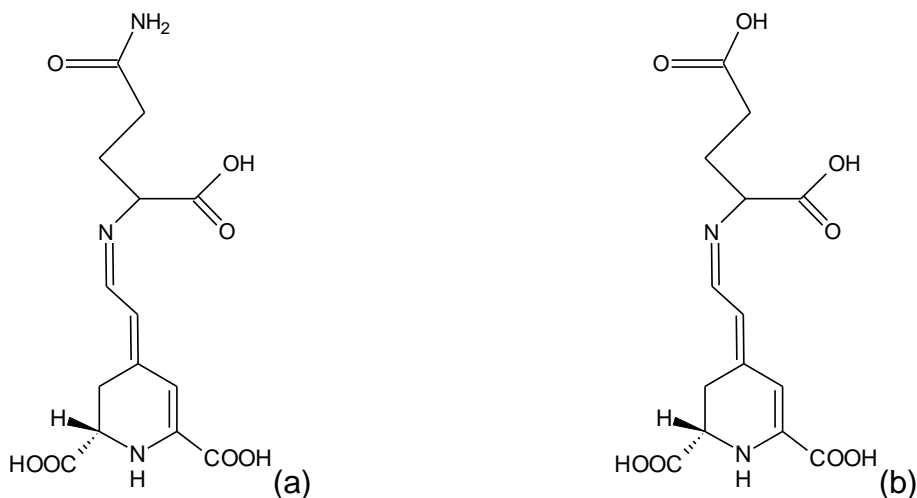
⁹⁹ GANDÍA HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA CARMONA, Francisco. Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. En: *Planta*. Octubre, **2005**, vol. 222, no. 2, p. 307-318.

Figura 11. Estructura de la indicaxantina.



Fuente: KHAN, Mohammad Imtiyaj y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *En: Phytochemistry*. Septiembre, 2015, vol. 117, p. 267-295.

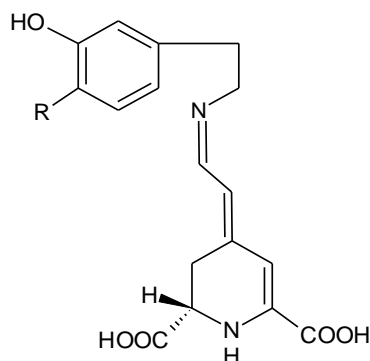
Figura 12. Estructura de la (a) Vulgaxantina I; (b) Vulgaxantina II.



Fuente: KHAN, Mohammad Imtiyaj y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *En: Phytochemistry*. Septiembre, 2015, vol. 117, p. 267-295.

Figura 13. Estructura de Miraxantina III y V.

Miraxantina III R=H
Miraxantina V R=OH



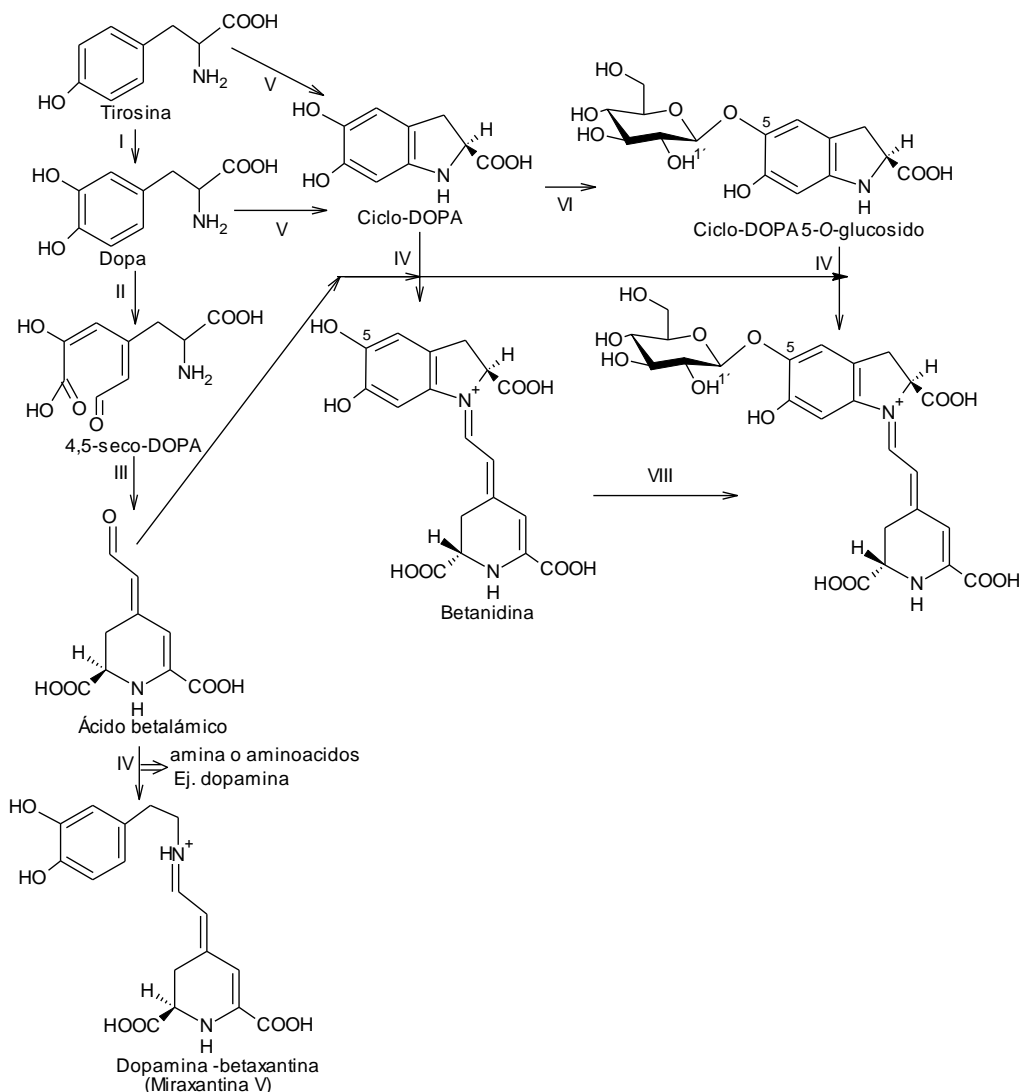
Fuente: GANDÍA HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA CARMONA, Francisco. Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. *En: Planta*. Octubre, **2005**, vol. 222, no. 2, p. 307-318.

3.3.2. Biosíntesis.

El primer paso de la biosíntesis de betalainas es la hidroxilación por actividad de la tirosina para formar DOPA (Figura 14, I). En el segundo paso, DOPA es convertido en 4,5-seco-DOPA por DOPA 4,5-dioxigenasa, seguido por ciclación espontánea para formar ácido betalámico (Figura 14, II-III). La formación de betaxantinas se da por la condensación del ácido betalámico con aminoácidos o aminas (Figura 14, IV). Para sintetizar betacianinas, se requiere la formación de ciclo-DOPA en la ruta biosintética (Figura 14, V), se piensa que es sintetizado a partir de tirosina por la polifenol oxidasa (PPO). La formación final de betacianinas implica la condensación de ácido betalámico y ciclo-DOPA (derivados), probablemente a través de reacciones espontáneas¹⁰⁰.

¹⁰⁰SEKIGUCHI, Hiroshi; OZEKI, Yoshihiro y SASAKI, Nobuhiro. Biosynthesis and Regulation of Betalains in Red Beet. *En: Red Beet Biotechnology. Food and Pharmaceutical Applications*. India, Bhagalakshmi N., **2012**, p.47.

Figura 14. Ruta biosintética de betaláinas.



*I, hidroxilación tirosina; II, escisión del anillo de DOPA catalizada por DOPA 4,5-dioxigenasa; III, ciclación espontánea dando lugar a ácido betalámico; IV, condensación espontánea con ácido betalámico; V, oxidación catalizada por la polifenol oxidasa y ciclación espontánea; VI reacción de ciclo-DOPA 5-O- glucosiltransferasa (GT); VII reacción de ciclo-DOPA glucósido glucuronosil transferasa; VIII reacción de betanidina 5 -O- GT.

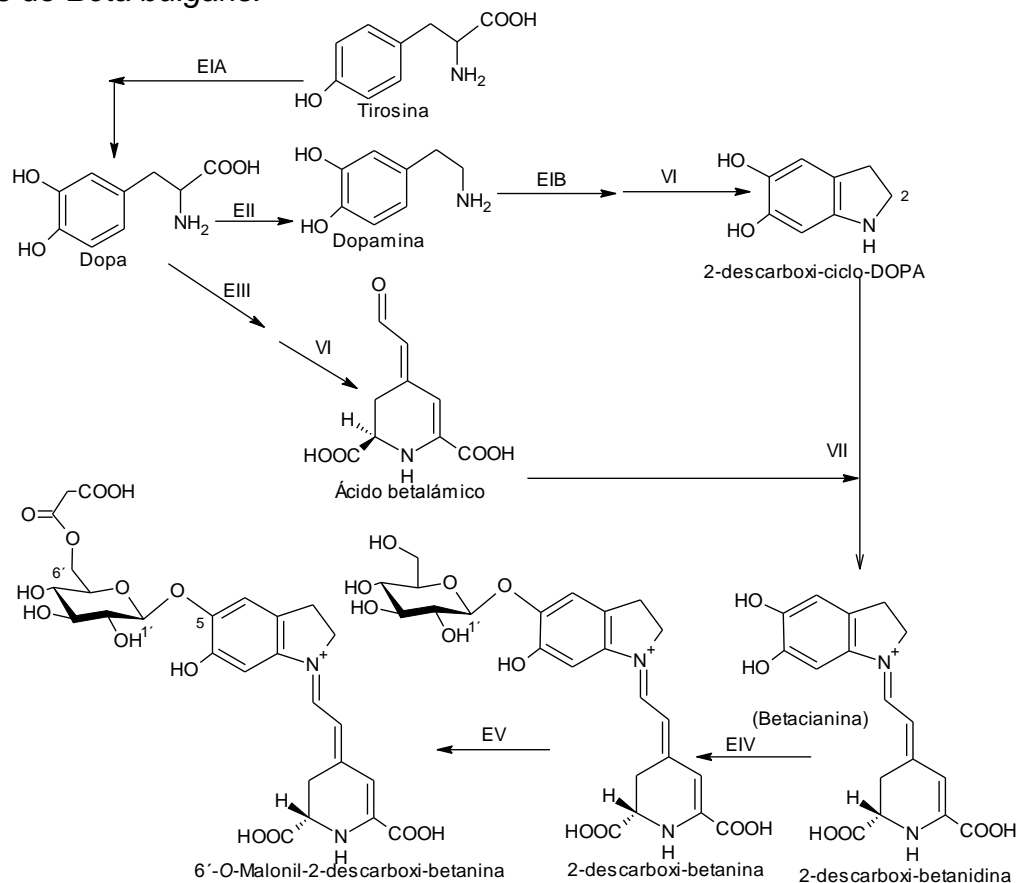
Fuente: SEKIGUCHI, Hiroshi; OZEKI, Yoshihiro y SASAKI, Nobuhiro. Biosynthesis and Regulation of Betalains in Red Beet. En: Red Beet Biotechnology. Food and Pharmaceutical Applications. India, Bhagyalakshmi N., **2012**, p.47.

Kobayashi *et al*¹⁰¹, publican que la 2-decarboxibetalaina se puede sintetizar tras la condensación entre el 2-decarboxi-ciclo-Dopa (generado a partir de dopamina) y ácido betalámico, seguido de glucosilación y acilación. A partir de estos datos se

¹⁰¹ KOBAYASHI, Naoko, *et al*. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. En: *Phytochemistry*. Marzo, **2001**, vol. 56, no. 5, p. 429-436.

propone una vía para la biosíntesis de betalaínas a partir de derivados de dopamina (Figura 15). Lo mismo fue reportado que ocurra realmente en las flores de *Carpobrotus acinaciformis* (L.) L. Bol. y en cultivos de raíces de remolacha amarilla

Figura 15. Ruta biosintética de betalaínas a partir de derivados de dopamina en raíces de *Beta vulgaris*.



*Los pasos enzimáticamente catalizados son: EIA, hidroxilación por actividad de la tirosina; EIB, oxidación por la actividad de la tirosina; EII, Dopa descarboxilasa; EIII, dopa 4,5 deshidrogenasa; EIV, glucosil-transferasa; EV, malonil transferasa. Reacción espontánea: VI, reacción de ciclación. Fuente: KOBAYASHI, Naoko, *et al.* Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *En: Phytochemistry*. Marzo, **2001**, vol. 56, no. 5, p. 429-436.

3.3.3. Métodos de extracción, separación y purificación de betalaínas.

Las betalaínas se extraen principalmente a través de extracciones sólido-líquido. El tejido vegetal se macera para facilitar la difusión de los pigmentos en el disolvente de extracción¹⁰², los pigmentos son usualmente extraídos con agua o

¹⁰² CARDOSO UGARTE, Gabriel Abraham, *et al.* Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *En: Food Science and Technology*. Noviembre, **2014**, vol. 59, no. 1, p. 276-282.

agua acidificada con HCl 0.1%. Sin embargo en la mayoría de los casos se requiere el uso de metanol o etanol en agua¹⁰³, en proporciones como: 60:40, 80:20¹⁰⁴, 50:50¹⁰⁵, para mejorar significativamente la separación de betalaínas y proteínas, reduciendo así la interferencia de proteínas en el análisis¹⁰⁶. Se recomienda, hacer una leve acidificación en el medio de extracción, ya sea por la adición de ácido ascórbico, ácido acético u otros ácidos, que estabilicen las betacianinas e inhiban la posible oxidación por PPO (enzima polifenoloxidasas). También es necesaria la adición de ácido ascórbico, cuando la actividad de la tirosinasa es alta y ciertas betaxantinas, como por ejemplo la miraxantina V, están presentes, de lo contrario, se produce una pérdida rápida y casi completa de miraxantina V¹⁰⁷. Además hay otros factores que pueden ayudar en la estabilidad del pigmento como la ausencia de luz durante la extracción, la adición de agentes quelantes,¹⁰⁸ como el EDTA¹⁰⁹ y la utilización de baja temperatura, que ayudaría a prevenir la degradación¹¹⁰.

La extracción con solventes implica la co-extracción de compuestos como azúcares y proteínas, por lo que se requieren procesos posteriores de purificación con técnicas en fase sólida y fase líquida como cromatografía en columna (CC), utilizando resinas como amberlita XAD-7¹¹¹. Este tipo de resina, está formada por polímeros acrílicos, al ser una resina medianamente polar, permite separar con mayor facilidad, moléculas polares como el azúcar, por la menor fuerza de adsorción en la fase estacionaria (Figura 16)¹¹².

¹⁰³ MULINACCI, Nadia y INNOCENTI, Marzia. Anthocyanins and betalains. En: Food Analysis by HPLC. 3 ed. CRC press, **2012**, 769-771 p.

¹⁰⁴ STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Analisis of betalains. En: Food Colorants: Chemical and Functional Properties. Carmen Socaciu, **2007**, 507-509 p.

¹⁰⁵ AZEREDO. Op. Cit., p. 23.

¹⁰⁶ CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. HPLC Characterization of Betalains from Plants in the Amaranthaceae. En: Journal of Chromatographic Science. Octubre, **2005**, vol. 43, no. 9, p. 454-460.

¹⁰⁷ STRACK. Op. Cit., p. 23.

¹⁰⁸ SHIVAPRIYA, Manchali. Stability of Betalain Pigments of Red Beet. En: Red Beet Biotechnology. Food and Pharmaceutical Applications. India, Bhagyalakshmi N., **2012**, p. 57-67.

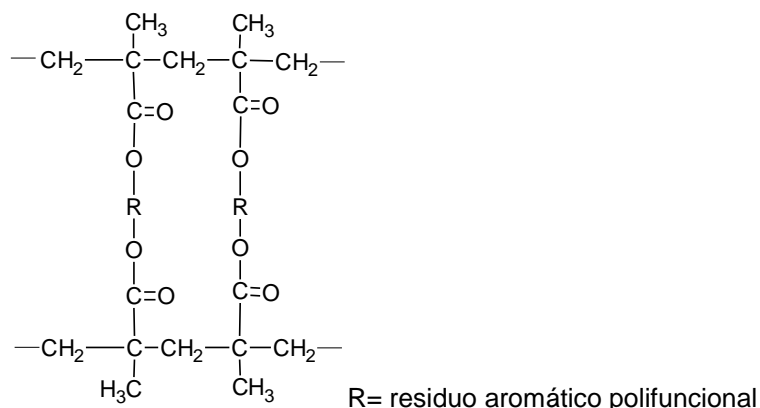
¹⁰⁹ AZEREDO. Op. Cit., p. 23.

¹¹⁰ SHIVAPRIYA. Op. Cit., p. 45.

¹¹¹ SANCHEZ GONZALEZ, Noe, *et al.* Extraction, Stability, and Separation of Betalains from Opuntia joconostle cv. Using Response Surface Methodology. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Noviembre, **2013**, vol. 61, no. 49, p. 11995-12004.

¹¹² KUNIN, Robert. The use of macroreticular polymeric adsorbents for the treatment of waste effluents. En: Macromolecular Chemistry-11. Jerusalén, Eisenberg H., **1975**, 206 p.

Figura 16. Estructura de la resina XAD-7.



Fuente: KUNIN, Robert. The use of macroreticular polymeric adsorbents for the treatment of waste effluents. En: Macromolecular Chemistry-11. Jerusalén, Eisenberg H., **1975**, 206 p.

Para la separación de betalaínas, en betaxantinas y betacianinas, se utiliza técnicas como cromatografía de columna (CC), y cromatografía en capa delgada (CCD). En CC, las fases estacionarias más usadas son resinas de intercambio iónico, sephadex, C₁₈. En CCD se usan soportes de celulosa¹¹³. La cromatografía en la mayoría de los casos, es prioritaria para HPLC preparativa¹¹⁴.

Para purificar y aislar las fracciones obtenidas de betalaínas, la técnica más usada es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), de tipo analítica y preparativa, porque permite separar, identificar y cuantificar. Lo que más comúnmente se usa es HPLC en fase reversa, en columnas C-18¹¹⁵, que están compuestas por partículas de sílice a las cuales se unen cadenas alifáticas de octadecil-silano (Figura 17)¹¹⁶. La elución generalmente consiste de un gradiente lineal, como solvente se usa agua acidificada¹¹⁷ con ácido acético, fórmico o ácido fosfórico y como fase orgánica acetonitrilo o metanol¹¹⁸. La identificación tentativa de las betalaínas puede ser deducida por su comportamiento cromatográfico y comprobada mediante el análisis de su espectro de absorción y tiempo de retención (T_R)¹¹⁹, en general las betaxantinas eluyen más rápido que las

¹¹³ DAVIES Kevin M. Annual Plant Reviews. Plant Pigments and their Manipulation. Palmerston norte, John Wiley & Sons, **2009**, Vol. 14, 328-331 p.

¹¹⁴ STRACK, Dieter y WRAY, Victor. Recent Advances in Betalain Analysis. En: Caryophyllales: Evolution and Systematics. Berlin, Springer Science & Business Media, **1994**, 263-264 p.

¹¹⁵ DAVIES. Op. Cit., p. 46.

¹¹⁶ GONZÁLEZ, Alvaro. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. España: Elsevier, 2010, 25 p.

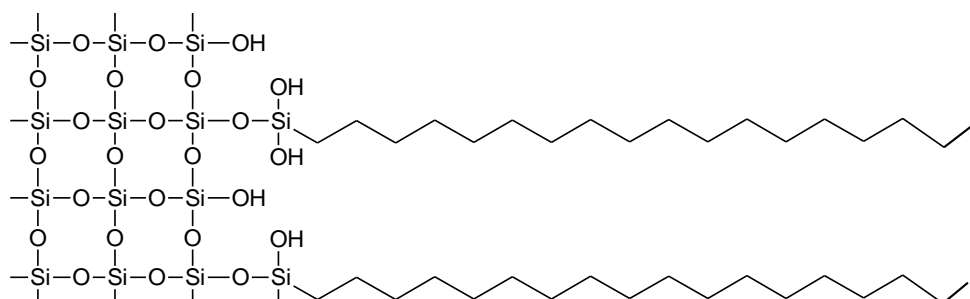
¹¹⁷ MULINACCI. Op. Cit., p. 45.

¹¹⁸ STRACK. Op. Cit., p. 23.

¹¹⁹ CASTRO MUÑOZ, Roberto. Efecto del secado por aspersión en la estabilidad de componentes bioactivos de tuna morada (Opuntia ficus-indica). Tesis de maestría en ciencias en bioprocesos. Mexico: Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, **2014**. 25 p.

betacianinas, la elución de betacianinas depende del número de azúcares unidos y las acilaciones. Las betacianinas se detectan usualmente entre 535 y 550nm, y las betaxantinas entre 475 y 480 nm. Las neobetacianinas y neobetacianinas descarboxiladas, muestran tiempos de retención superiores en HPLC en fase reversa debido a la formación de compuestos menos polares, que las correspondientes betacianinas¹²⁰, se distinguen claramente por la falta de segundo pico R-isómero y se detectan a longitudes de onda menores¹²¹.

Figura 17. Estructura fase C-18.



Fuente: [Citado el 14 de Noviembre de 2015] <<http://www.silicycle.com/products/siliachrom-hplc-columns/siliachrom-reversed-phases-hplc-columns/siliachrom-dt-hplc-columns>>

3.3.4. Métodos de detección y caracterización de betalaínas.

Existen muchos métodos para caracterizar betalaínas, como espectroscopía UV-vis, resonancia magnética nuclear (RMN), y espectroscopía de masas, la recopilación de información de la mayoría de estas técnicas permite identificar la estructura química o realizar una buena aproximación.

El análisis de betalaínas, como el de otros compuestos coloreados, se ha basado en la espectroscopía Uv-vis, las betacianinas son conocidas por mostrar dos máximos de absorción, una en el rango UV entre 270 y 280 nm debido a la estructura ciclo-dopa y una segunda en el rango visible a aproximadamente a 535-538 nm dependiendo del sistema disolvente. La acilación con ácidos hidroxycinámicos produce un tercer máximo aproximadamente a 300-330 nm, mientras que los derivados de ácidos alifáticos no son distinguibles de sus correspondientes betacianinas glicosidados¹²². Las betaxantinas amarillas tienen un máximo de absorción aproximadamente a 480 nm¹²³.

¹²⁰ WYBRANIEC, Sławomir. A method for identification of diastereomers of 2-decarboxy-betacyanins and 2,17-bidecarboxy-betacyanins in reversed-phase HPLC. *En: Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Noviembre, **2007**, vol. 389, no. 5, p. 1611-1621.

¹²¹ STRACK. Op. Cit., p. 46.

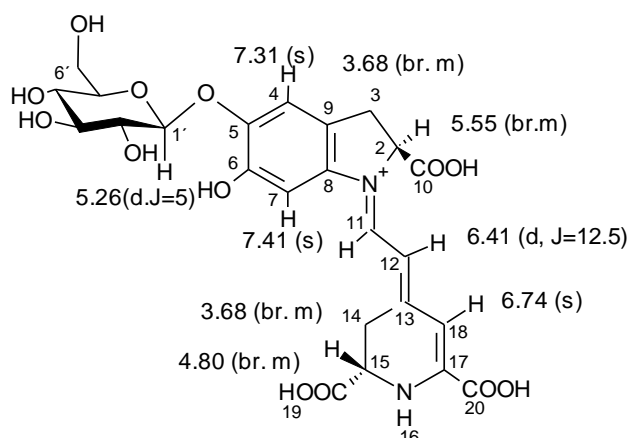
¹²² STINTZING. Op. Cit., p. 26.

¹²³ RESTREPO. Op. Cit., p. 26.

Para estudiar las betalaínas en una mezcla compleja, se utiliza cromatografía líquida acoplada a masas (HPLC-MS), ya que es un método que permite separar las betalaínas mediante cromatografía líquida e identificarlas por medio de las masas de sus iones moleculares¹²⁴. De este modo se puede detectar betalaínas individuales en mezclas sin un previo aislamiento¹²⁵. El método de ionización más reportado, es la ionización por electro spray (ESI), en modo positivo. A menudo se utiliza espectrometría de masas tandem (MS/MS), para conseguir mayor información acerca de la estructura de estos pigmentos, especialmente si están presentes en matrices complejas como los extractos de las plantas¹²⁶.

La elucidación de la estructura de la betalaína por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), generalmente se realiza por RMN ⁻¹H¹²⁷. En la figura 18 se muestran los distintos desplazamientos de resonancia magnética nuclear protónica de betanina.

Figura 18. Desplazamiento químico por RMN ⁻¹H, de betanina.



Fuente: SÁNCHEZ GONZÁLEZ, Noe. Extracción y caracterización de los principales pigmentos del opuntia *Opuntia joconoste* c.v. (xoconostle). Tesis de maestría en tecnología avanzada. México, D. F.: Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, **2006**, 37 p.

Para las betaxantinas los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento son similares a los encontrados en betacianinas¹²⁸, como se muestra en la figura 19 para indicaxantina.

¹²⁴ STINTZING. Op. Cit., p. 27.

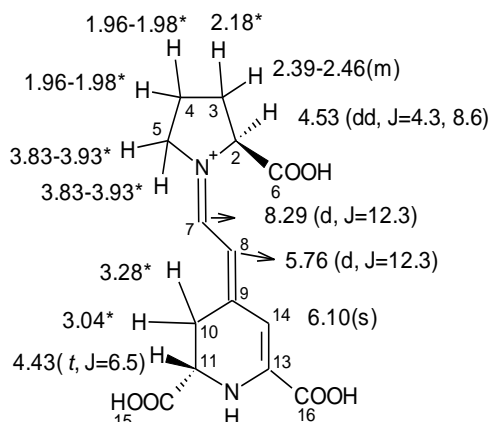
¹²⁵ DAVIES. Op. Cit., p. 46.

¹²⁶ MULINACCI. Op. Cit., p. 45.

¹²⁷ RESTREPO. Op. Cit., p. 26.

¹²⁸ DAVIES. Op. Cit., p. 46.

Figura 19. Desplazamiento químico por RMN ^1H de indicaxantina.



*Constante de acoplamiento en paréntesis

Fuente: STINTZING, Florian C., *et al.* ^{13}C -NMR Assignments of Betaxanthins. *En: Helvetica Chimica Acta*. Mayo, 2006, vol. 89, no. 5, p. 1008-1016.

Los desplazamientos de betalaínas, son difíciles de asignar basados solo en RMN ^1H , en recientes años, técnicas bidimensionales como COSY, TOCSY, entre otros, han proporcionado valiosa información para las asignaciones¹²⁹.

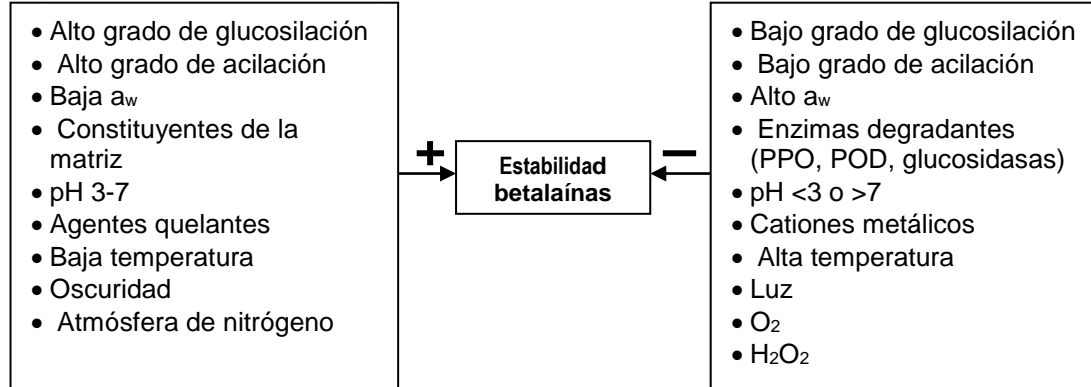
3.3.5. Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas.

Un requisito evidente de un colorante es su estabilidad a largo plazo, debiendo resistir no solo los procesos industriales de procesamiento a los cuales están sometidos los alimentos, como almacenamiento y temperatura, sino además factores externos durante el almacenamiento tales como temperatura, luz, exposición al oxígeno, pH e interacción con otros componentes que existen en la matriz. En la figura 20 se resumen los diferentes factores que influyen en la estabilidad de las betalaínas¹³⁰.

¹²⁹ DAVIES. Op. Cit., p. 46.

¹³⁰ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

Figura 20. Factores que rigen la estabilidad de las betalaínas.



Fuente: HERBACH, Kirsten, M.; STINTZING, Florian y CARLE, Reinhold. Betalain Stability and Degradation-Structural and Chromatic Aspects. En: Journal of Food Science. Mayo, **2006**, vol. 71, no. 4, p. R41-R50.

3.3.5.1. Estructura del pigmento.

La estabilidad depende de la estructura del pigmento, las betacianinas resultan ser más estables que las betaxantinas, según Singer y Von Elbe¹³¹ el tiempo de vida media de betanina tratada térmicamente, era 11 veces mayor en comparación a vulgaxanthin I. Además Herbach, Stintzing y Carle, reportan que vulgaxanthin I es más propensa a la oxidación y menos estable que betanina a valores de pH ácidos.

Comparando la estabilidad de diferentes estructuras de betacianina, se ha publicado que la glucosilación incrementa el tiempo de vida media de betanidina e isobetanidina 17 veces más, tras la degradación por el oxígeno¹³², Von Elbe y Attoe encontraron una mayor susceptibilidad de la aglicona (betanidina) a la destrucción por el oxígeno molecular comparado con betanina¹³³. De igual manera el alto grado de acilación incrementa la estabilidad de betalaínas¹³⁴

3.3.5.2. Efecto del pH.

Aunque las betalaínas exhiben una amplia estabilidad de pH que oscila entre 3 y 7¹³⁵, a condiciones de pH por encima o por debajo de este intervalo inducen fácilmente a la degradación. La termolabilidad de este tipo de pigmentos es probablemente el factor que más restringe su uso como colorante de alimentos; en

¹³¹ SINGER J. W. y VON ELBE J. H. Degradation rates of vulgaxanthine I. En: Journal of Food Science. Mayo, **1980**, vol. 45, no. 3, p. 489-491.

¹³² HERBACH. Op. Cit., p. 29.

¹³³ VON ELBE J.H. y ATTOE E.L. Oxygen involvement in betanine degradation-Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. En: Food and Chemical. **1985**, vol. 16, no. 1, p. 49-67.

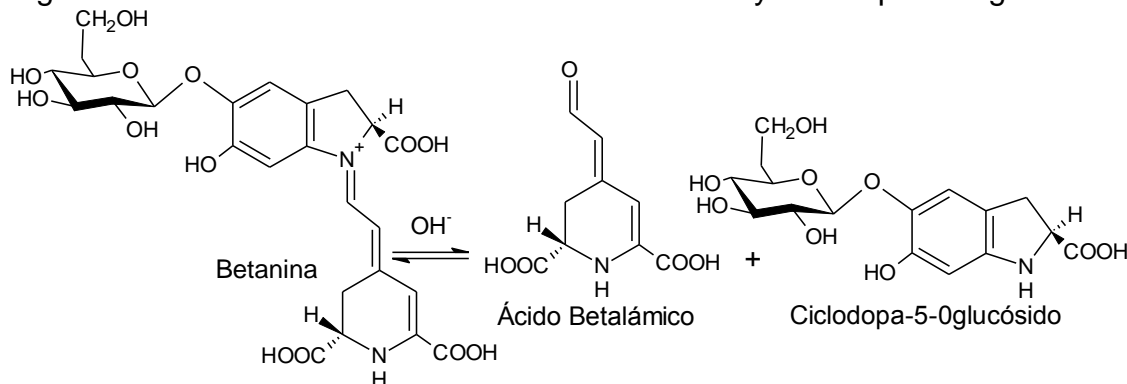
¹³⁴ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

¹³⁵ CARDOSO. Op. Cit., p. 44.

general, la estabilidad térmica es mayor entre pH 5 y 6 en presencia de oxígeno, y entre pH 4 y 5, en ausencia de oxígeno¹³⁶. El pH óptimo para la estabilidad de betanina fue reportado en un rango entre pH 4 y 6¹³⁷, mientras que a condiciones de temperatura elevada cambio el pH óptimo a 6¹³⁸. Por otra parte, en presencia de oxígeno, la betanina fue más estable entre pH 5,5 y 5,8, mientras que en condiciones anaerobias fueron favorables valores más bajos de pH desde pH 4,0 a 5,0¹³⁹.

En condiciones alcalinas, las betalainas se hidrolizan en ácido betalámico (compuesto amarillo con $\lambda_{\max}=412\text{nm}$ ¹⁴⁰) y ciclodopa-5-O-glucósido (incolore) para betacianinas (Figura 21) o un compuesto amino en betaxantinas, la acidificación induce a la regeneración de la betalainas¹⁴¹. En cuanto a los mecanismos de degradación en medio ácido no es claro aún. Se ha encontrado que estos procesos pueden causar la formación de neobetanina de color amarillo¹⁴².

Figura 21. Hidrólisis de betanina a ácido betalámico y ciclodopa-5-O-glucósido.



Fuente: SCHWARTZ, Steven J. y VON ELBE, Joachim. Identification of betanin degradation products. En: Z Lebensm Unters Forsch. Noviembre, **1983**, vol. 176, no. 6, p. 448–453.

3.3.5.3. Actividad del agua (a_w).

La actividad del agua (a_w) es un factor crucial para la estabilidad del almacenamiento de betalainas, debido a las reacciones hidrolíticas que dependen

¹³⁶ SING. Op. Cit., p. 36.

¹³⁷ VON ELBE J.H.; MAING Il-Young y AMUNDSON C.H. Colour stability of betanin. En: Journal of Food Science. Marzo, **1974**, vol. 39, no. 2, p. 334-337.

¹³⁸ HAVLIKOVÁ, Ludmila; MIKOVÁ, Kamila y KYZLINK, Vladimír. Heat Stability of Betacyanins. En: Z Lebensm Unters Forsch. Julio, **1983**, vol. 177, no. 4, p. 247-250.

¹³⁹ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

¹⁴⁰ HERBACH, Kirsten, M.; STINTZING, Florian y CARLE, Reinhold. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. En: European Food Research and Technology. Agosto, **2004**, vol. 219, no. 4, p. 377-385.

¹⁴¹ SCHWARTZ, Steven J. y VON ELBE, Joachim. Identification of betanin degradation products. En: Z Lebensm Unters Forsch. Noviembre, **1983**, vol. 176, no. 6, p. 448–453.

¹⁴² HERBACH. Op. Cit., p. 29.

del agua. Cai, Sun y Corke¹⁴³, encontraron una estabilidad superior durante el almacenamiento de los pigmentos de betacianinas secos, aislados de especies de *Amaranthus*, en comparación con las soluciones acuosas respectivas. En consecuencia, su contenido de humedad debe mantenerse por debajo del 5%¹⁴⁴.

3.3.5.4. Efecto del oxígeno y agentes antioxidantes.

Las betalaínas son propensas a la degradación en presencia de oxígeno. El consumo simultáneo de oxígeno y betanina corroboró la participación de O₂ en la degradación de betanina¹⁴⁵, por otra parte la betanina mostró un decrecimiento lineal en la estabilidad con el incremento en la concentración de oxígeno. La degradación de betanina sigue una cinética de primer orden en presencia de oxígeno, sin embargo en ausencia de O₂, la reacción se desvía de la cinética de primer orden, que sugiere que la reacción puede ser reversible bajo estas condiciones. Estas observaciones son un indicativo que la degradación causada por oxígeno puede ser irreversible y tiene un mayor impacto sobre la funcionalidad de cada pigmento¹⁴⁶. Además de oxígeno, también se reportó que el peróxido de hidrógeno acelera la degradación de betanina¹⁴⁷.

3.3.5.5. Efecto de cationes metálicos y agentes quelantes.

Varios estudios han mostrado que los iones ferroso, férrico y cúprico promueve la decoloración del pigmento de productos de betabel (remolacha). Se sugirió que la pérdida de color se debe a la posible formación de complejos metal-pigmento acompañado por un desplazamiento batocrómico e hipocrómico. En una investigación de formación de complejos de betanina y betanidina, los iones cúprico, cuproso, y mercurio causaron de inmediato un cambio de color, el cual fue más notable en betanidina¹⁴⁸, mientras que en presencia de EDTA en la solución, en niveles bajos (1ppm), se vio incrementada la estabilidad. El mecanismo por el cual el EDTA reduce la oxidación de betanina puede ser explicado por la habilidad que posee para quelar cationes metálicos polivalentes. También es propuesto que protege a la betanina por directa interacción con su centro electrofílico¹⁴⁹.

¹⁴³ CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Octubre, **1998**, vol. 46, no. 11, p. 4491-4495.

¹⁴⁴ CAI, Yizhong y CORKE, Harold. Effect of postharvest treatments on *Amaranthus* betacyanin degradation evaluated by visible/near-infrared spectroscopy. En: *Journal of Food Science*. Octubre, **2001**, vol. 66, no. 8, p. 1112-1118.

¹⁴⁵ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

¹⁴⁶SHIVAPRIYA. Op. Cit., p. 45.

¹⁴⁷ WASSERMAN, Bruce P.; EIBERGER, Laura L. y GUILFOY, Michael P. Effect of hydrogen peroxide and phenolic compounds on horseradish peroxidase-catalysed decolorization of betalain pigments. En: *Journal of Food Science*. Marzo, **1984**, vol. 49, no. 2, p. 536-538.

¹⁴⁸ BADUI. Op. Cit., p. 36.

¹⁴⁹ AZEREDO. Op. Cit., p. 23.

3.3.5.6. Efecto de la luz.

La luz deteriora la estabilidad de la betalaína, dicha susceptibilidad a la degradación se explica por la absorción de la luz en el rango UV y el visible, que conduce a la excitación de los electrones del cromóforo de betalaína a un estado con más energía, por lo que causa mayor reactividad o baja energía de activación de la molécula. Se sabe que la luz y el oxígeno causan la degradación de betanina en un 15,6% y 14,6%, respectivamente, su presencia simultánea incrementa el porcentaje de descomposición de betanina a un 28,6%¹⁵⁰. Attoe y Von Elbe¹⁵¹ reportaron que el oxígeno molecular era necesario para que la luz tenga un efecto significativo, mientras que en condiciones anaeróbicas su oxidación es insignificante¹⁵².

Para prevenir los efectos de degradación por exposición a la luz de betalaínas, Herbach *et al*¹⁵³, adicionaron ácido ascórbico al 1% antes del almacenamiento, encontrando que después de 6 meses, aproximadamente el 70% del contenido inicial de betacianina se retuvo, independientemente de la iluminación, a diferencia de las muestras a las cuales no se les adicione ácido ascórbico, que dieron lugar a una degradación significativa del pigmento.

3.3.5.7. Temperatura

La temperatura puede considerarse el factor más importante que influye en la estabilidad de betalaínas, tanto en el procesamiento como en el almacenamiento de alimentos. La velocidad de degradación se acelera con el aumento de temperatura y período de calentamiento¹⁵⁴. Los estudios sugieren que las betalaínas son considerablemente degradadas a temperaturas entre 50-80°C¹⁵⁵, formándose productos deshidrogenados, descarboxilados o una combinación de ellos (Figura 22)¹⁵⁶, que dan como resultado desplazamientos hipsocrómicos en sus máximos de absorción, convirtiéndose en productos de color amarillo¹⁵⁷.

¹⁵⁰ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

¹⁵¹ ATTOE, E. L. y VON ELBE, J. H. Photochemical degradation of betanin and selected anthocyanins. *En: Journal of Food Science*. Noviembre, **1981**, vol. 46, no. 6, p. 1934-1937.

¹⁵² AZEREDO. Op. Cit., p. 23.

¹⁵³ HERBACH, Kirsten, *et al*. Effects of processing and storage on juice color and betacyanin stability of purplepitaya (*Hyllocereus polyrhizus*) juice. *En: European Food Research and Technology*. Mayo, **2007**, vol. 224, no. 5, p. 649-658.

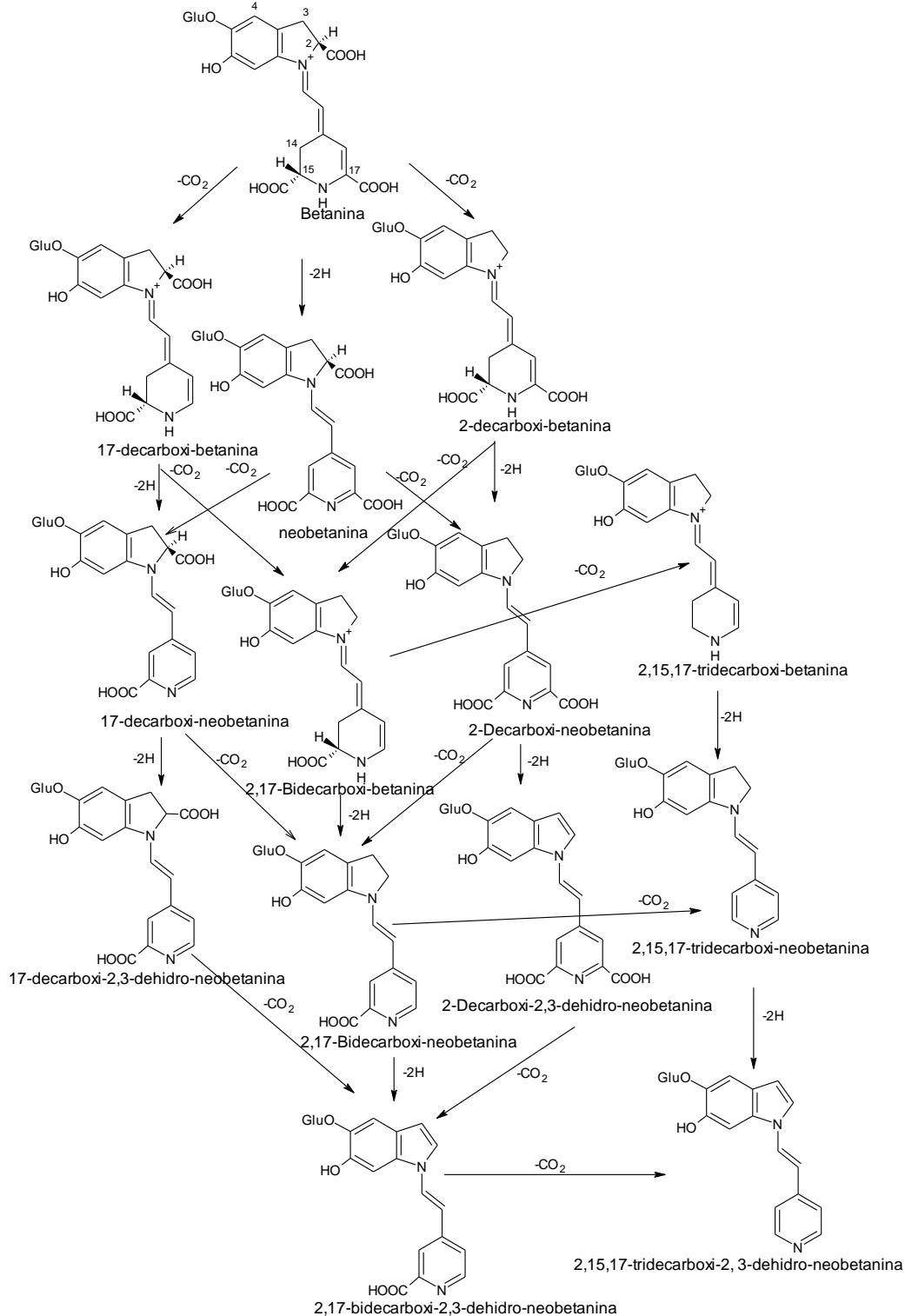
¹⁵⁴ SAGUY, Israel; KOPELMAN, Isaiah y MIZRAHI, Shimon. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marzo, **1978**, vol. 26, p. 360-362.

¹⁵⁵ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

¹⁵⁶ NEMZER, Boris, *et al*. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *En: Food and Chemical*. Julio, **2011**, vol. 127, no. 1, p. 42-53.

¹⁵⁷ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 39.

Figura 22. Rutas frecuentes de descarboxilación y deshidrogenación de betanina que ocurren posiblemente.



Fuente: NEMZER, Boris, *et al.* Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *En: Food and Chemical*. Julio, 2011, vol. 127, no. 1, p. 42-53.

Herbach *et al*¹⁵⁸, mostraron que tras el tratamiento térmico de zumo de pitaya púrpura (*Hylocereus polyrhizus*), se formaron compuestos neoderivados deshidrogenados de filocactina e hilocerenina de color amarillo. Siendo de especial interés la deshidrogenación en términos de cambio de color. Nemzer *et al*¹⁵⁹ mostraron que el calentamiento del jugo de remolacha roja a una temperatura entre 75-80 °C, por más de una hora en presencia de ácido, causó la degradación de betalaínas, formando una mezcla de muchos derivados deshidrogenados como: neobetanina (14,15-dehidrobetanina), 2,17-bidecarboxi-2,3-deshidro-neobetanina, 2-descarboxi-2,3-deshidro-neobetanina. Además, la calefacción produjo derivados descarboxilados de betacianinas, que incluía 17-descarboxi-betanina, 2-descarboxi-betanina, 2,17-bidecarboxi-betanina (Figura 22). Wybraniec y Mizrahi¹⁶⁰, generaron betacianinas deshidrogenadas y descarboxiladas, a partir de betacianinas purificadas obtenidas de pitaya púrpura (*Hylocereus polyrhizus*), tras someter a calentamiento. En la tabla 3, se muestra los tiempos de retención, valores de longitud de onda máxima, y m/z ([M+H]⁺) de los productos de degradación de hilocerenina.

Tabla 3. Tiempos de retención, datos espectroscópicos y de espectrometría de masas de productos de degradación de Hilocerenina.

Compuesto	T _r (min)	λ (max) nm	m/z [M+H] ⁺
hilocerenina	19.2	538	695
17-decarboxi-hilocerenina	22.1	505	651
2,17-bidecarboxy-hilocerenina	40.5	509	607
2,15,17-tridecarboxy-hilocerenina	44.0	506	563
neohilocerenina	30.0	485	693
2- decarboxi-neohilocerenina	41.6	487	649
deshidrogenada tridecarboxi-neohilocerenina	42.0	417	559
deshidrogenada bidecarboxi-neohilocerenina	43.5	407	603
2,17-bidecarboxi-neohilocerenina	45.1	460	605
2,15,17-tridecarboxi-neohilocerenina	46.5	443	561
deshidrogenada decarboxi-neohilocerenina	54.0	411	647

Fuente: WYBRANIEC, Sławomir y MIZRAHI, Yosef. Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Julio, **2005**, vol. 53, no. 17, p. 6704-6712.

3.3.6. Actividad antioxidante.

Los antioxidantes son compuestos que neutralizan químicamente productos activos del metabolismo, tales como radicales libres, que pueden causar daño al cuerpo humano y seres vivos. En los últimos años el interés de los investigadores

¹⁵⁸ HERBACH. Op. Cit., p. 53.

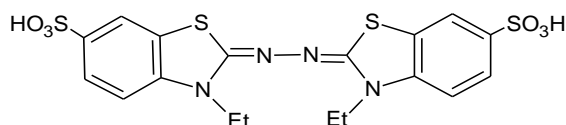
¹⁵⁹ NEMZER. Op. Cit., p. 53.

¹⁶⁰ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 39.

se ha centrado en encontrar antioxidantes naturales que tengan el potencial para proteger al humano de los daños inducidos por el estrés oxidativo¹⁶¹, causado por los radicales libres, que dañan el ADN y otras macromoléculas, originando enfermedades degenerativas, lesiones malignas y la muerte eventual de células vitales.^[41]

Diferentes métodos se han desarrollado para determinar la actividad antioxidante in vitro en distintos tipos de extractos de origen natural donde están presentes antioxidantes que se ha visto inhiben la generación de sustancias cromógenas de naturaleza radical, y su efecto se analiza por espectroscopía UV-Vis, detectando la disminución en su concentración por efecto del antioxidante. Diferentes compuestos radicales se emplean para ello a nivel in-vitro, entre los que se encuentra el ABTS (Figura 23, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)¹⁶². El método que usa como especie radical el ABTS, se llama TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox)

Figura 23. ABTS. Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico.



Fuente: SANTACRUZ CIFUENTES, Liliana. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Departamento de química, **2011**, 33-34 p.

3.3.6.1. Método TEAC.

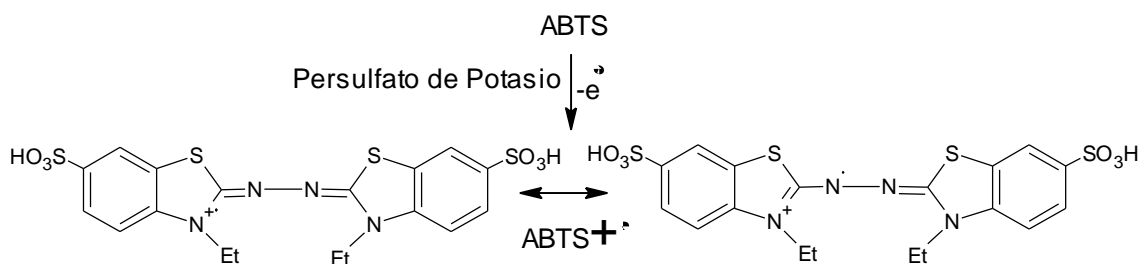
Mediante este método se debe generar el radical ABTS mediante una reacción con dióxido de manganeso o persulfato de potasio (Figura 24). El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El catión radical ABTS^{•+} una vez generado, pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a longitudes de onda de 414, 645, 734 y 815 nm, pero se mide a una λ de 734 nm, ya que estaría próxima a la región infrarroja reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria¹⁶³.

¹⁶¹ LUQUE, Matilde; RÍOS, Angel y VALCÁRCEL, Miguel. A poly (vinyl chloride) graphite composite electrode flow-injection amperometric determination of antioxidants. *En: Analytica Chimica Acta*. Agosto, **1999**, vol. 395, no.1-2, p. 217–223

¹⁶² KANELIS, Angelos y MANGANARIS, George. Antioxidants and bioactive compounds in fruits. *En: Fruit Ripening. Physiology, Signalling and Genomics*. Boston, Cabi, **2014**, 108 p.

¹⁶³ SANTACRUZ CIFUENTES, Liliana. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Departamento de química, **2011**, 33-34 p.

Figura 24. Formación del catión radical ABTS.



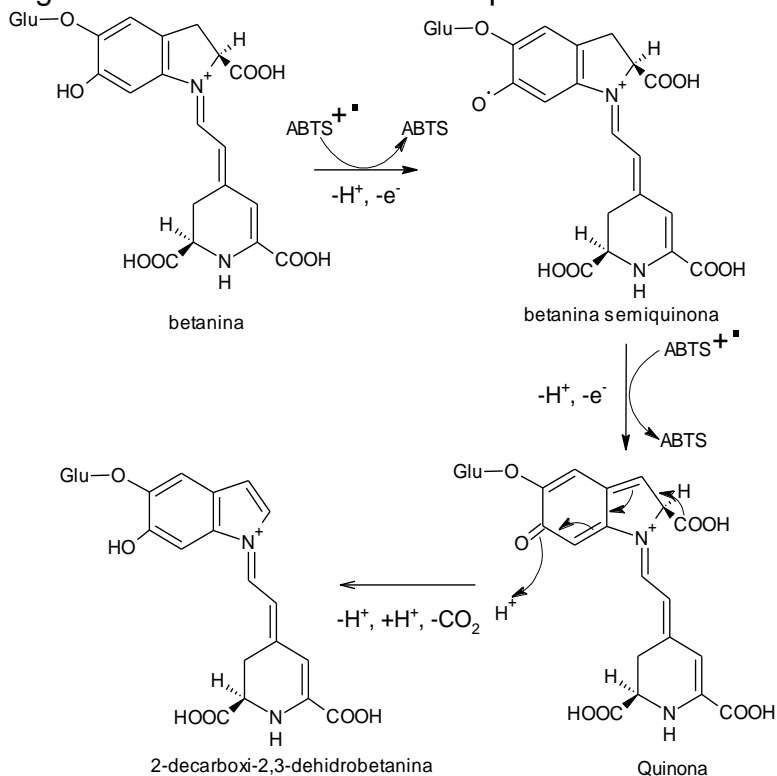
Fuente: OSMAN, A. M.; WONG, Ken Y. y FERNYHOUGH, Alan. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *En: Biochemical and Biophysical Research Communications*. Julio, **2006**, vol. 346, no. 1, p. 321-329.

3.3.6.1.1. Oxidación de betalainas por el radical ABTS.

Estudios recientes confirmaron el hecho de que la alta actividad antioxidante de estas moléculas se ve afectada por la presencia de uno o dos grupos fenólicos, pero se plantea la posibilidad de que otros factores estructurales desconocidos también deberían tenerse en cuenta. El mecanismo por el cual los radicales ABTS oxidan betalainas es también desconocido. Wybraniec *et al*¹⁶⁴, propusieron el primer mecanismo de oxidación del ABTS para betanina, sugieren que en la oxidación se forme una betanina semiquinona, la cual debe someterse a una posterior oxidación resultando un intermediario de quinona, cuyo reordenamiento da el producto de oxidación estable 2-descarboxi-2,3-dehidrobetanina (Figura 25).

¹⁶⁴ WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Studies on Nonenzymatic Oxidation Mechanisms in Neobetanin, Betanin, and Decarboxylated Betanins. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Junio, **2013**, vol. 61, n. 26, p. 6465-6476.

Figura 25. Oxidación de betanina por acción del catión radical ABTS.



Fuente: WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Studies on Nonenzymatic Oxidation Mechanisms in Neobetainin, Betainin, and Decarboxylated Betainins. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Junio, **2013**, vol. 61, n. 26, p. 6465-6476.

3.3.7. Fenoles totales.

Debido a que la actividad antioxidante está relacionada con el contenido de fenoles, es de gran importancia determinar la cantidad de fenoles totales en la muestra¹⁶⁵. Existe un método desarrollado por Folin y Ciocalteu, basado en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Este método consiste en someter la muestra a la acción del reactivo de Folin- Ciocalteu el cual está formado por mezcla de ácido fosfotungstico (H₃PW₁₂O₄₀) y ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀). Los compuestos fenólicos se reducen por transferencia de electrones a pH básico, generando una mezcla de óxidos azules de wolframio (W₈O₂₃) y molibdeno (Mo₈O₂₃), produciendo un espectro de absorción con una λ_{max} de 765nm, proporcional al contenido de fenoles en la muestra. Para determinar la cantidad de fenoles se realiza una curva de

¹⁶⁵ BELTRÁN OROZCO, Carmen, *et al.* Guillermo. Ácido ascórbico, contenido fenólico, y capacidad antioxidante de las variedades roja, cereza, amarilla y blanca del fruto del cactus de la pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *En: Agrociencia*. Febrero-Marzo, **2009**, vol. 43, no. 2, p. 153-161.

calibración con ácido gálico y se expresa los resultados como mg de ácido gálico /100 g de muestra¹⁶⁶.

3.4. OTROS TIPOS DE PIGMENTOS NATURALES

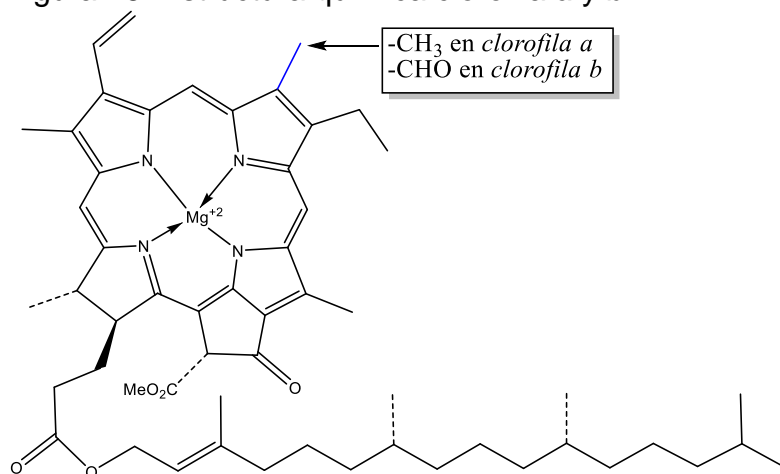
Aparte de las betalaínas existen otro tipo de pigmentos naturales, los cuales se mencionan a continuación

3.4.1. Clorofilas.

Las clorofilas son los pigmentos más apreciables de todas las plantas debido a su papel central en la fotosíntesis. Son insolubles en agua y están asociadas con la parte lipídica de las células en organelos especializados (los cloroplastos).

La clorofila natural consta de dos componentes, la clorofila *a*, verde azulada, y la clorofila *b*, verde amarillenta, que la acompaña en muy pequeña cantidad¹⁶⁷, la clorofila *b* se diferencia de la clorofila *a* solamente por estar sustituido el grupo metilo (-CH₃) del carbono 3 en el segundo anillo pirrólico, por un grupo aldehído (-CHO). (Figura 26)¹⁶⁸

Figura 26. Estructura química clorofila *a* y *b*.



Fuente: CAMPBELL, Neil A. y REECE, Jane B. Biología. 7 ed. Madrid: medica panamericana, 2007, 188 p.

¹⁶⁶ KUSKOSKI E. Marta, *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *En: Revista de Ciencia y Tecnología.* Octubre-Diciembre, 2005, vol. 25, no. 4, p. 726-732.

¹⁶⁷ WOLFGANG, W. *et al.* Manual de química orgánica. 19 ed. Barcelona, Reverte, 1987, 767-768 p.

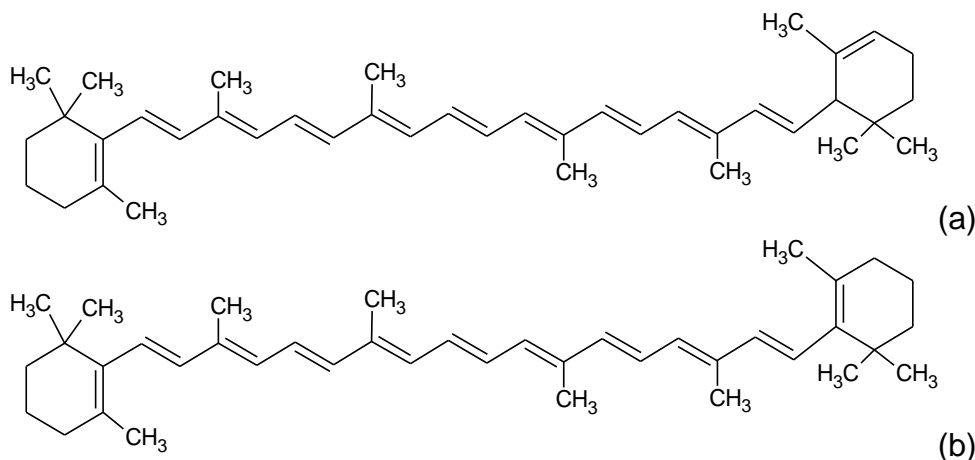
¹⁶⁸ CAMPBELL, Neil A. y REECE, Jane B. Biología. 7 ed. Madrid: medica panamericana, 2007, 188 p.

3.4.2. Carotenoides.

Los carotenoides constituyen un grupo de compuestos considerados como la fuente básica de los pigmentos distribuidos en las plantas; dan principalmente los colores rojo, amarillo y anaranjado. La estructura química básica de la mayoría de los compuestos es poliénica de 40 átomos formados por ocho unidades de isopreno, se pueden clasificar en dos grupos diferentes: en carotenos, con estructuras hidrocarbonadas, y xantófilas, que pueden contener en su estructura carbonada grupos como hidroxilo, metoxi, carboxi, ceto o epoxi. Entre la gran cantidad de carotenoides descritos sin duda, los más estudiados de los carotenos son α -caroteno (Figura 27.a), β -caroteno (Figura 27.b) y licopeno; y de las xantófilas, luteína (Figura 28.a), zeaxantina (Figura 28.b) y criptoxantina¹⁶⁹.

Existe una diferencia de solubilidad entre carotenos y xantófilas, los carotenos son menos polares, y se disuelven mejor en éter, éter etílico, y benceno, mas no en metanol, el metanol disuelve mejor los carotenoides oxigenados¹⁷⁰. Para la identificación de los carotenoides se usa el espectro de absorción UV-Vis, normalmente aparecen tres máximos (Figura 29) cuyas longitudes de onda (λ) dependen del número de dobles enlaces conjugados (d.e.c.) y del disolvente empleado para la medida¹⁷¹.

Figura 27. Estructura química carotenos. (a) α - caroteno; (b) β -caroteno.



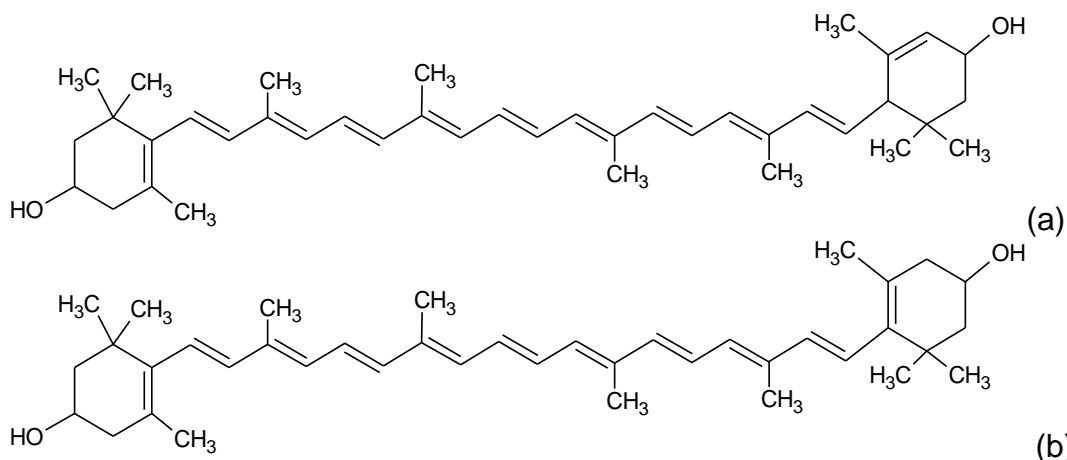
Fuente: HERNANDEZ, Ángel Gil. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos. 2 ed. Madrid, Médica Panamericana, **2010**, 418-419 p.

¹⁶⁹ HERNANDEZ, Ángel Gil. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos. 2 ed. Madrid, Médica Panamericana, **2010**, 418-419 p.

¹⁷⁰ PRIMO YÚFERA, E. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Barcelona, Editorial Reverte, **1995**, vol. 2, 869-870 p.

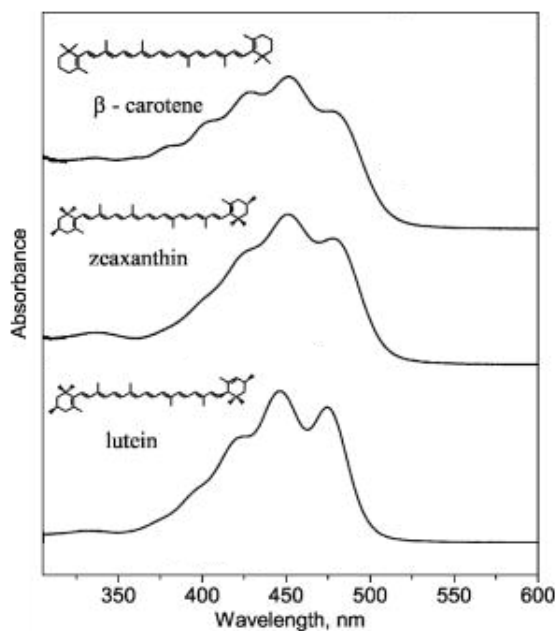
¹⁷¹ MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J.; VICARIO, Isabel M. y HEREDIA, Francisco J. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. En: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **2007**, vol. 57, no. 2, p. 109-117.

Figura 28. Estructura química xantófilas. (a) Luteína; (b) Zeaxantina.



Fuente: HERNANDEZ, Ángel Gil. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos. 2 ed. Madrid, Médica Panamericana, **2010**, 418-419 p.

Figura 29. Espectro de absorción UV-Vis de carotenoides.



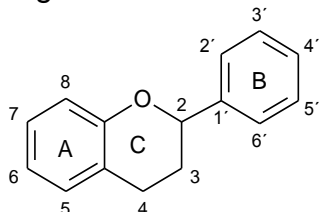
Fuente: ERMAKOV, Igor, *et al.* Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue, *En: Journal of Biomedical Optics*. Noviembre-Diciembre, **2005**, vol. 10, no. 6, doi:10.1117/1.2139974.

3.4.3. Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos fenólicos, comprenden varias clases de colores: Amarillo, naranja, rojo violeta y azul. Su estructura consta de dos anillos aromáticos A y B conectados a través de tres carbonos que usualmente forman un

heterociclo de oxígeno denominado C (Figura 30), en la tabla 4, se muestra la clasificación de los flavonoides en función de las características estructurales¹⁷²

Figura 30. Estructura química flavonoides.



Fuente: MARTÍNEZ FLÓREZ, S., *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *En: Nutrición Hospitalaria*. Agosto, **2002**, vol. 17, no. 6, p. 271-278.

Tabla 4. Clasificación de los flavonoles.

Nombre	Descripción	Estructura base
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo	<p>The structure shows a flavanone base. It has a benzene ring (A) with substituents R₃, R₄, and R₅. Ring C has a hydroxyl group (OH) at position 3. Ring B has substituents R₁ and R₂.</p>
Flavonas	Posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C, y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	<p>The structure shows a flavone base. It has a benzene ring (A) with substituents R₃, R₄, and R₅. Ring C has a carbonyl group (C=O) at position 4. Ring B has substituents R₁ and R₂.</p>
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un –OH en posición 3 del anillo C	<p>The structure shows a flavonol base. It has a benzene ring (A) with substituents R₃, R₄, and R₅. Ring C has a carbonyl group (C=O) at position 4 and a hydroxyl group (OH) at position 3. Ring B has substituents R₁ and R₂.</p>
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además posee un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	<p>The structure shows an anthocyanidin base. It has a benzene ring (A) with substituents R₃, R₄, and R₅. Ring C has a double bond between carbons 3 and 4, and a hydroxyl group (OH) at position 3. Ring B has substituents R₁ and R₂.</p>

Fuente: MARTÍNEZ FLÓREZ, S., *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *En: Nutrición Hospitalaria*. Agosto, **2002**, vol. 17, no. 6, p. 271-278.

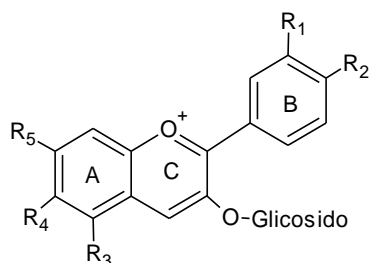
¹⁷² MARTÍNEZ FLÓREZ, S., *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *En: Nutrición Hospitalaria*. Agosto, **2002**, vol. 17, no. 6, p. 271-278

Cuando las antocianidinas (agliconas), se encuentran en su forma glicosilada (unido a un resto de azúcar) se denominan antocianinas.¹⁷³

3.4.3.1. Antocianinas.

Las antocianinas son los pigmentos hidrosolubles más importantes dentro de esta familia de flavonoides, con una amplia gama de colores rojo, azul y violeta. Presentan una o más moléculas de azúcar y ácidos orgánicos adheridas en diferentes posiciones hidroxiladas o en la estructura básica (Figura 31)¹⁷⁴. Se comportan como indicadores ácido-base, a pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y moradas; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones verdes y azules. Con esta prueba se pueden diferenciar las antocianinas de las betacianinas.¹⁷⁵

Figura 31. Estructura química antocianina.



Fuente: CASTAÑEDA OVANDO, Araceli, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review. En: Food Chemistry. Abril, **2009**, vol. 113, no. 4, p. 859-871.

En cuanto a la estabilidad de las antocianinas, difiere en gran medida a la de las betalaínas, respecto al pH. Considerando que las antocianinas generalmente son más intensamente coloreadas en medios de pH bajo, mientras que las betalaínas se caracterizan por una óptima estabilidad de pH entre 5-7. En consecuencia, los productos alimenticios con valores de pH hasta 3 generalmente se colorean con antocianinas, los que presentan acidez inferior con betalaínas. Aunque ambas clases de pigmento se han investigado por separado con respecto a sus cualidades de color en los alimentos¹⁷⁶.

¹⁷³ CASTAÑEDA OVANDO, Araceli, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review. En: Food Chemistry. Abril, **2009**, vol. 113, no. 4, p. 859-871.

¹⁷⁴ FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. En: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **1989**, vol. 28, no. 4, p. 273-314.

¹⁷⁵ MARTÍNEZ, A. Flavonoides. Medellín, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, **2005**, 8-15 p.

¹⁷⁶ STINTZING, Florian C.; TRICHTERBORN, Jam y CARLE, Reinhold. Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. En: Food Chemistry. Enero, **2006**, vol. 94, no. 2, p.296-309.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. RECOLECCIÓN MATERIAL VEGETAL

El muestreo de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) se realizó en el mes de Junio del 2014, en el municipio de San Lorenzo, corregimiento el Carmen, vereda San José bajo (Figura 32), con ubicación geográfica de 1°35'15.2"N de latitud y 77°11'19.1"O de longitud, a 1.920 m.s.n.m

El muestreo del fruto se realizó de forma aleatoria, tomando como referencia 60 árboles distribuidos en un área de aproximadamente 20000 m², para la recolección del fruto se tuvieron en cuenta características visuales como color y tamaño.

La planta quedó clasificada por el herbario de Universidad de Nariño, con el código: 45988.

Figura 32. Muestreo pitaya amarilla, municipio san Lorenzo.

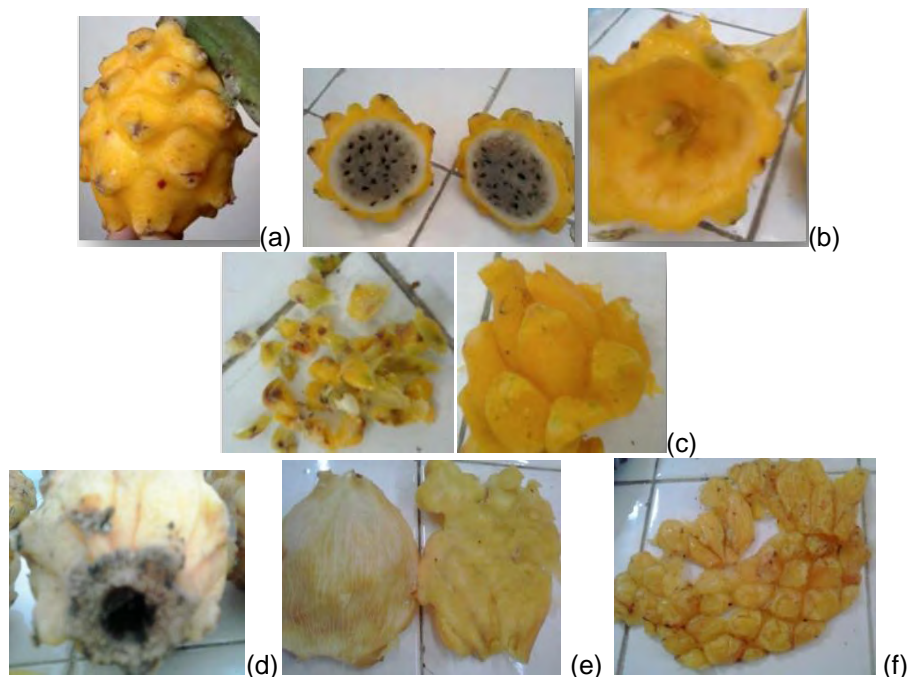


Fuente: Esta investigación.

4.2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para obtener la muestra de trabajo, inicialmente de 12.097 kg de fruto, se separó manualmente la cáscara de la pulpa y posteriormente a la cáscara se le eliminaron las mamilas, ápice, pedúnculo y albedo (Figura 33), en este procedimiento se obtuvieron 3,025 kg de cáscara de color amarillo, que corresponden a un 25 % de fruto total.

Figura 33. Procesamiento material vegetal.



*(a) Fruto pitaya amarilla; (b) Separación de la cáscara y pulpa; retiro de: (c) Mamilas o brácteas; (d) Albedo; (e) Pedúnculo; (f) Cáscara para procesar.

Fuente: Esta investigación.

4.3. ENSAYOS PRELIMINARES

Se probaron diferentes condiciones de ensayo en la extracción de betalaínas, variando el solvente (metanol o etanol acidificado en proporción 95:5); controlando el pH a 5 o 7, tras la adición de soluciones buffer de citrato-fosfato (rango 2.6-7¹⁷⁷);

¹⁷⁷ AHMED, Hafiz. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. London, CRC Press, 2004, 6 p.

variando los tiempos de extracción. Para cada extracto obtenido, se midió un espectro UV-Vis en el rango de 200 a 700nm, en un espectrofotómetro Pharo Merk. En él proceso se encontró que además de los pigmentos tipo betalaínas, hay otro tipo de pigmentos tipo xantófilas que le confieren el color amarillo a la cáscara del fruto.

4.4. EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS.

Dado a que en ensayos preliminares se encontró que en la cáscara de pitaya amarilla hay dos tipos de compuestos, se dividió en dos partes la cáscara, realizándose la extracción con metanol para pigmentos tipo betalaína y con acetato de etilo para pigmentos tipo xantófila.

4.4.1. Obtención extracto crudo (ECM) con metanol acidificado.

Se siguió la metodología de Sánchez *et al*¹⁷⁸, con algunas modificaciones, para lo cual se maceró la cáscara y se dejó en contacto con metanol acidificado con HCl 1%, en proporción 95:5, hasta un pH alrededor de 5, por 12 horas, se filtró, rotaevaporó y se sometió a sequedad, obteniéndose el extracto crudo de pitaya amarilla (Figura 34). Todos los procedimientos se realizaron a temperaturas menores de 40°C y protegidos de la luz, al sólido de color amarillo obtenido se lo denominó ECM.

Figura 34. Obtención extracto crudo ECM de pitaya amarilla con metanol.



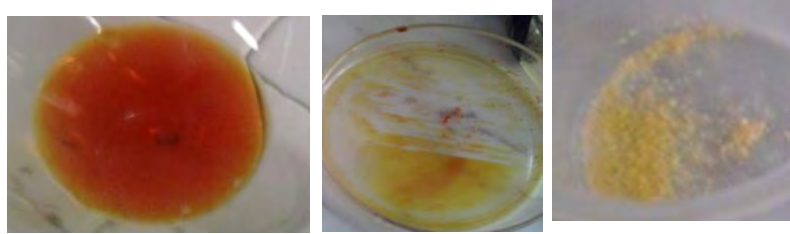
Fuente: Esta investigación.

4.4.2. Obtención extracto crudo (ECA) con acetato de etilo.

Se maceró el material vegetal con acetato de etilo por 12 horas, se filtró, rotaevaporó y se sometió a sequedad, obteniéndose el extracto crudo de pitaya amarilla (Figura 35). Todos los procedimientos se realizaron a temperaturas menores de 40°C y protegidos de la luz. Al sólido obtenido se lo denominó ECA

¹⁷⁸ SANCHEZ. Op. Cit., p. 45.

Figura 35. Obtención extracto crudo ECA de pitaya amarilla con acetato de etilo.



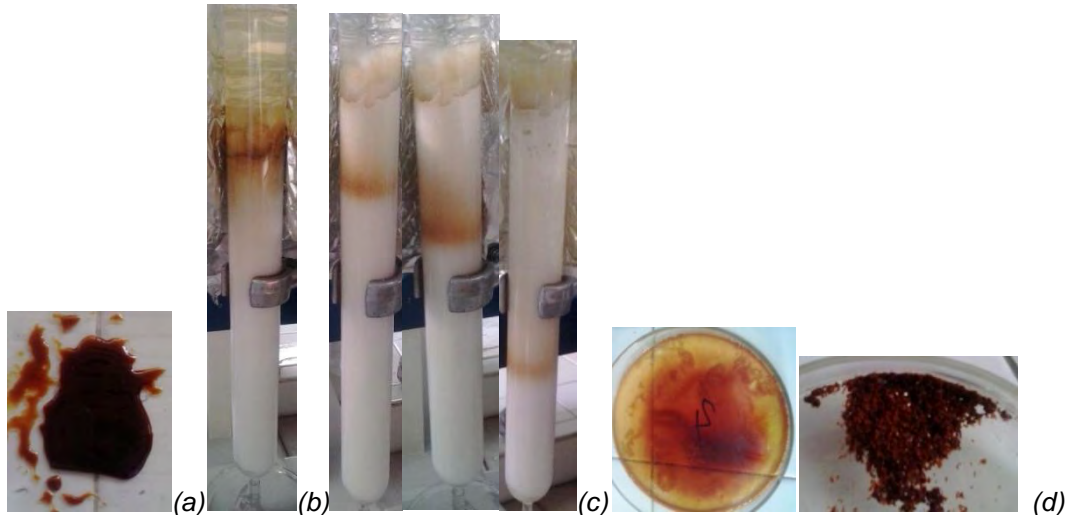
Fuente: Esta investigación.

4.5. PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS

4.5.1. Purificación extracto crudo ECM.

El extracto crudo ECM, aislado con metanol (compuestos más polares), se cargó en una columna cromatográfica de 28 cm de largo y 4 cm de diámetro, empacada con XAD-7 como fase estacionaria¹⁷⁹. Para separar los azúcares, sales y aminoácidos se utilizó como primer eluyente agua destilada, la eliminación de azúcares se controló con un refractómetro ATAGO 60, midiendo los grados brix^o del agua obtenida en el proceso de elución¹⁸⁰. La fracción de color amarillo retenida se eluyó con metanol y se concentró al vacío. Al sólido de color amarillo obtenido de lo denominó extracto purificado EPM (Figura 36), que fue almacenado bajo refrigeración para posteriores análisis.

Figura 36. Purificación del extracto crudo ECM.



*(a) Extracto crudo ECM; (b) lavado de azúcares; (c) elución fracción amarilla con metanol puro y (d) extracto purificado EPM.

Fuente: Esta investigación.

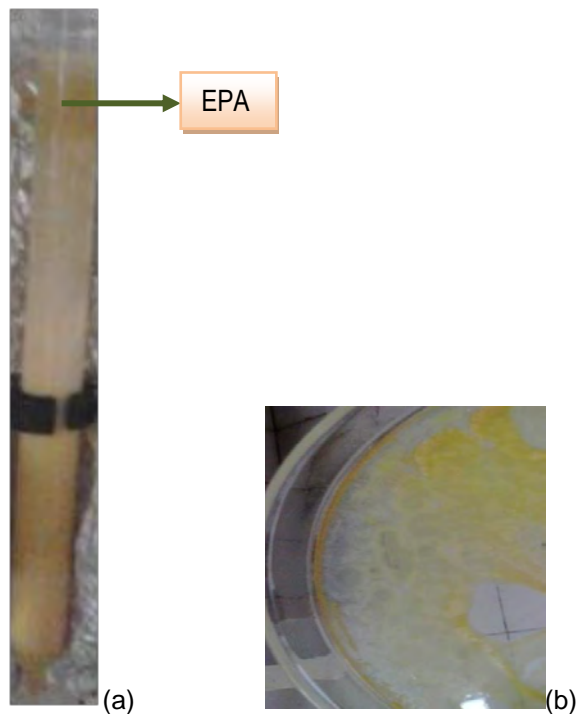
¹⁷⁹ SANCHEZ. Op. Cit., p. 45.

¹⁸⁰ STINTZING. Op. Cit., p. 27.

4.5.2. Purificación extracto crudo ECA.

El extracto crudo ECA aislado con acetato de etilo, se cargó en una columna cromatográfica, empacada con XAD-7 como fase estacionaria, este procedimiento se realizó para separar los compuestos tipo betalaína que también extrajo el solvente, los cuales fueron eluidos con metanol puro, y para eluir los compuestos tipo xantófila, se usó como solvente acetona. La fracción menos polar se concentró al vacío, al sólido obtenido se lo denominó EPA (Figura 37)

Figura 37. Fraccionamiento del extracto crudo ECA.



*(a) Fraccionamiento de ECA; (b) Sólido EPA.
Fuente: Esta investigación.

4.6. ANÁLISIS POR HPLC ANALÍTICO

El extracto purificado (EPM), obtenido de la extracción con metanol acidificado, se analizó por HPLC analítica en un equipo Waters 1525, con detector de arreglo de diodos DAD y equipado con una columna C-18 Xterra, 3.5 μ m de 4.6x150mm, para lo que se siguió la metodología de Stintzing, Schiebe y Carle¹⁸¹, con algunas

¹⁸¹ STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *En: European Food Research and Technology*. Abril, **2003**, vol. 216, no. 4, p. 303-311.

modificaciones, utilizando como fase móvil A ácido fórmico 1% y B acetonitrilo/Agua 80/20. La separación comenzó isocráticamente con 100% de A, seguido de un gradiente lineal de 0% a 20% de B en 10 minutos, a un flujo de 0.5 µl/min, luego un gradiente lineal de 20% a 100% de B en 15 minutos y el reequilibrio a las condiciones de partida. Las eluciones fueron monitoreadas a 280, 410, 480 y 538 nm.

Para la fracción EPA (pigmentos tipo xantófila), se siguió la metodología de Yamauchi y Watada¹⁸², con algunas modificaciones. Utilizando como fase móvil A metanol/agua, 80/20 y B Acetona, en una columna analítica, waters spherisorb 5µm ODS2 4.6x100mm. La separación comenzó isocráticamente con 100% de B, seguido de un gradiente lineal de 0% a 25% de A en 25 minutos, manteniéndose en 25% de A y 75% B por 5 minutos y el reequilibrio a las condiciones de partida, a un flujo de 0.8 µl/min. Las eluciones fueron monitoreadas a 410, 480 y 538 nm, con el fin de comprobar la presencia de carotenoides.

Dado a que el objetivo de la investigación son los pigmentos tipo betalaina, los análisis posteriores se realizaron a los extractos EPM y/o ECM.

4.7. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE MASAS (HPLC-MS-ESI)

El extracto purificado EPM, se analizó por HPLC-MS-ESI modo positivo, en un equipo LCMS-2010 EV, equipado con una columna Kinetex Phenomenex C₁₈ (150x2,1mm i.d.;2,6µm), a un flujo de 0,4 mL/min usando como fase móvil A, H₂O:HCOOH(99:1,v/v) y B, ACN:H₂O:HCOOH (80:19:1,v/v/v), con un gradiente 0-20% B (0-35min), 20–100%B (35-40min), 100–0%(40-50min), Las eluciones fueron monitoreadas a 280, 410, 480 y 538 nm. La muestra fue disuelta en la fase móvil A: (H₂O:ACN:HCOOH, 90:9:1 v/v/v)

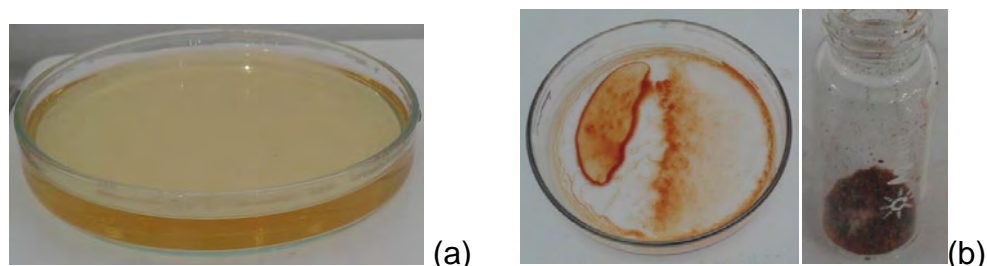
4.8. PURIFICACIÓN DEL PIGMENTO MAYORITARIO POR HPLC-SEMI PREPARATIVA

Se purificó el pigmento mayoritario del extracto EPM, por HPLC-semi preparativa, utilizando el equipo de HPLC descrito en el apartado 4.6, al cual se le acoplo una columna cromatográfica C₁₈ (250*10nm, 5µm)

¹⁸² YAMAUCHI, Naoki y WATADA, Alley E. Chlorophyll and xanthophyll changes in broccoli florets stored under elevated CO₂ or ethylene-containing atmosphere. *En: Postharvest Biology and Technology*. Febrero, **1998**, vol. 31, no. 1, p. 114-117.

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de separación, fue necesario realizar diferentes ensayos, teniendo como variables el gradiente de elución y el flujo de fase estacionaria. Finalmente la mejor separación se obtuvo bajo un gradiente isocrático (sistema de solventes descrito en apartado 4.6), con una composición 30:70 de fase móvil A y B, a un flujo de 1µl/min. En los ensayos se usó un volumen de inyección de 200 µl y una concentración de 12mg/ml. Para remover el solvente, la fracción fue concentrada a una temperatura inferior a 30°C, al sólido obtenido se lo denominó FP (Figura 38), el cual se almacena en refrigeración, para un análisis posterior por RMN-¹H.

Figura 38. Pigmento mayoritario purificado por HPLC-semi preparativa



*(a) Remoción solvente; (b) sólido FP.
Fuente: Esta investigación.

4.9. CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA UV-Vis

Para la caracterización por espectroscopía UV-Vis, se realizó un barrido de 200 a 700nm, en un espectrofotómetro Pharo Merk.

4.10. DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO RMN-¹H PARA EL COMPONENTE MAYORITARIO

El análisis por RMN-¹H del componente mayoritario purificado, se realizó en la Universidad del Valle.

4.11. FENOLES TOTALES

Se determinó el contenido de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu para el extracto crudo (ECM) y purificado (EPM), la concentración de los extractos fue de 10020 y 1150ppm respectivamente.

En un balón aforado de 10 ml se adicionó 0.1 ml de la solución a analizar, 0.5 ml del reactivo de Folin Ciocalteu y 1.5 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20% p/v, después de aforar con agua destilada, se dejó en reposo por 2 horas aproximadamente, posteriormente se tomó lectura de la absorbancia a 765nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

De igual manera se realizó una curva de calibración de ácido gálico con soluciones de 50, 150, 250 y 500 ppm. Los resultados se expresaron en mg ácido gálico /g extracto, mg ácido gálico /100 g cáscara y mg ácido gálico/100g fruto fresco¹⁸³. Todos los análisis se realizaron por triplicado

4.12. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* POR EL MÉTODO TEAC

La capacidad antioxidante se midió utilizando el método TEAC, a los extractos crudo (ECM) y purificado (EPM), para lo cual se siguió la metodología de Re *et al*¹⁸⁴.

Inicialmente se preparó el catión radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$ tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 2,45 mM), la solución final se dejó en reposo y en oscuridad durante 24 horas. Una vez formado el radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$, se diluyó con metanol HPLC hasta obtener un valor de absorbancia de $0.909 \pm 0,0005$ a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción).

A continuación se prepararon soluciones patrón de Trolox en concentraciones de 0.5, 1.5 y 2mM. Para la preparación de la curva de calibrado, se adiciono 30 μL de las soluciones de trolox anteriormente preparadas, a 3 ml de la solución de $\text{ABTS}^{*\cdot}$, se agito durante 1 minuto y se dejó en reposo por 6 minutos. Finalmente se realizó la medición de absorbancia a 734nm.

Para determinar la actividad antioxidante de las muestras a analizar, se prepararon soluciones a 2550 y 520 ppm de ECM y EPM respectivamente y se siguió la metodología antes descrita para la preparación de la curva de calibración, solo que se utilizaron 30 μL de cada extracto.

Los resultados se expresaron en μmol trolox /g extracto, μmol trolox /100g cáscara y μmol trolox/g fruto fresco. La funcionalidad del método se verifico con un patrón de ácido ascórbico de concentración 1.0056mM. Todas las mediciones se realizaron por triplicado

¹⁸³ ALVAREZ, Edwin, *et al.* Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del genero *Vismia* (*guttiferae*). *En: Vitae*. Junio, **2008**, vol. 15, no. 1, p. 165-172.

¹⁸⁴ RE, Roberta, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *En: Free Radical Biology and Medicine*. Mayo, **1999**, vol. 26, no. 9-10, p.1231-1237.

4.13. ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS

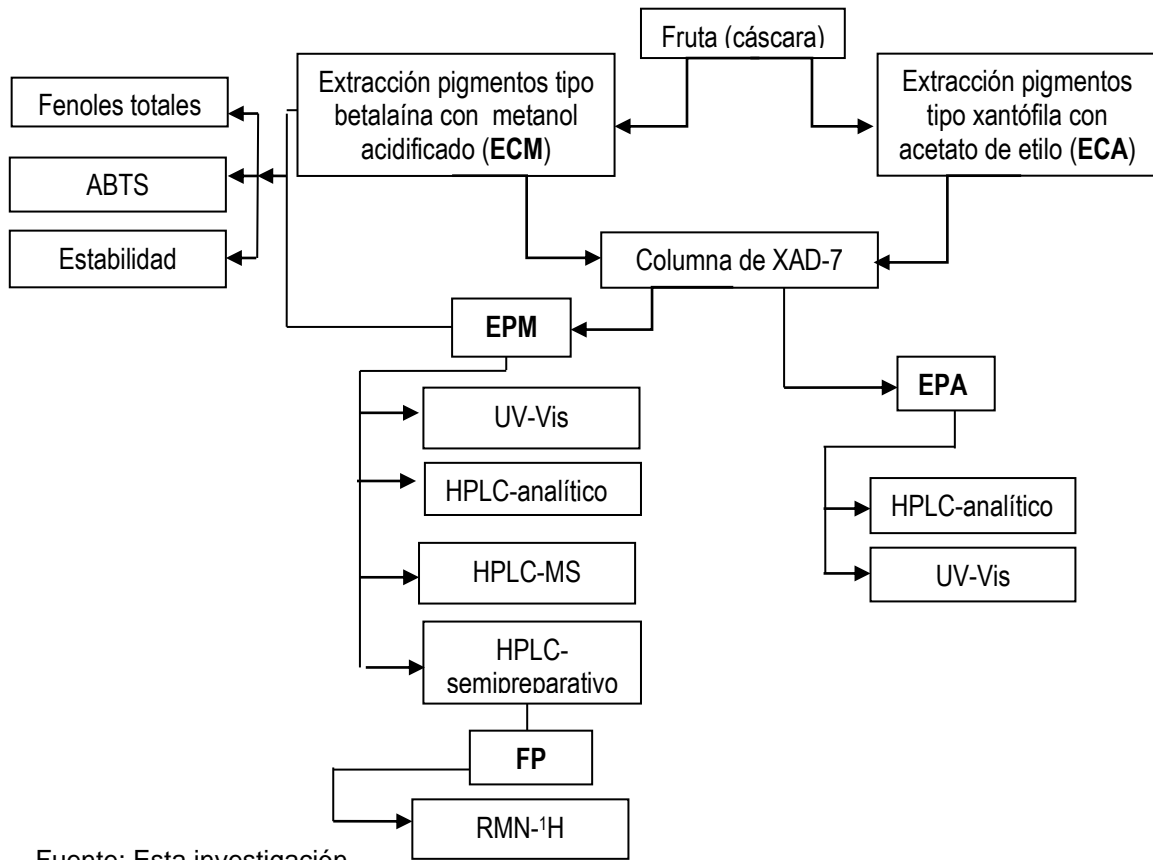
Se evaluó la estabilidad de los extractos ECM y EPM, a temperatura ambiente, variando el pH y la luz, siguiendo la metodología de Hurtado y Pérez (2014)¹⁸⁵ con algunas modificaciones. Para ello se prepararon soluciones buffer de citrato-fosfato para valores de pH de 3, 5 y 7. A 10ml de cada solución, se le adiciono el extracto a analizar, hasta llevarlo a un valor de absorbancia cercana a 1. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente, en ausencia (AL) y presencia de luz (PL); para esta última condición se usó un bombillo marca sylvania de 20w, 120-127V, las muestras se dispusieron a la misma distancia de la fuente de luz, la cual emite una intensidad luminosa de 50.85 ± 0.055 lumen, este parámetro se midió con un luxómetro extech instrument.

Análisis estadístico: Cada condición se evaluó por triplicado. Los análisis de varianza (ANOVA) se llevaron a cabo mediante el uso de stargraphics, versión 16.1.15 para Windows, para comprobar las diferencias significativas entre los valores medios de los tratamientos ($P < 0,05$).

La metodología que se siguió para el análisis de los pigmentos presentes en la cáscara de pitaya se muestra en forma resumida en el diagrama 1

¹⁸⁵ HURTADO, Nelson y PÉREZ, Milena. Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante de las Antocianinas Aisladas de la Cáscara del Fruto de Capulí (*Prunus serotina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). En: *Inf Tecnol*. Febrero, **2014**, .vol. 25, no. 4, p. 131-140.

Diagrama 1. Metodología para el análisis de los pigmentos presentes en la cáscara de pitaya amarilla.



Fuente: Esta investigación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. PIGMENTOS TIPO BETALAÍNA

5.1.1. Ensayos preliminares.

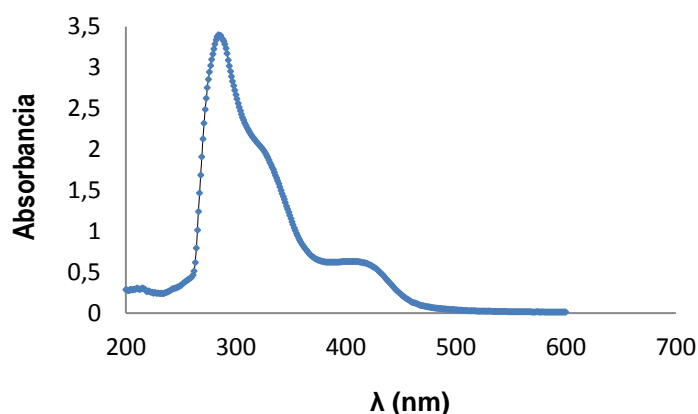
Los ensayos preliminares se hicieron en frutos provenientes del Valle del Cauca, Huila o Nariño, adquiridos en el mercado potrerillo o en supermercados éxito, mas no en el lugar de muestreo, en el municipio de San Lorenzo, ya que la pitaya amarilla es un fruto silvestre que tiene épocas de sobreoferta y escasez, y hay fechas que es más difícil de adquirirlo.

Uno de los objetivos de la investigación fue implementar un método de extracción de los pigmentos tipo betalaínas, pigmentos que como se mencionó anteriormente, se supondría que estén presentes en la familia de las cactáceas, familia a la cual pertenece la pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*).

Una característica importante de los pigmentos betalaínicos es su espectro de absorción, presentando una banda distintiva en la región visible, para betacianinas y betaxantinas, a 538 y 480nm respectivamente. De acuerdo al color de la cáscara (color amarillo) se esperaría que el extracto estuviera rico en betaxantinas que absorben a 480nm, sin embargo el perfil del espectro UV-Vis del extracto crudo en la solución acidificada de metanol, mostro una longitud de onda máxima alrededor de 410nm (Figura 39), esta se observó independientemente del lugar de procedencia del fruto.

Con el propósito de descartar que la absorción a 410 nm fuera producto de la degradación en el proceso de extracción de los pigmentos, se controló el pH (buffer 5 ó 7), se estabilizó la muestra con ácido ascórbico, se redujo el tiempo de extracción y se trabajó en ausencia de luz. Sin embargo luego de todos estos controles la absorción en 410 nm no sufrió modificación, concluyéndose de esta forma que en la fruta existen compuestos que absorben a esta longitud de onda.

Figura 39. Espectro UV-VIS del extracto crudo de pitaya amarilla proveniente del Valle del Cauca.



Fuente: Esta investigación.

5.1.2. Características iniciales del fruto de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*).

De acuerdo a la clasificación realizada por el herbario de la Universidad de Nariño, la planta de pitaya amarilla recolectada en el municipio de San Lorenzo, pertenece a la familia de las cactáceas, cuyo nombre científico es *Selenicereus megalanthus* (Código: 45988).

Los frutos objeto de este trabajo se seleccionaron, de acuerdo con la norma NTC 3554, con un grado de madurez 5, por su coloración amarilla, con la punta de las mamilas ligeramente verdosas¹⁸⁶.

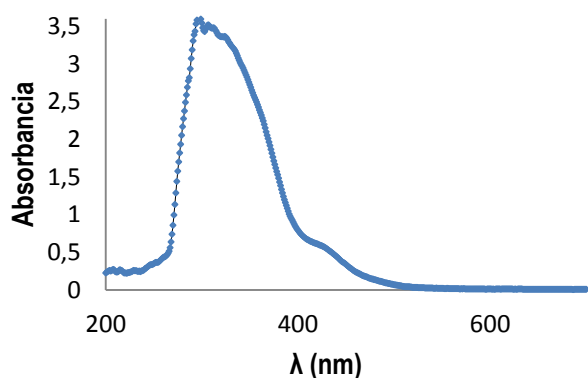
5.1.3. Extracción y purificación de los pigmentos tipo betalaína.

Mediante un proceso de extracción sólido-líquido con metanol acidificado, se obtuvo alrededor de 1.3% (respecto a la cáscara) de extracto crudo (ECM). Dado al alto contenido de azúcares (34°Brix aproximadamente), fue necesario una posterior purificación por medio de cromatografía en columna (CC), utilizando como fase estacionaria una resina medianamente polar como la XAD-7¹⁸⁷, el porcentaje de extracto purificado (EPM) obtenido fue de aproximadamente de 0.1% (respecto a la cáscara). El espectro UV-Vis de EPM, se muestra en la figura 40.

¹⁸⁶ INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS Y CERTIFICADOS. Op. Cit., p. 35.

¹⁸⁷ KUNIN. Op. Cit., p. 45.

Figura 40. Espectro UV-VIS del extracto purificado de pitaya amarilla proveniente del municipio San Lorenzo.

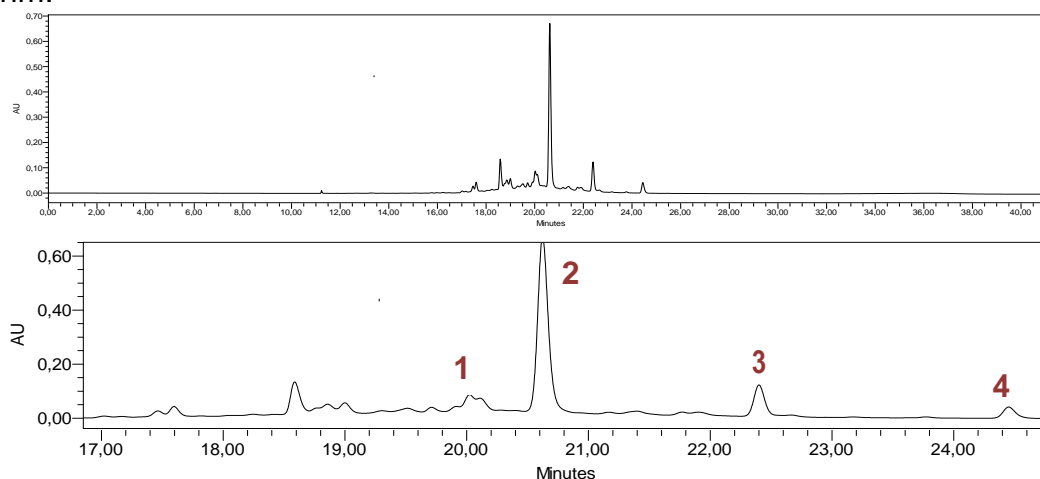


Fuente: Esta investigación.

5.1.4. Análisis por HPLC modo analítico del extracto EPM.

Para el análisis de HPLC-DAD, del extracto purificado EP, se usó una columna en fase reversa, C-18 Xterra, la columna se caracteriza por la sustitución del grupo -OH (del grupo funcional silanol) (Figura 17), por un grupo metilo¹⁸⁸. Al ser la columna apolar, los compuestos polares tendrán menor fuerza de adsorción, por tanto el orden de elución será de mayor a menor polaridad. A 410 nm, se muestran 4 señales (Figura 41), los tiempos de retención y porcentajes de área se indican en la tabla 5. Las señales no numeradas no se tuvieron en cuenta porque el perfil en la región visible no tiene características de pigmento.

Figura 41. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximo de absorción a 410nm.



Fuente: Esta investigación.

¹⁸⁸ SMITH, Roger. Column liquid chromatography. En: chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - part a: fundamentals and techniques. 6 ed. Amsterdam, E. Heftmann, **2004**, 108 p.

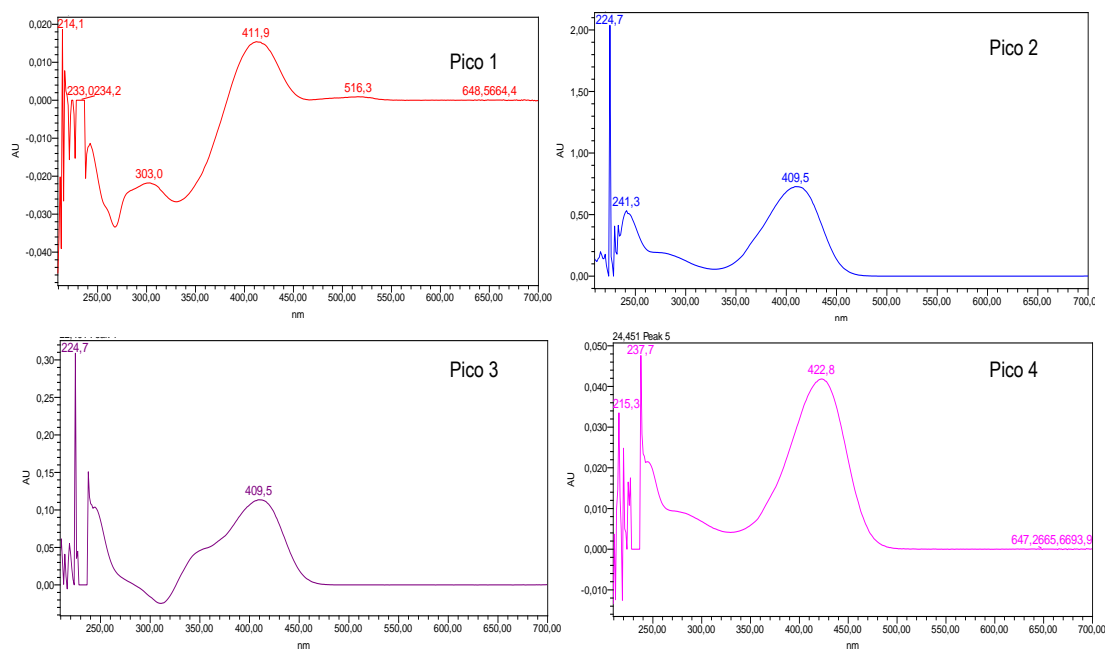
Tabla 5. Tiempos de retención y porcentajes de área de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto EPM.

Señal	Tr (min)	% Área
1	20,124	0,82
2	20,623	79,85
3	22,400	14,17
4	24,451	5,16

Fuente: Esta investigación.

En los espectros UV-Vis tomados on line, se observan bandas entre 409.5 y 422.8nm (figura 42). Estos resultados muestran claramente que en la cáscara de pitaya amarilla, hay compuestos que absorben a longitudes de onda alrededor de 410nm, como se mencionó anteriormente.

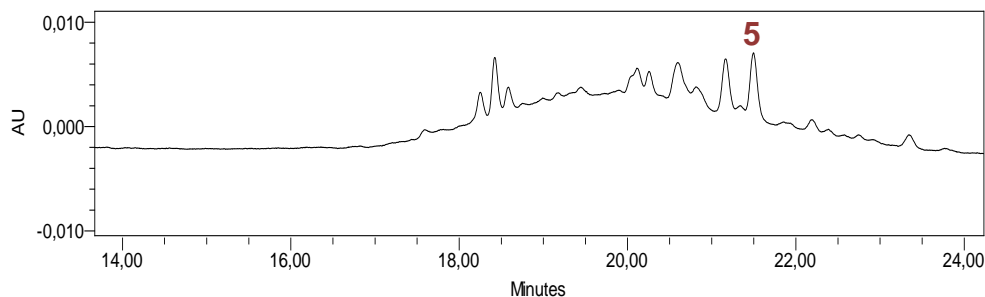
Figura 42. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos del 1 al 4 presentes en el extracto EPM.



Fuente: Esta investigación.

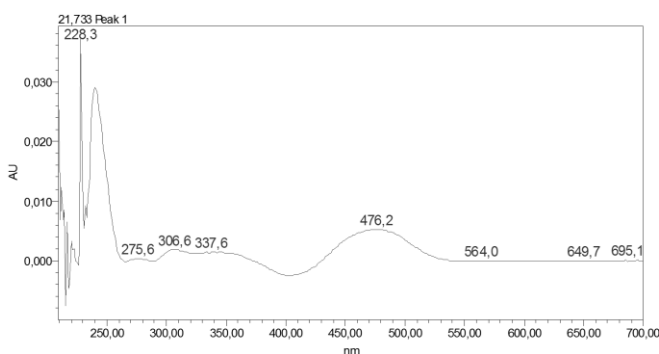
A 538 nm, longitud de onda donde absorben las betacianinas, no se observa señales, mientras que a 480nm de longitud de onda donde absorben las betaxantinas, solo se observa 1 señal con tiempo de retención de 21,433min, como se muestra en la figura 43. En el espectro UV-Vis, se observa una longitud onda de máxima absorbancia alrededor de 476.2nm (Figura 44)

Figura 43. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximos de absorción a 480nm.



Fuente: Esta investigación.

Figura 44. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 5.

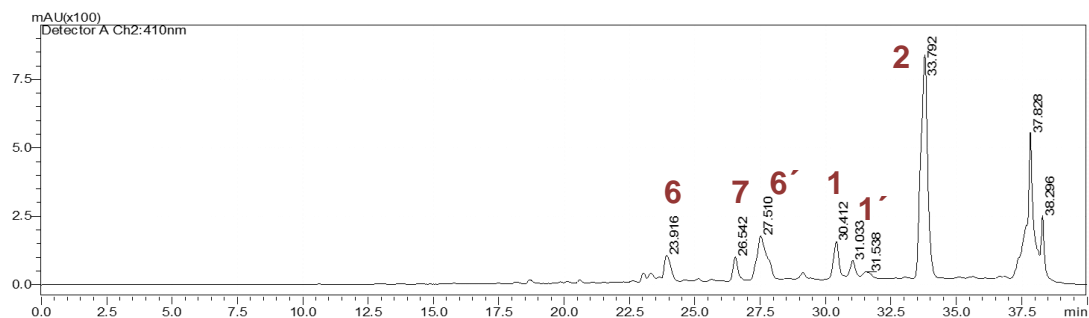


Fuente: Esta investigación.

5.1.5. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

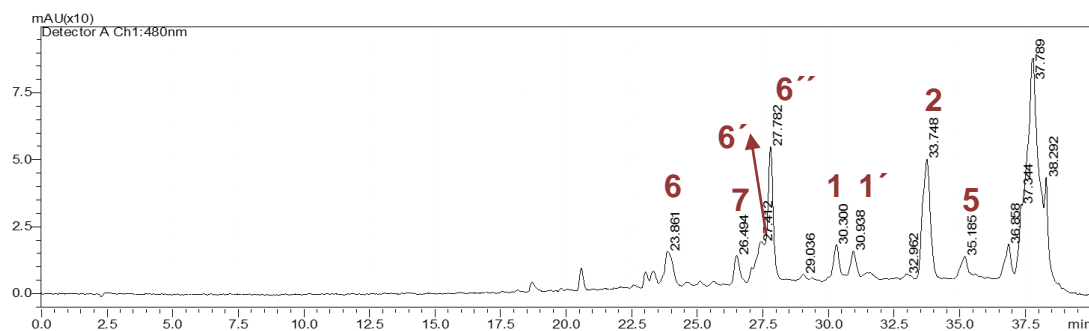
Los resultados obtenidos por HPLC-MS, para el análisis del extracto EPM muestran que el perfil cromatográfico (Figuras 45 y 46) es semejante al perfil obtenido por HPLC analítica (figura 41), con algunas diferencias como el incremento en los tiempos de retención, esto debido a las variación de las condiciones del análisis, como el sistema de solventes, tipo de columna y flujo. Por la sensibilidad de la técnica se observan además otros compuestos identificados como 6, 6', 6'' (masa molecular ($[M+H]^+$) 771.70) y 7 (masa molecular ($[M+H]^+$) 761.15), mientras que 3 y 4, no se tuvieron en cuenta por los altos tiempos de retención.

Figura 45. Perfil cromatográfico a 410 nm.



Fuente: Esta investigación.

Figura 46. Perfil cromatográfico a 480 nm.



Fuente: Esta investigación.

Los resultados obtenidos por HPLC-MS muestran que los compuestos presentes en la cáscara de pitaya amarilla, con máximos de absorción a longitudes de onda de 410 y 480nm, presentan un elevado peso molecular, como se indica en la tabla 6.

Tabla 6. Masas moleculares ($[M+H]^+$) de los compuestos identificados.

Compuesto	Tr (min)	m/z $[M+H]^+$
1	30.433	667.35
1'	31.033	667.30
2	31.538	647.30
3	—	—
4	—	—
5	35.267	649.30
6	23.916	771.70 (625.20; 463.15)
6'	27.500	771.35 (625.25; 463.15; 317)
6''	27.867	771.20 (625.25; 463.15; 389.20; 316.95)
7	26.533	761.15

Fuente: Esta investigación.

Los resultados permitieron descartar la presencia de ácido betalámico, con una masa molecular ($[M+H]^+$) de 212, que se creía pudiera estar presente en la cáscara por ser un compuesto de color amarillo que absorbe a 412nm¹⁸⁹. Se pensaba además que los pigmentos que le conferían el color amarillo a la cáscara de pitaya, eran betaxantinas, para las cuales se reportan valores de m/z ($[M+H]^+$) entre 300 y 400 aproximadamente, con absorbancias a una longitud de onda máxima que varía entre 460 y 480nm, como se indica en la tabla 7, sin embargo los compuestos 5 y 6'', que presentan una absorbancia apreciable a 480nm (figura 46) tienen una m/z de 649.30 y 771.20 respectivamente, mayores a las normalmente reportadas para las betaxantinas. Solo con los análisis de HPLC-MS no fue posible identificar la naturaleza química de los componentes separados por cromatografía líquida.

Tabla 7. Masa molecular ($[M+H]^+$) y λ_{max} de algunas betaxantinas reportadas.

Betaxantina	m/z $[M+H]^+$	λ_{max} (nm)	Referencia
Ácido Glutámico-bx	341	470	Nemzer, <i>et al</i> ¹⁹⁰ .
Lindicaxantina	309	483	Nemzer, <i>et al</i> .
Muscaaurin VII	349	472	Kugler, <i>et al</i> ¹⁹¹ .
Fenilalanina	359	467	Kugler, <i>et al</i> .
Portulacaxanthin II	375	471	Kugler, <i>et al</i> .
Vulgaxantina IV	325	470	Nemzer, <i>et al</i> .
Triptofano-bx	398	472	Nemzer, <i>et al</i> .
Valina -bx	311	472	Castellanos & Yahia ¹⁹² .
Metionina- bx	343	470	Kugler, <i>et al</i> .
Asparagina-bx	326	474	Castellanos & Yahia.
Serina-bx	299	468	Kugler, <i>et al</i> .

Para identificar químicamente el compuesto mayoritario (2) del extracto EPM, que tiene una masa molecular ($[M+H]^+$) de 647.30, fue necesario el uso de la técnica espectroscópica de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H), que permitió identificar algunas características estructurales de la molécula. Para este análisis fue necesario previamente aislar y purificar el compuesto mayoritario por cromatografía líquida (HPLC) en modo semipreparativo.

¹⁸⁹ HERBACH. Op. Cit., p. 53.

¹⁹⁰ NEMZER. Op. Cit., p. 53.

¹⁹¹ CASTELLANOS. Op. Cit., p. 31.

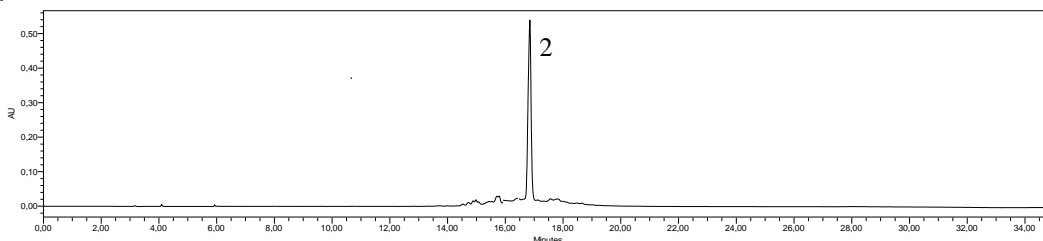
¹⁹² KUGLER, Florian, *et al*. Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. *En: Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*. Junio, **2007**, vol. 62, no. 5-6, p. 311-318.

5.1.6. Separación del compuesto mayoritario 2 por HPLC en modo semipreparativo.

Para purificar el componente mayoritario se usó cromatografía HPLC en modo semipreparativo, para esto se realizaron diferentes ensayos de separación en modo isocrático, se encontró que la condición más adecuada para este proceso fue un sistema de solventes en proporción de 70% de A (ácido fórmico 1%) y 30% de B (acetonitrilo/Agua 80/20), logrando separar el componente mayoritario 2, en un tiempo de 10.3 min. Al sólido obtenido se lo denominó FP.

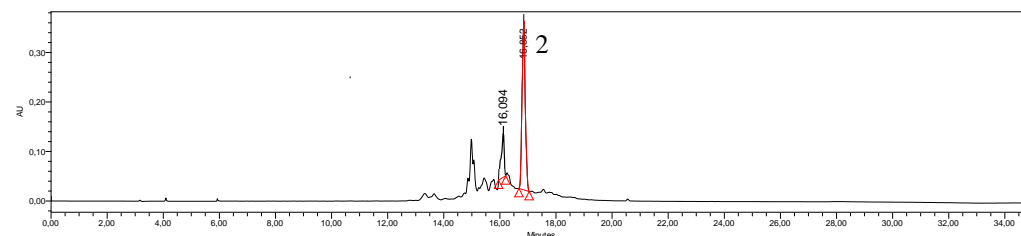
El sólido FP se examinó por HPLC analítico, para corroborar si el compuesto mayoritario 2 se encontraba puro. A 410nm solo se observó una señal correspondiente al compuesto 2 (figura 47), a diferencia del extracto EPM, donde se observaron 4 señales (figura 41). Al ser un extracto complejo donde no solo se encuentran los pigmentos color amarillo, sino además compuestos incoloros como los polifenoles con estructura aromática, que se pueden ver a 280nm, se examinó a dicha longitud de onda, por HPLC analítico, observándose 3 señales (Figura 48), con tiempos de retención similares. Por tanto el compuesto mayoritario no fue posible obtenerlo totalmente puro dado a la alta complejidad del perfil cromatográfico a 280 nm en el extracto EPM (figura 49), sin embargo el compuesto 2 tiene un mayor porcentaje de área, a 410 y 280nm, con una pureza significativa. El espectro de absorción UV-Vis on line del compuesto 2 se muestra en la figura 50.

Figura 47. Perfil cromatográfico del sólido FP con máximos de absorción a 410 nm por HPLC-analítico.



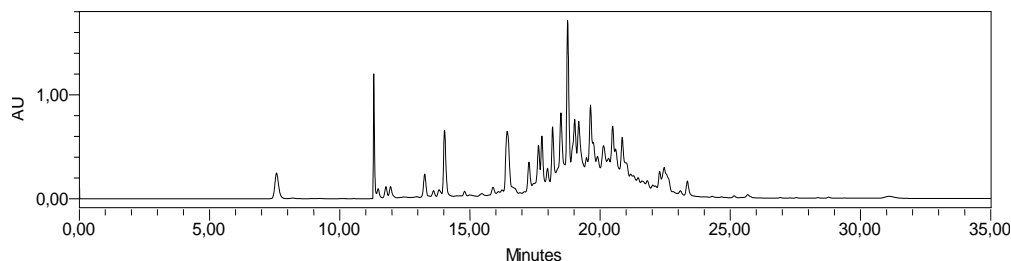
Fuente: Esta investigación.

Figura 48. Perfil cromatográfico del sólido FP con máximos de absorción a 280 nm.



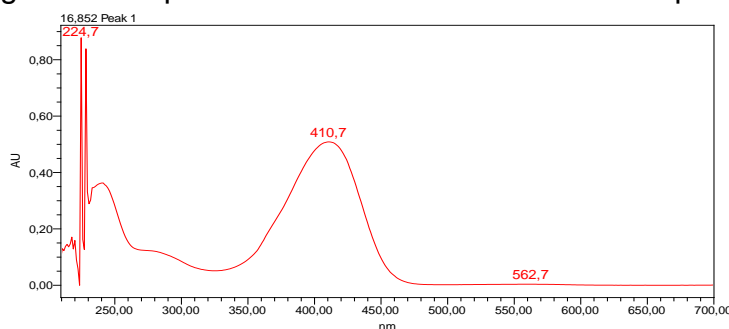
Fuente: Esta investigación.

Figura 49. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximos de absorción a 280 nm.



Fuente: Esta investigación.

Figura 50. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 2.



Fuente: Esta investigación.

5.1.7. Elucidación Estructural.

5.1.7.1. Compuesto 2.

En el espectro RMN-¹H del compuesto 2 (figura 51), se evidencia la presencia de un azúcar. Para los protones diferentes al anomérico, se observa señales en la región entre 3.3 - 4 ppm, hay una gran cantidad de superposición de estas señales, ya que la señal de los protones de los azúcares es compleja presentándose solapamiento entre ellas¹⁹³ como lo reportan Stintzing, *et al*¹⁹⁴; Wybraniec, *et al*¹⁹⁵; Kobayashi, *et al*¹⁹⁶ y Chauhan, *et al*¹⁹⁷, para los protones del 2' al 6' de la glucosa en betanina, filocactina e hilocerenina (tabla 8). El protón anomérico del azúcar (H-1'), presenta una señal que aparece a 5.26, a campos bajos ya que está unido a dos átomos de oxígeno, por lo que está más desapantallado que el resto de protones (normalmente aparece entre δ4.3 a 6.5ppm), la señal es un doblete, ya que el protón anomérico tiene un protón

¹⁹³ JACOBSEN, Neil. NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. Canada, John Wiley & Sons, **2007**, 12-17 p.

¹⁹⁴ STINTZING. Op. Cit., p. 26.

¹⁹⁵ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 26.

¹⁹⁶ KOBAYASHI. Op. Cit., p. 27.

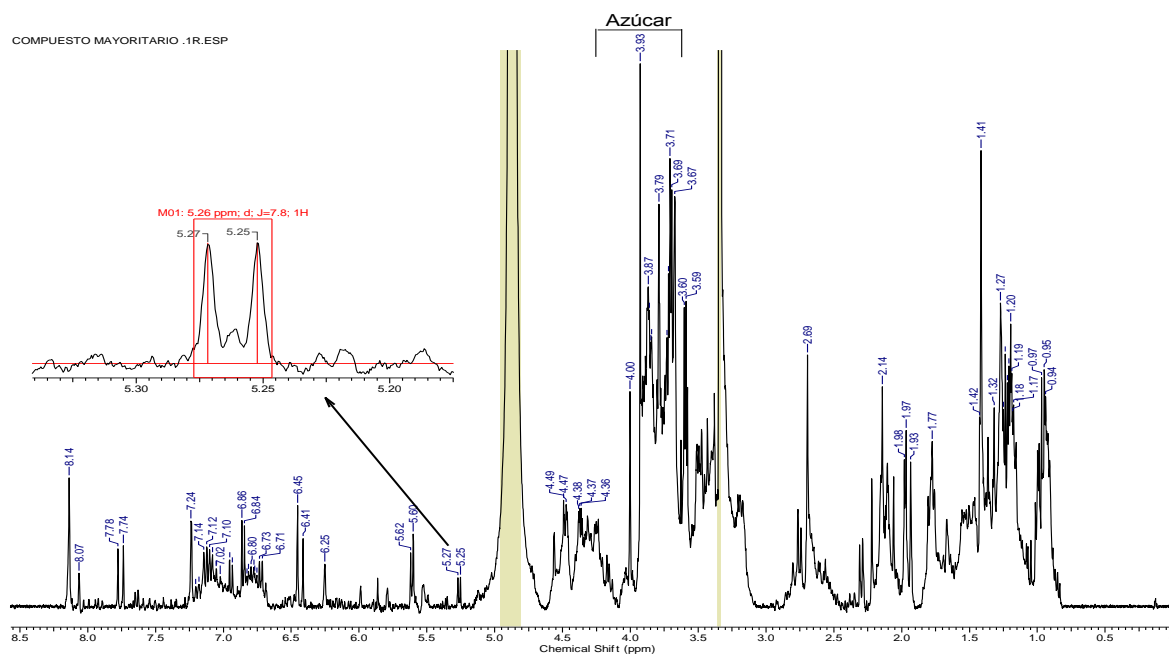
¹⁹⁷ CHAUHAN, sanjay, *et al*. Analysis of betalains from fruits of Opuntia species. *En: Phytochemistry Reviews*. Julio, **2012**, vol. 12, no. 1, p. 35-45.

vecino¹⁹⁸, con una constante de acoplamiento de 7.8Hz, valor característico de la configuración β de la glucosa (Figura 52)¹⁹⁹.

Con estos resultados se concluye que en la estructura del compuesto mayoritario existe una hexosa (glucosa) que por su peso molecular se trata de una betacianina glucosilada. Además, por su absorción en 410,7 nm (figura 50) puede tratarse de una neobetacianina deshidrogenada en la posición 2,3. Este tipo de compuestos normalmente muestran, comparados con una betacianina no deshidrogenada, un efecto hipsocrómico en sus máximos de absorción ya que se encuentran en un intervalo de 408-422 nm²⁰⁰, presentándose por su cambio estructural un cambio de color²⁰¹.

En vista de la complejidad del espectro, no se mencionan más señales. Para elucidar inequívocamente la estructura del compuesto 2, se requieren hacer análisis de RMN en 2D como COSY, HSQC, HMBC y TOCSY, análisis que no se realizaron en esta investigación, debido a que no se logró obtener la cantidad necesaria, además el compuesto mayoritario no estaba completamente puro.

Figura 51. Espectro RMN-¹H del compuesto mayoritario 2, del fruto de pitaya amarilla.



Fuente: Esta investigación.

¹⁹⁸ WEININGER, Stephen y STERMITZ, Frank. Química orgánica. España, Reverte, **1988**, 813-814 p.

¹⁹⁹ XU, Rensheng; YE, Yang y ZHAO, Weimin (Ed). Introduction to Natural Products Chemistry. Beijing, CRC Press, **2011**, 129 p.

²⁰⁰ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 39.

²⁰¹ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

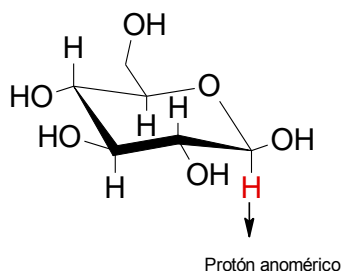
Tabla 8. Desplazamientos químicos de los protones de glucosa de betanina, filocactina e hilocerenina, reportados en la literatura.

Proton	RMN- ¹ H (δppm) (J (Hz))		
	Compuesto		
	Betanina	Filocactina	Hilocerenina
1'	5.00, d, (J=6.9)	5.01, d, (J=7.1)	5.03, d, (J=7.1)
2'	3.41–3.59 * 3.55 *	3.44–3.60 * 3.56 *	3.44–3.61 * 3.56 *
3'	3.41–3.59 * 3.55 *	3.44–3.60 * 3.57 *	3.44–3.61 * 3.56 *
4'	3.41–3.59 * 3.41 *	3.44–3.60 * 3.50, t,	3.44–3.61 * 3.47, pt, 9.51
5'	3.41–3.59 * 3.52 *	3.76, ddd, 3.76, ddd	3.74, ddd, 3.73, ddd,
6a'	3.86, dd,	4.45, dd,	4.45, dd,
6b'	4.49, dd, 3.70, dd	4.33dd, 3.71, dd,	4.24, dd, 4.33, dd

* Superposición

Fuente: STINTZING, Florian C., *et al.* Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *En: Food and Chemical*. Febrero, **2004**, vol. 65, no. 4, p. 415-422; WYBRANIEC, Sawomir, *et al.* Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. *En: Phytochemistry*. Diciembre, **2001**, vol. 58, no. 8, p. 1209-1212; KOBAYASHI, Naoko, *et al.* Betalains from Christmas cactus. *En: Phytochemistry*. Junio, **2000**, vol. 54, no. 4, p. 419-426. CHAUHAN, sanjay, *et al.* Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. *En: Phytochemistry Reviews*. Julio, **2012**, vol. 12, no. 1, p. 35-45.

Figura 52. Estructura de β-glucosa.



Fuente: MÜLLER-ESTERL, Werner. *Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. España, Reverte, **2008**, 19 p.

Para el compuesto 2, se registra en el espectro de masas, un m/z ([M+H]⁺) de 647,30 (figura 53), comparando con la literatura (tabla 3, apartado 3.3.5.7)²⁰², se propone que corresponda a la deshidrogenada descarboxilada–neohilocerenina (figura 54), con un λ_{max} de 410.7nm, similar al reportado que es de 411nm²⁰³, en el espectro UV-Vis (Figura 50) también se puede observar un máximo entre 270 y

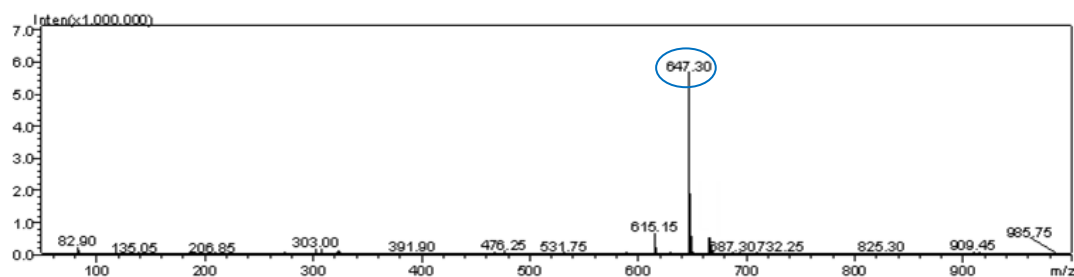
²⁰² WYBRANIEC. *Op. Cit.*, p. 39.

²⁰³ *Ibid.*, p. 39.

280nm, debido a la estructura ciclo-dopa. Mientras que entre 300 y 330nm no se distingue ningún máximo de absorción por la acilación en la molécula con el grupo 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG), que por ser un ácido alifático, no absorbe en esta región del espectro²⁰⁴. El compuesto tiene tiempos de retención altos, por la menor polaridad que las correspondientes betacianinas, como se muestra en los perfiles cromatográficos del extracto EPM a 410 nm, por HPLC-DAD en fase reversa (tabla 5) y por HPLC-MS, (tabla 6), con Tr de 20.623 y 31.538 min respectivamente. Además no se distinguió un segundo pico R-isómero por HPLC-MS, debido a que la molécula no tendría centros quirales en C-15 y C-2 a diferencia de las betacianinas²⁰⁵. También se confirma la presencia del grupo acilo HMG, por la señal que aparece como singlete a 1.41ppm, en el espectro RMN-¹H (Figura 51) correspondiente al grupo metilo, como lo reportan Stintzing, *et al*²⁰⁶; Wybraniec, *et al*²⁰⁷ y Chauhan, *et al*²⁰⁸

Para la molécula propuesta no se ha identificado la posición de descarboxilación, como lo publican Wybraniec y Mizrahi²⁰⁹. En la figura 54, se muestra la descarboxilación en la posición 2 o 17 que son las más comunes, sin embargo también podría darse en la posición 15.

Figura 53. Espectro de masas del compuesto 2.



Fuente: Esta investigación.

²⁰⁴ STINTZING. Op. Cit., p. 23.

²⁰⁵ STRACK. Op. Cit., p. 46.

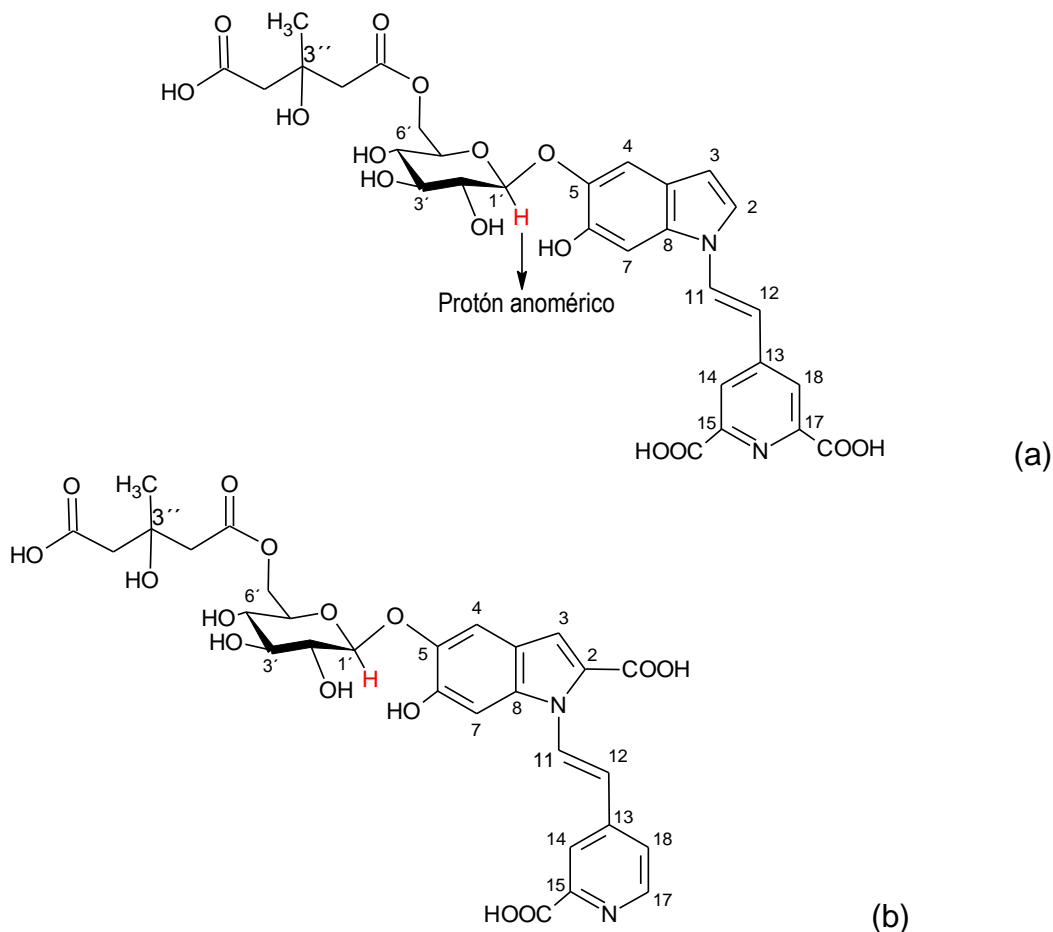
²⁰⁶ STINTZING. Op. Cit., p. 26.

²⁰⁷ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 26.

²⁰⁸ CHAUHAN. Op. Cit., p. 82.

²⁰⁹ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 39.

Figura 54. Estructura de deshidrogenada descarboxilada –neohilocerenina propuesta para el compuesto 2 (a) descarboxilada en la posición 2; (b) descarboxilada en la posición 17.



Fuente: Esta investigación.

5.1.7.2. Compuesto 5.

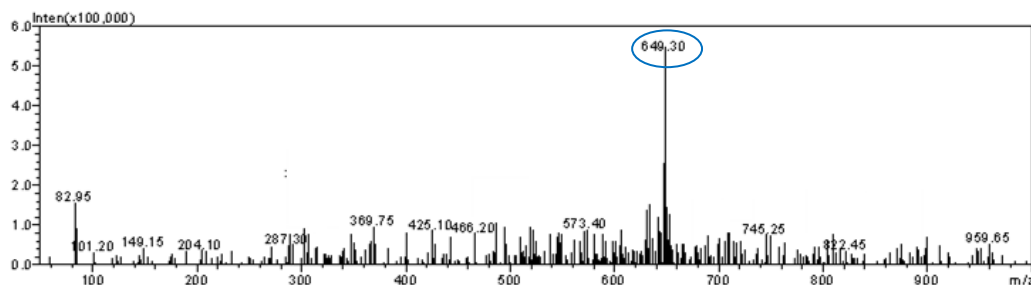
Para el compuesto 5, se registra en el espectro de masas, un m/z ($[M+H]^+$) de 649.30 (figura 55), comparando con la literatura (tabla 3, apartado 3.3.5.7)²¹⁰, se propone que corresponda al 2-decarboxi neohilocerenina (figura 56), con un λ_{max} de 476.2nm (figura 44), similar al reportado que es de 487nm²¹¹. Al igual que el compuesto 2, el compuesto 5 tiene un tiempo de retención alto. Además no se observa un segundo pico R-isómero, por la falta de un centro quiral en C-15 y C-2, en la molécula²¹².

²¹⁰ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 39.

²¹¹ Ibid., p. 39.

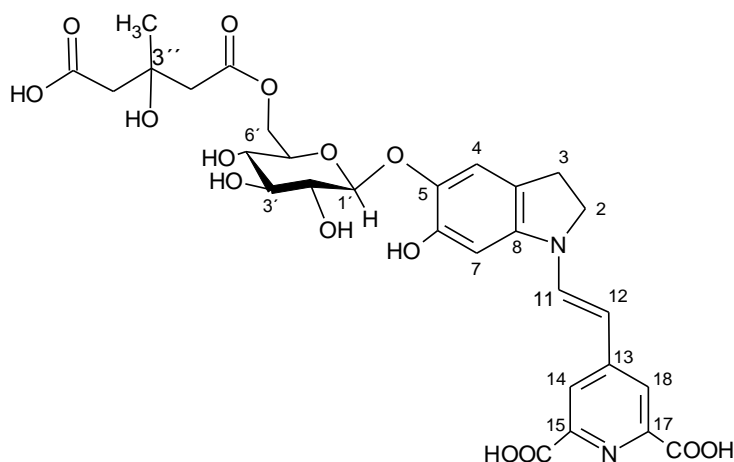
²¹² STRACK. Op. Cit., p. 46.

Figura 55. Espectro de masas del compuesto 5.



Fuente: Esta investigación.

Figura 56. Estructura de 2-decarboxi neohilocerenina propuesta para el compuesto 5.



Fuente: Esta investigación.

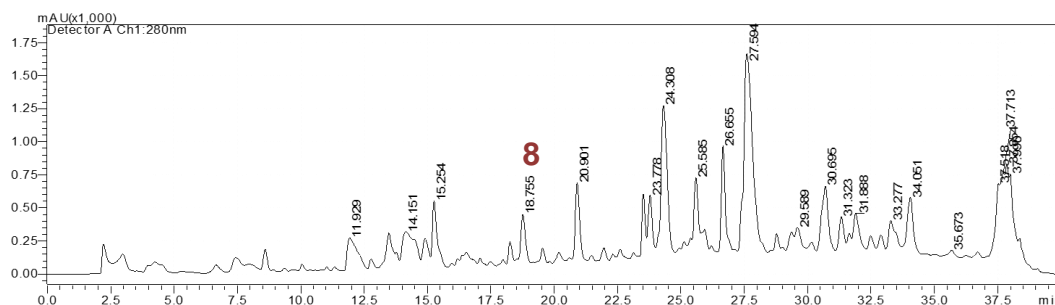
5.1.7.3. Compuesto 8.

Aprovechando la información que suministra la espectrometría de masas, se tomó el perfil a 280 nm del extracto purificado (figura 57), identificándose tentativamente el compuesto 8, como ciclodopa-5-O-(6'-O-3''-hidroxi-3'etilglutatil) β -glucósido (figura 59), con una masa molecular ($[M+H]^+$) de 502.4 (Figura 58), y un fragmento con m/z de 358.15, originado posiblemente por la pérdida de ciclodopa 5-O- β -glucósido ($[M-C_{15}H_{19}NO_9]^+$). El compuesto 8 tiene un tiempo de retención de 18.775 min, menor que las correspondientes neobetacianinas como lo reporta Herbach, Stintzing y Carle²¹³. El análisis por UV-Vis muestra una longitud de onda de máxima absorbancia a 273.2nm (figura 60), debido a la estructura ciclo-dopa, similar al reportado que es de 283nm. Al igual que el compuesto 2, entre 300 y 330nm no se observa ningún máximo de absorción ya que la molécula propuesta estaría acilada con el grupo 3-hidroxi-3-etilglutaril (HMG) que es un derivado de

²¹³ HERBACH. Op. Cit., p. 29.

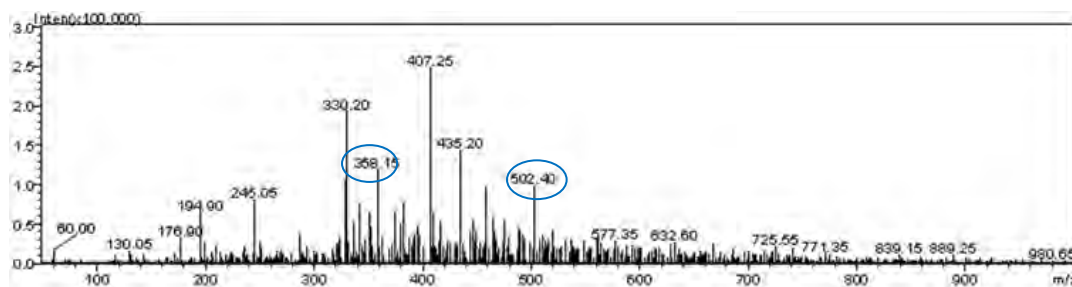
ácido alifático²¹⁴. Este compuesto podría ser un precursor de las betalainas. Las demás señales del perfil cromatográfico del extracto EPM a 280 nm, no tenían una identificación clara en la literatura científica por tanto no se pudieron asignar.

Figura 57. Perfil cromatográfico del extracto EPM con máximo de absorción a 280 nm.



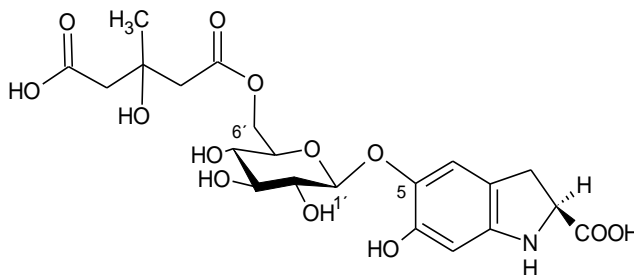
Fuente: Esta investigación.

Figura 58. Espectro de masas del compuesto 8.



Fuente: Esta investigación.

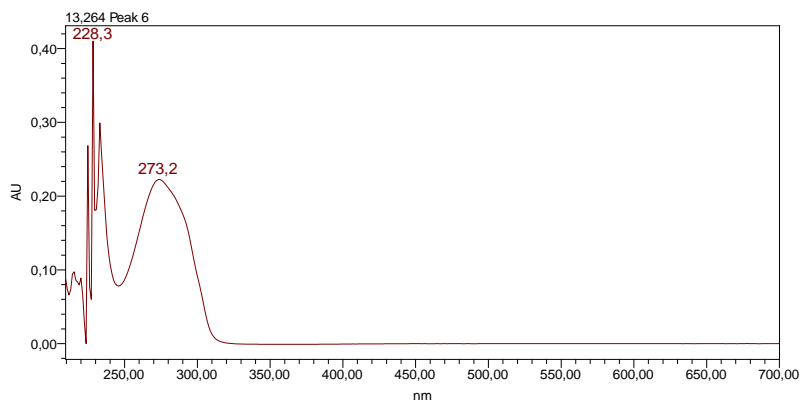
Figura 59. Estructura de ciclodopa-5-O-(6'-O-3''-hidroxi-3' metilglutatil) β-glucósido propuesta para el compuesto 8.



Fuente: Esta investigación.

²¹⁴ STINTZING. Op. Cit., p. 23.

Figura 60. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 8.



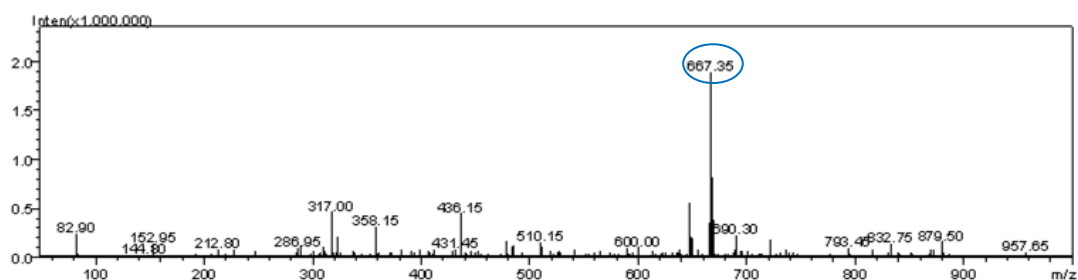
Fuente: Esta investigación.

Los tres compuestos encontrados serian de la misma familia, glucósidos y acilados con el grupo 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG).

5.1.7.4. Compuestos no identificados.

Para los demás compuestos no fue posible sugerir una estructura, ya que la señal de los iones moleculares, no coincide con los iones moleculares publicados en la literatura, sin embargo se encontró que hay compuestos isoméricos como: 1/1' (m/z 667.30) (figura 61-62) y 6/6'/6'' (m/z 771.30) (figura 63-65). Wybraniec, *et al*¹⁵, reportan en la fruta de cactus (*Hylocereus polyrhizus*), tres compuestos con masa molecular ([M+H]⁺) de 667, como presumibles betacianinas isoméricas que aún no han sido identificadas.

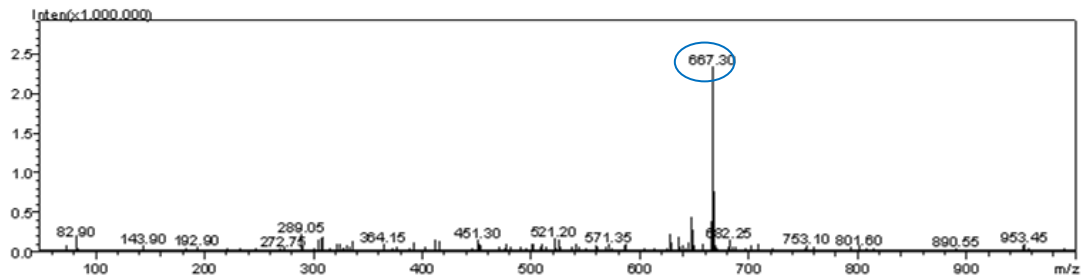
Figura 61. Espectro de masas del compuesto 1 con Tr de 30.433 min.



Fuente: Esta investigación.

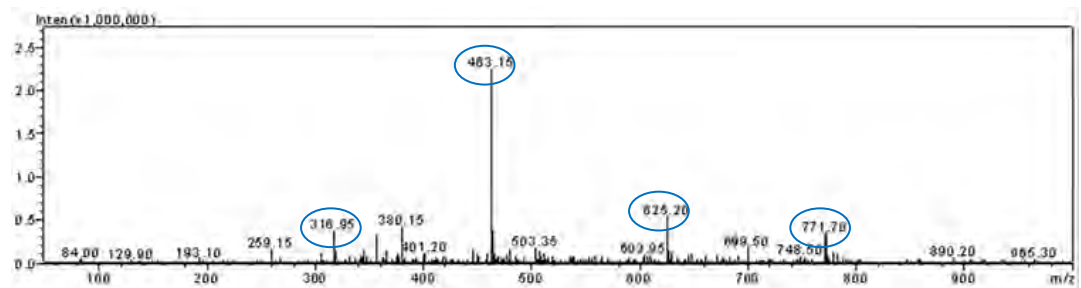
²¹⁵ WYBRANIEC. Op. Cit., p. 26.

Figura 62. Espectro de masas del compuesto 1' con Tr de 31.067min.



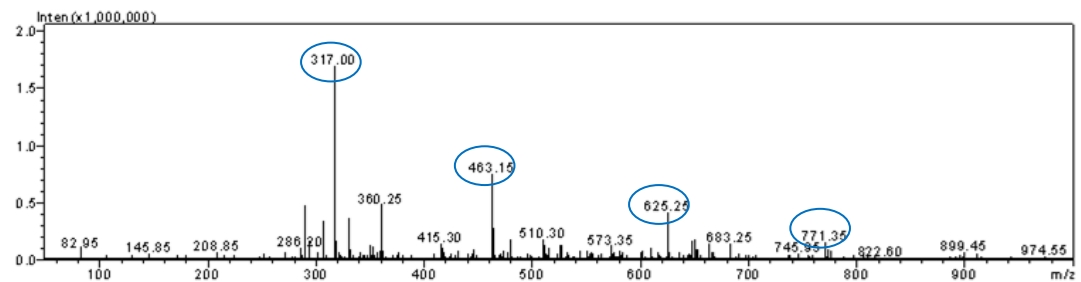
Fuente: Esta investigación.

Figura 63. Espectro de masas del compuesto 6 con Tr de 24min.



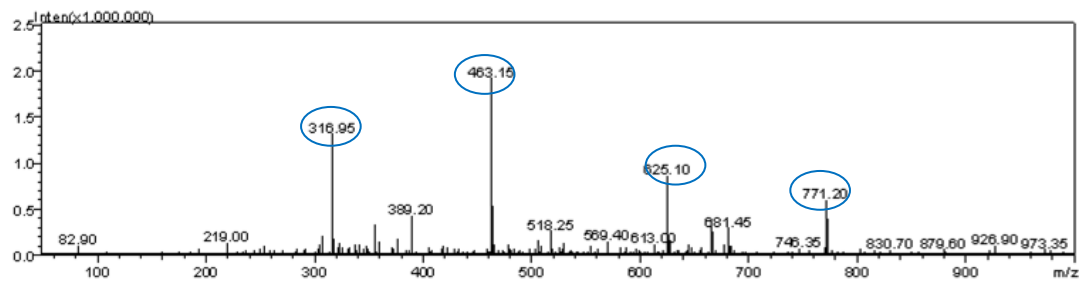
Fuente: Esta investigación.

Figura 64. Espectro de masas del compuesto 6' con Tr de 27.5min.



Fuente: Esta investigación.

Figura 65. Espectro de masas del compuesto 6'' con Tr de 27.867 min.



Fuente: Esta investigación.

En la tabla 9 se muestra de manera resumida las características de los compuestos encontrados en la cáscara de pitaya amarilla.

Tabla 9. Características de compuestos encontrados en la cáscara de pitaya amarilla.

Compuesto	Tr (min) ^a	λ_{max} (nm)	MS [M+H] ⁺	Betalaína
1	30.433	411.9	667.35	-----
1'	31.033	-----	667.30	-----
2	31.538	410.7	647.30	Deshidrogenada descarboxilada-neohilocerenina
3	-----	409.5	-----	-----
4	-----	422.8	-----	-----
5	35.267	476.2	649.30	2-Decarboxi neohilocerenina
6	23.916	-----	771.70(625.20 ; 463.15)	-----
6'	27.500	-----	771.35(625.25 ; 463.15; 317)	-----
6''	27.867	-----	771.20(625.25 ; 463.15; 389.2; 316.95)	-----
7	26.533	-----	761.15	-----
8	18.775	273.2	502.40 (358.15)	Ciclodopa-5-O-(6'-O-3''-hidroxi- 3' metilglutatil) β -glucósido

^a tiempos de retención por HPLC-MS

Fuente: Esta investigación.

5.1.8. Fenoles totales.

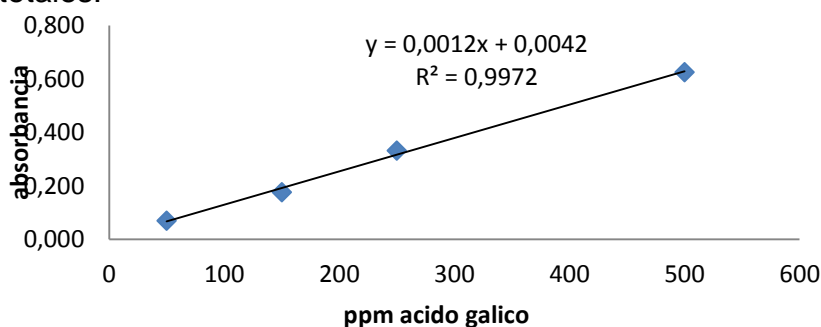
Para determinar el contenido de fenoles totales (FT) de las muestras ECM y EPM, mediante la prueba de Folin Ciocalteu, se realizó una curva de calibración (gráfica 65), a partir del promedio de los datos obtenidos de tres replicas, empleando como patrón ácido gálico, la ecuación de la recta resultante fue $y = 0,0012x + 0,0042$, con un coeficiente de correlación cercano a 1 ($R^2 = 0,9972$), que indica la buena linealidad de la gráfica. La intensidad del color azul observada para cada patrón es función de la cantidad de fenoles encontrados en cada una de ellas. Las concentraciones y absorbancias obtenidas se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la prueba de Folin Ciocalteu con patrones de ácido gálico.

Concentración Ácido Gálico ^a	Abs ^b 1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio
50	0,068	0,069	0,072	0,070 ±0,0021
150	0,175	0,178	0,176	0,176 ±0,0015
250	0,328	0,336	0,331	0,332±0,0040
500	0,624	0,631	0,619	0,625±0,0060

^a ppm; ^b absorbancia
Fuente: Esta investigación.

Figura 66. Curva calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales.



Fuente: Esta investigación.

El contenido fenólico para los extractos crudo (ECM) y purificado (EPM) se indica en la tabla 11, evidenciándose un mayor contenido fenólico para EPM con 136,570±1.107 mg de ácido gálico /g extracto, que para ECM con 12,957±0.220 mg de ácido gálico /g extracto, equivalente a un incremento aproximadamente de 10 veces en cantidad de grupos fenólicos, con una diferencia estadísticamente significativa entre las dos muestras (P<0.05). Estos resultados indican la eficiencia de retención de los componentes fenólicos (incluidas las betalainas totales), sobre la columna empacada con resina XAD-7.

Tabla 11. Contenido de fenoles totales de los extractos ECM y EPM.

Muestra	Replica	Fenoles totales		
ECM	1	12,874 ^a	16,692 ^b	4,154 ^c
	2	13,207	17,124	4,261
	3	12,791	16,585	4,127
	Promedio	12,957±0.220	16,800±0.0007	4,181±0.07
EPM	1	135,362 ^a	18,538 ^b	4,613 ^c
	2	137,536	18,836	4,688
	3	136,812	18,737	4,663
	Promedio	136,570±1.107	18,704±0.0002	4,655±0.02

^a mg ácido gálico /g extracto; ^b mg ácido gálico /100 g cáscara; ^c mg ácido gálico/100g fruto fresco.
Fuente: Esta investigación.

La cantidad de fenoles totales analizados en la cáscara es significativo con respecto a los extractos presentados en la tabla 12, bajo las mismas condiciones metodológicas, lo que le da un valor agregado a este tipo de material de desecho, sin embargo se debe recalcar que estos datos corresponden a fenoles totales en 100 g de fruto, que son las unidades reportadas en la literatura. Al comparar la cantidad de fenoles en 100 g de fruto, se observa que ECM y EPM tienen un contenido bajo, con valores de $4,181 \pm 0.07$ y $4,655 \pm 0.02$ mg ácido gálico/100g fruto (tabla 11), menor que otros frutos como: la Fruta del dragón *Hylocereus polyrhizus* (15.92 ± 1.28 mg/100fruto), Pitaya roja (pulpa blanca), *H. undatus* (17.25 ± 1.08), *Opuntia ficus-indica* (218.8 ± 2.9), entre otros, como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Cantidad de fenoles totales en algunas frutas de la familia de las cactáceas.

Fruta	Fenoles totales ^a	Referencia
Fruta del dragón <i>H. polyrhizus</i>	15.92 ± 1.28	Wee & Wee ²¹⁶ .
Fruta del dragón <i>H. undatus</i>	20.14 ± 1.25	Wee & Wee.
Pitaya (pulpa blanca) <i>Hylocereus undatus</i>	17.25 ± 1.08	Chen, <i>et al</i> ²¹⁷ .
<i>Pfeiffera ianthothele</i>	6.5 ± 1.5	Zampini, <i>et al</i> ²¹⁸ .
<i>Rhipsalis floccosa</i>	18.3 ± 3.0	Zampini, <i>et al</i> .
<i>Lepismium lumbricoides</i>	23.8 ± 5.0	Zampini, <i>et al</i> .
<i>Opuntia ficus-indica</i>	218.8 ± 2.9	Fernández, <i>et al</i> ²¹⁹ .
<i>Opuntia stricta</i>	204.4 ± 4.2	Fernández, <i>et al</i> .
<i>Opuntia undulata</i>	164.6 ± 3.3	Fernández, <i>et al</i> .

^amg ácido gálico/100 fruta fresca

5.1.9. Determinación de la actividad antioxidante *in-vitro* por el método ABTS.

Para determinar la actividad antioxidante de las muestras ECM y EPM, por el método TEAC, se realizó una curva de calibración (figura 67), a partir del promedio de los datos obtenidos de tres replicas, empleando como patrón ácido ascórbico, la ecuación de la recta resultante fue $y = -0,3277x + 0,9153$, con un coeficiente de correlación cercano a 1 ($R^2 = 0,9988$), que indica la buena linealidad de la gráfica. La pendiente negativa indica la decoloración que sufre el catión radical ABTS al

²¹⁶ WEE, Sim Choo y WEE, Khing Yong. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. *En: Adv. Appl. Sci. Res.* **2011**, vol. 2, no. 3, p. 418-425.

²¹⁷ CHEN, Guan-Lin, *et al*. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. *En: Industrial Crops and Products.* Junio, **2014**, vol. 57, p. 150–157.

²¹⁸ ZAMPINI, Iris C., *et al*. Nutraceutical properties and toxicity studies of fruits from four Cactaceae species grown in Argentine Northwestern. *En: Food Research International.* Agosto, **2011**, vol. 44, no. 7, p. 2345-2351.

²¹⁹ FERNÁNDEZ LÓPEZ, José, *et al*. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *En: Plant Foods for Human Nutrition.* Septiembre, **2010**, vol. 65, no. 3, p. 253-259.

reaccionar con el antioxidante. Las concentraciones y absorbancias obtenidas se muestran en la tabla 13.

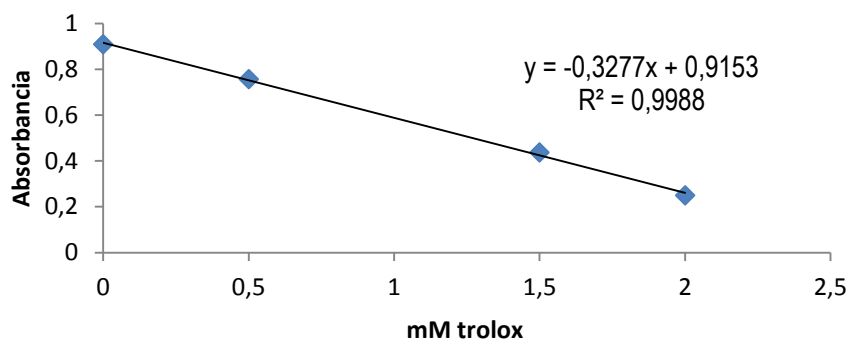
Tabla 13. Decoloración del catión radical ABTS con patrones de trolox.

mM trolox	Abs ^a .1	Abs. 2	Abs. 3	Promedio
0	0,909	0,908	0,909	0,909 ±0,0005
0.5	0,772	0,751	0,746	0,756 ±0,0113
1.5	0,446	0,428	0,434	0,436±0,0075
2	0,240	0,257	0,252	0,250±0,0071

^a absorbancia

Fuente: Esta investigación.

Figura 67. Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante por el método TEAC.



Fuente: Esta investigación.

La funcionalidad del método se comprobó utilizando un patrón de ácido ascórbico de concentración 1.0056 mM, el valor de la capacidad antioxidante TEAC obtenido fue de $0,970 \pm 0,009$, similar al reportado por Re, et al²²⁰ de $1,05 \pm 0,02$, indicando la buena funcionalidad del método. En la tabla 14 se presenta los resultados de actividad antioxidante para el ácido ascórbico, extracto crudo (ECM) y purificado (EPM).

²²⁰ RE. Op. Cit., p. 71.

Tabla 14. Resultados de TEAC para los de los extractos estudiados y el patrón ácido ascórbico.

Muestra	Replica	TEAC		
ECM	1	123,620 ^a	127,221 ^b	0,317 ^c
	2	124,822	124,813	0,311
	3	127,211	126,420	0,315
	Promedio	125,211±1.83	126,151±1.23	0,314±0.003
EPM	1	928,972 ^a	160,280 ^b	0,399 ^c
	2	911,361	161,830	0,403
	3	923,104	164,934	0,410
	Promedio	921,142±8.96	162,351±2,37	0,404±0.006
Ácido ascórbico	1		0,978 ^a	
	2		0,972	
	3		0,960	
	Promedio		0,970±0,009	

^a μmol trolox /g extracto; ^b μmol trolox /100g cáscara; ^c μmol trolox/g fruto fresco.

Fuente: Esta investigación.

Los resultados muestran que el extracto purificado tiene mayor capacidad para capturar radicales ABTS (7 veces más que el extracto crudo) (tabla 14), lo cual es de esperarse ya que EPM después de haber sido sometido a un proceso de purificación, presenta un mayor contenido de betalainas y fenoles totales (FT). El valor TEAC para EPM y ECM fue de 921,14±8.96 y 125,21±1.83 μmol trolox/g muestra respectivamente, con una diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

La capacidad para capturar radicales ABTS analizada en la cáscara es significativa con respecto a los extractos presentados en la tabla 15, sin embargo se debe recalcar que estos datos corresponden a la actividad antioxidante en g de fruto, que son las unidades reportadas en la literatura. Al comparar la actividad antioxidante en g de fruto, se observa que ECM y EPM tienen una baja capacidad para capturar radicales ABTS, con valores de TEAC de 0,314±0.003 y 0,404±0.006 μmol trolox/g fruto fresco (tabla 14), menores que Pitaya (pulpa blanca) *Hylocereus undatus* (1.57 ± 0.01 μmol trolox/g fruto fresco), *Opuntia ficus-indica* (6.70±0.73), entre otros frutos (tabla 15).

Bajo las mismas condiciones metodológicas, se observa que ECM y EPM tienen una baja actividad antioxidante

Tabla 15. Actividad antioxidante (TEAC) de algunas frutas de la familia de las cactáceas.

Fruta	TEAC ^a	Referencia
Pitaya (pulpa blanca) <i>H. undatus</i>	1.57 ± 0.01	Chen, <i>et al</i> ²²¹ .
<i>Opuntia ficus-indica</i>	6.70±0.73	Fernández, <i>et al</i> ²²² .
<i>Opuntia stricta</i>	5.98±0.24	Fernández, <i>et al</i> .
<i>Opuntia undulata</i>	1.58±0.41	Fernández, <i>et al</i> .
Uva (red) (<i>Vitis vinifera</i> Linn.)	0.86 ± 0.02	Chen, <i>et al</i> .
Ciruela (verde) <i>Prunus salicina</i> Lindl	10.93 ± 0.02	Chen, <i>et al</i> .

^a μmol Trolox/g fruto fresco

El contenido fenólico total (incluidas las betalainas) guarda concordancia con la actividad antioxidante.

5.1.10. Estabilidad.

Se evaluó la estabilidad del extracto crudo (ECM) y purificado (EPM) de la cáscara de pitaya amarilla, frente a factores como: pH a 3, 5 y 7; presencia y ausencia de luz (PL; con luz, AL; sin luz); temperatura ambiente y en presencia de aire, durante un periodo de almacenamiento de 60 días.

Se graficó el logaritmo de la relación de absorbancias A_t/A_o , en función del tiempo para las diferentes condiciones de almacenamiento. (Figura 68). Dónde: (A_t/A_o) es igual a la relación de absorbancias medidas a λ_{max} de 410nm; A_o es la absorbancia inicial de la solución (cerca a 1) y A_t es la absorbancia medida después de un tiempo de reacción. Cada tratamiento se realizó por triplicado. 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 lo encontró con la siguiente ecuación:

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

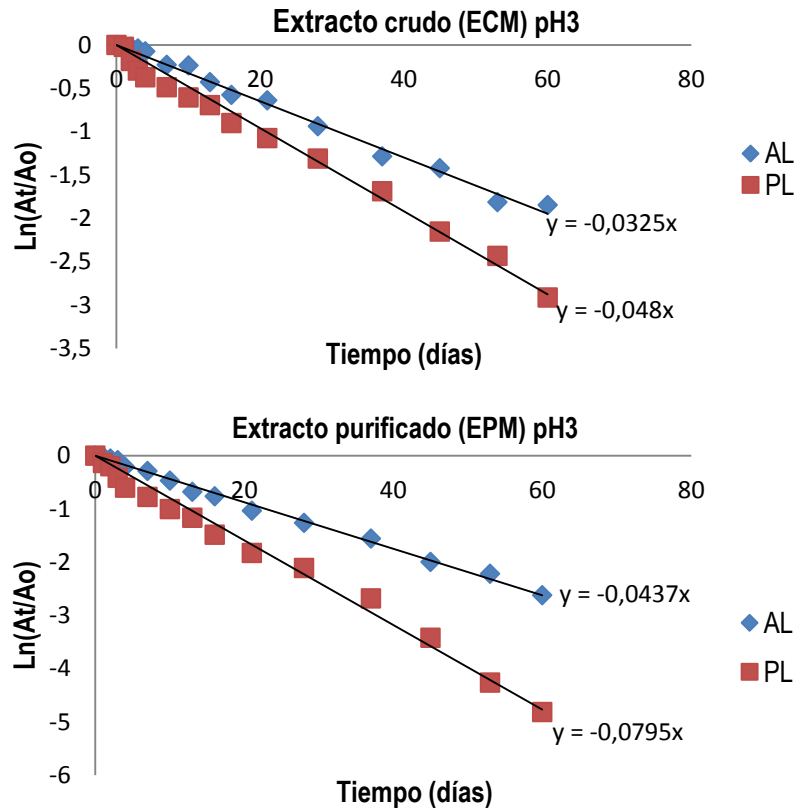
Donde $t_{1/2}$ = tiempo de vida media (días); k = constante de velocidad de reacción
En la figura 68 y tabla 16 se observa el comportamiento cinético de los extractos ECM y EPM, sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento.

²²¹ CHEN. Op. Cit., p. 93.

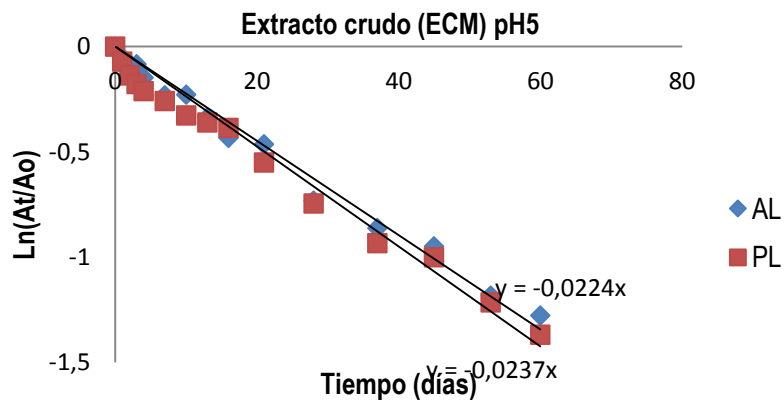
²²² FERNÁNDEZ. Op. Cit., p. 93.

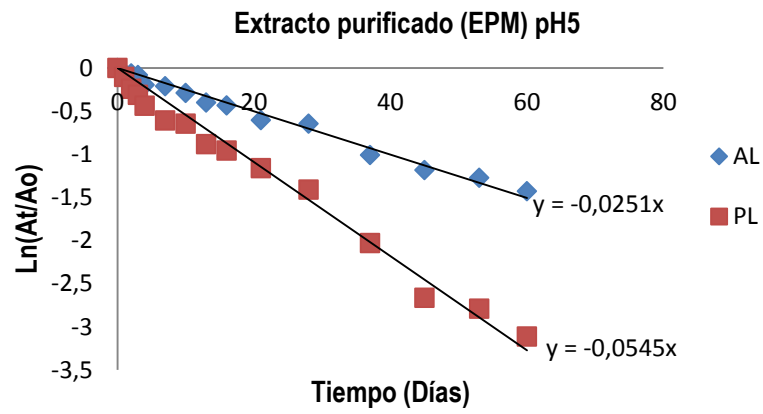
Figura 68. Comportamiento cinético del proceso de degradación de ECM y EPM, a pH 3, 5 y 7, en presencia y ausencia de luz (PL; AL).

a) Almacenamiento a pH 3

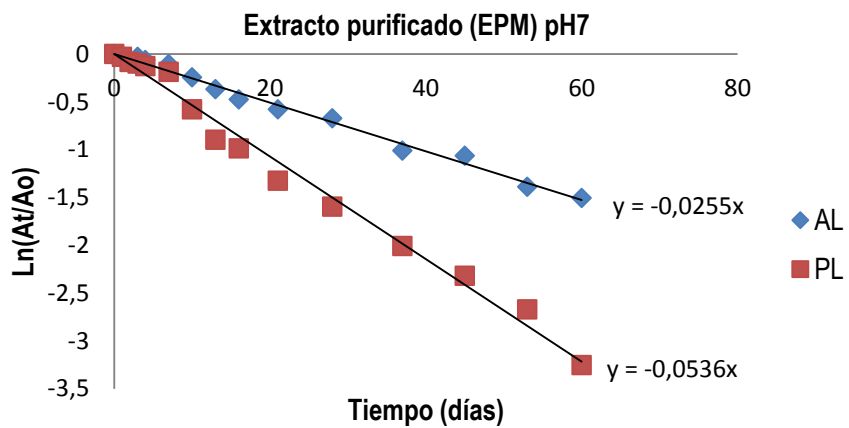
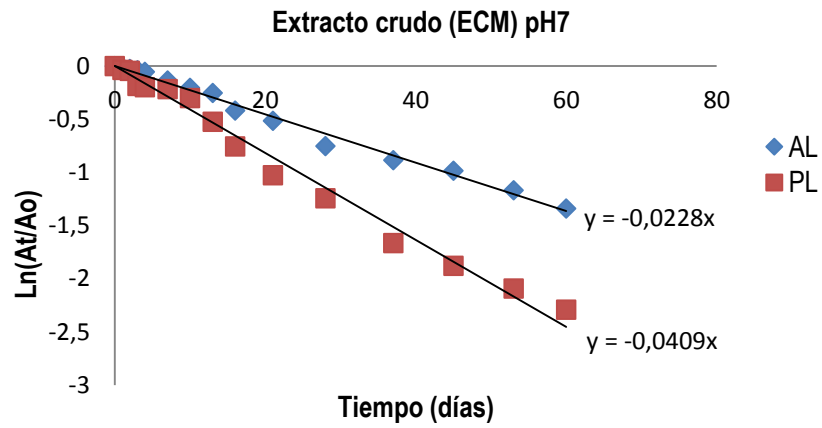


b) Almacenamiento a pH 5





c) Almacenamiento a pH 7



Fuente: Esta investigación.

Tabla 16. parámetros cinéticos de degradación de betalaínas para los extractos ECM y EPM en diferentes condiciones de almacenamiento.

pH	Extracto	Condición	K(10 ⁻³ Días ⁻¹)	t _{1/2} (Días)
3	ECM	PL	48,100±0,265	14,411±0,079
		AL	32,352±0,252	21,427±0,166
	EPM	PL	79,500±0,306	8,719± 0,034
		AL	43,850±0,153	15,807± 0,055
5	ECM	PL	23,850±0,300	29,064±0,370
		AL	22,500±0,306	30,807± 0,426
	EPM	PL	53,700±0,208	12,908±0,050
		AL	25,200±0,200	27,506±0,220
7	ECM	PL	41,000±0,200	16,906±0,083
		AL	22,700±0,115	30,536±0,155
	EPM	PL	55,050±1,422	12,597±0,327
		AL	25,550± 0,173	27,130±0,184

Fuente: Esta investigación.

En el análisis de varianza se halló que ambos factores, pH y luz, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la constante de velocidad (*K*) (*P* <0,05), con un 95.0% de nivel de confianza.

Entre los valores medios de los tratamientos en presencia y ausencia de luz se encontró diferencias estadísticamente significativas (*P* <0,05), siendo más estable los extractos ECM (Anexo A y B) y EPM (Anexo E y F), almacenados en ausencia de luz (AL) (con valores de *K* menores), lo que está en concordancia con lo reportado por Herbarch, *et al*²²³ para este tipo de pigmentos betalaínicos. La susceptibilidad a la degradación se explica por la absorción de la luz en el rango UV y el visible, que conduce a la excitación de los electrones del cromóforo de betalaína a un estado con más energía, por lo que causa mayor reactividad o baja energía de activación de la molécula. Además se debe tener en cuenta que los ensayos se realizaron en presencia de aire, Attoe y Von Elbe (1981)²²⁴ publicaron que para que la luz tenga un efecto significativo, es necesaria la presencia de oxígeno²²⁵.

Respecto al pH, para el extracto crudo (ECM) se encontró diferencias estadísticamente significativas (*P* <0,05), siendo el más estable a pH 5, con un valor de *K* menor (Anexo A y C), mientras que el extracto purificado (EPM), fue más estable a pH 5 y 7, sin diferencias significativas entre ellos (Anexo E y G), a pH 3 los extractos presentaron una baja estabilidad. Por tanto este tipo de pigmentos serian ideales para su uso como colorantes en productos alimenticios

²²³ HERBARCH . Op. Cit., p. 29.

²²⁴ ATTOE. Op. Cit., p. 53.

²²⁵ AZEREDO. Op. Cit., p. 23.

de acidez baja y neutra. Los resultados concuerdan con el estudio realizado en la Universidad de Sevilla, en colaboración con el grupo de investigación GIPIB, al extracto crudo de la cáscara de pitaya amarilla, reportando que esta fruta es adecuada para su uso como colorante para alimentos en un rango de pH de 4-6²²⁶. Además Castellar *et al*²²⁷, Harivaindaran *et al*²²⁸, Tsai *et al*²²⁹ entre otros autores, reportan una mayor estabilidad de las betalaínas a pH 5.

Tras evaluar la significancia de las interacciones entre los factores pH y luz, se encontró que para el extracto ECM (Anexo D) hay una diferencia significativa para los tres valores de pH en presencia y ausencia de luz, siendo el más estable a pH 5 con AL, y el menos estable a pH 3 con PL. Lo mismo se encontró para el extracto EPM (Anexo H), sin embargo entre los extractos, bajo las diferentes condiciones de almacenamiento, el extracto crudo de pitaya amarilla, presenta mayor estabilidad que el extracto purificado. Lo que sigue es que en el ECM, pigmentos diferentes a las betalaínas, ayudan a estabilizar este tipo de pigmentos, disminuyendo la velocidad de degradación.

Con el propósito de observar más claramente el comportamiento de los diferentes extractos, se graficó la variación del tiempo de vida media (inversamente proporcional a los valores de *K*) de los extractos ECM y EPM con respecto a las diferentes condiciones de almacenamiento (figura 69).

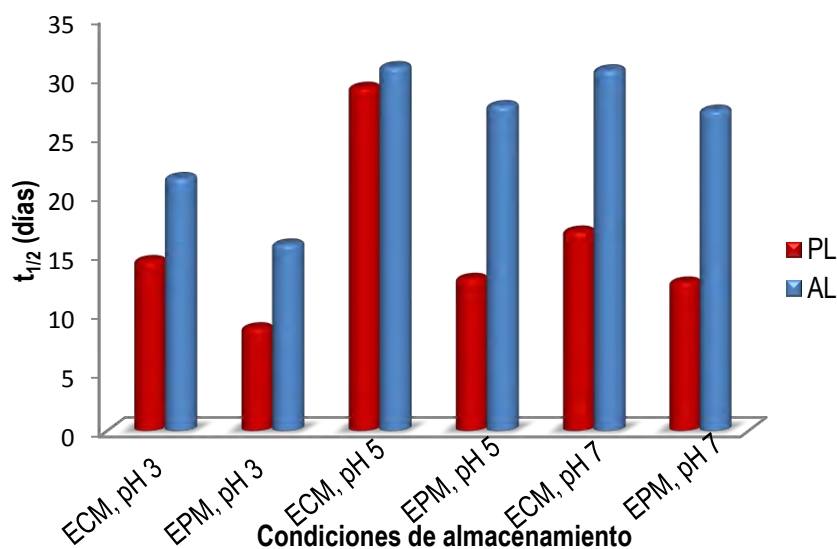
²²⁶ CEJUDO. Op. Cit., p. 30.

²²⁷ CASTELLAR, Rosario, *et al.* Color Properties and Stability of Betacyanins from Opuntia Fruits. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marzo, **2003**, vol. 51, no. 9, p. 2772-2776.

²²⁸ HARIVAINDARAN, K.V; REBECCA, Ow Phui y CHANDRAN, Chandran. Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. En: *Pakistan Journal of Biological Sciences*. Septiembre, **2008**, vol. 11, no. 18, p. 2259-2263.

²²⁹ TSAI, Pi-Jen, *et al.* Thermal and pH Stability of Betacyanin Pigment of Djulis (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and Their Relation to Antioxidant Activity. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Enero, **2010**, vol. 58, no. 2, p. 1020-1025.

Figura 69. Variación de los tiempos de vida media para los extractos ECM y EPM, respecto a las diferentes condiciones de almacenamiento.



Fuente: Esta investigación.

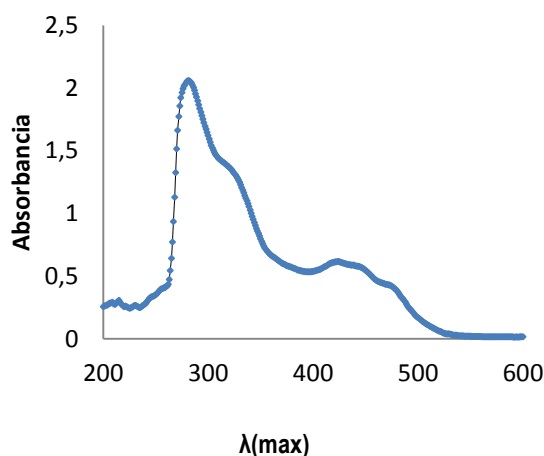
5.2. PIGMENTOS TIPO CAROTENOIDE

En la investigación se encontró que en la cáscara de pitaya amarilla, también están presentes pigmentos tipo carotenoide, con una polaridad menor a la de las betalaínas, sin embargo solubles en solventes medianamente polares como la acetona, por lo que se deduce que corresponden al grupo de las xantófilas que son carotenoides oxigenados²³⁰.

Mediante un proceso de extracción sólido-líquido con acetato de etilo, se obtuvo alrededor de 0,0108 % (respecto a la cáscara) de extracto crudo (ECA). El espectro UV-Vis se muestra en la figura 70. El extracto ECA se purificó mediante una columna cromatográfica, empacada con XAD-7, para separar los compuestos tipo betalaína que también extrajo el solvente, de los compuestos tipo xantófila, el porcentaje de la fracción menos polar, EPA, fue de 0,003 % respecto a la cáscara.

²³⁰ PRIMO. Op. Cit., p. 60.

Figura 70. Espectro UV-Vis del extracto crudo ECA.



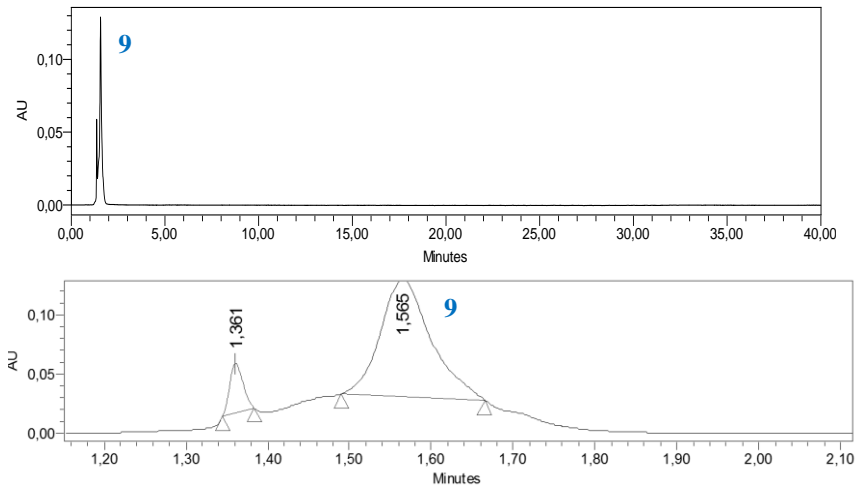
Fuente: Esta investigación.

Para el análisis de la fracción EPA, por HPLC-DAD, se usó una columna C-18, Spherisorb ODS2. Al igual que la columna Xterra usada para la separación de los pigmentos tipo betalaína, tiene cadenas alifáticas de octadecil-silano unidas a la sílice, sin embargo, esta está clasificada como más polar, por sustituciones diferentes en el grupo silanol²³¹. Por tanto se usó este tipo de columna, ya que las xantofilas al ser más apolares que las betalaínas, en una columna Xterra se adsorberían con mayor fuerza, eluyendo a tiempos de retención muy altos. El análisis se hizo a una longitud de onda de 480nm, observándose 2 señales. El compuesto 9 con un porcentaje de área del 89.69%, eluyó a un tiempo de retención de 1,565 min, (figura 71), cuyo espectro UV-Vis en línea se muestra en la figura 72, en el cual se puede observar los tres máximos característicos de los carotenoides. Por tanto se confirma que en la cáscara de pitaya amarilla se encuentra presente un compuesto tipo xantófila, con longitudes de onda máximas de 416.8, 445.8, 475 nm. En otros frutos de la familias de la cactáceas, también se han encontrado pigmentos tipo carotenoide como en la fruta cactus pear (*Opuntia ficus-indica*)²³².

²³¹ Fuente: [Citado el 14 de Noviembre de 2015] < file:///D:/Datos/Downloads/036-ColumnComparisonGuide%20(1).pdf >

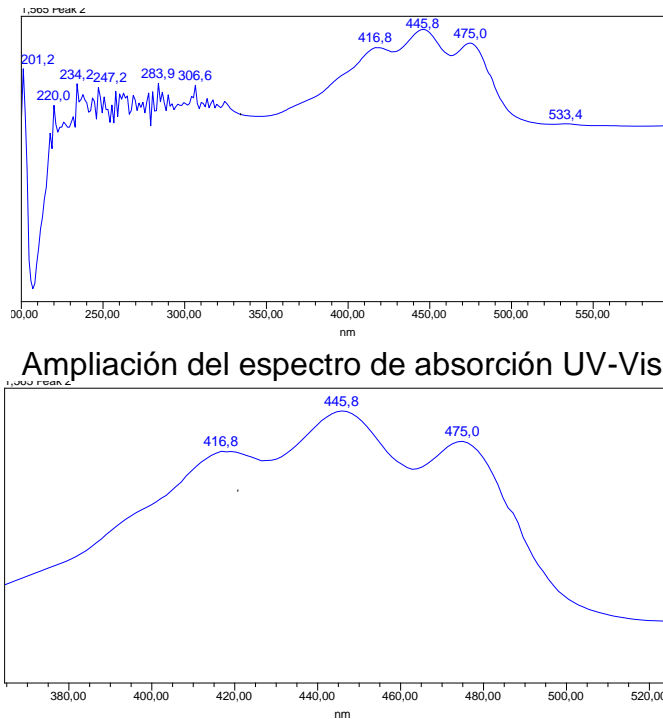
²³² FERNÁNDEZ. Op. Cit., p. 93.

Figura 71. Perfil cromatográfico a 480nm del extracto EPA por HPLC-analítico.



Fuente: Esta investigación.

Figura 72. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto tipo xantófila presente en EPA.



Fuente: Esta investigación.

Aunque las condiciones cromatográficas del análisis de la fracción EPA por HPLC-analítico, no fueron las más adecuadas, se debe tener en cuenta que este análisis solo se hizo para corroborar la presencia de carotenoides, sin embargo este tipo de pigmentos no son objetivo de esta investigación.

CONCLUSIONES

Mediante espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS), ^1H -RMN y UV-Vis se identificó tentativamente como compuesto mayoritario la deshidrogenada descarboxilada-neohilocerenina, un componente genuino del fruto de pitaya. Otros componentes minoritarios como la 2-decarboxi neohilocerenina y el ciclodopa-5-O-(6'-O-3''-hidroxi-3'metilglutatil) β -glucósido también fueron identificados tentativamente por HPLC-ESI-MS. Estos tres componentes presentan similares características estructurales, se encuentran glicosidados y acilados con el grupo 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG).

En la cáscara del fruto de Pitaya se identificó cualitativamente la presencia de componentes tipo xantófila, otro tipo de pigmentos con reconocida actividad biológica.

Se comprobó la eficiencia de retención de los componentes fenólicos sobre la columna empacada con resina XAD-7, el extracto retenido mostró mayor contenido de fenoles totales y actividad antirradical ($136,570 \pm 1.107$ mg de ácido gálico /g extracto y $921,14 \pm 8.96$ μmol trolox/g muestra) que el extracto crudo, que lo hace de gran interés como posible aditivo para alimentos.

Se determinaron las condiciones más favorables de almacenamiento de los diferentes extractos acuosos, encontrándose que ambos factores, pH y luz, son determinantes en la degradación de este tipo de extractos, siendo el más estable el ECM almacenado a pH 5, en ausencia de luz. Es posible que en el extracto crudo existan otro tipo de compuestos que estabilicen los polifenoles disminuyendo así su velocidad de degradación.

PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación ha sido sometida a divulgación científica a través de la participación en los siguientes eventos.

PONENCIA

- Estudio químico de los pigmentos aislados de la pitaya amarilla (*megalanthus Selenicereus*): contenido fenólico, actividad antioxidante y estudio del color.

Evento I: III CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA PURA Y APLICADA (CONLEQ) – XV ENCUENTRO NACIONAL DE ESTUDIANTES DE QUÍMICA PURA Y APLICADA (ENEQUIM), Marzo del 25 al 27 de 2015. Universidad Santiago de Cali.

ARTÍCULO EN EVALUACIÓN

- CEJUDO BASTANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson; DELGADO, Angelica y HEREDIA Francisco. Potential use new Colombian sources of betalains. Effect of the acidity and temperature on the color and betalain content of yellow pitaya (*Selenicereus megalanthus*). En: Food Res Int. 2015, sometido.

RECOMENDACIONES

Para la elucidación inequívoca de la estructura molecular de la betalaína mayoritaria sugerida en esta investigación, es necesario aislar mayor cantidad de este compuesto en estado puro, para realizar estudios de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN $^{13}\text{-C}$) y análisis bidimensionales como COSY, HSQC, HMBC y TOCSY. La información de estas técnicas aclara las dudas sobre el tipo de azúcar enlazado y su configuración anomérica

Se recomienda medir la estabilidad frente a otros factores de almacenamiento que también afectan la degradación de betalaínas como: variación de temperatura; presencia y ausencia de aire.

BIBLIOGRAFÍA

ALARD, Doris, *et al.* Neobetanin: isolation and identification from Beta vulgaris. En: *Phytochemistry*. **1985**. vol. 24, no. 10, p. 2383-2385.

ALVAREZ, Edwin, *et al.* Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del genero Vismia (guttiferae). En: *Vitae*. Junio, **2008**, vol. 15, no. 1, p. 165-172.

AHMED, Hafiz. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. London, CRC Press, **2004**, 6 p.

AQUINO BOLAÑOS, Elia Nora, *et al.* Caracterización fisicoquímica de siete variedades de tuna (Opuntia spp.) color rojo-violeta y estabilidad del pigmento de las dos variedades con mayor concentración, En: *Investigación y ciencia-Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Mayo-Agosto, **2012**, vol. 20, no. 55, p. 3-10.

ATTOE, E. L. y VON ELBE, J. H. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. En: *Journal of Food Science*. Noviembre, **1981**, vol. 46, no. 6, p. 1934-1937.

AZEREDO, Henriette. Betalains: properties, sources, applications, and stability -a review. En: *Food Science and Technology*. Diciembre, **2009**, vol. 44, no. 12, p. 2365-2376.

BADUI DERGAL, Salvador. Química de los alimentos. 3 ed. Mexico: Pearson Education, **1993**, 377-405 p.

BELTRÁN OROZCO, Carmen, *et al.* Guillermo. Ácido ascórbico, contenido fenólico, y capacidad antioxidante de las variedades roja, cereza, amarilla y blanca del fruto del cactus de la pitaya (Stenocereus stellatus Riccobono). En: *Agrociencia*. Febrero-Marzo, **2009**, vol. 43, no. 2, p. 153-161.

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

BROCKINGTON, Samuel, *et al.* Lineage-specific gene radiations underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. En: *New Phytologist*. Septiembre, **2015**, vol. 207, no. 4, p. 1170-1180.

CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Octubre, **1998**, vol. 46, no. 11, p. 4491-4495.

CAI, Yizhong y CORKE, Harold. Effect of postharvest treatments on *Amaranthus* betacyanin degradation evaluated by visible/near-infrared spectroscopy. En: *Journal of Food Science*. Octubre, **2001**, vol. 66, no. 8, p. 1112-1118.

CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. HPLC Characterization of Betalains from Plants in the *Amaranthaceae*. En: *Journal of Chromatographic Science*. Octubre, **2005**, vol. 43, no. 9, p. 454-460.

CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Identification and Distribution of Simple and Acylated Betacyanins in the *Amaranthaceae*. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Abril, **2001**, vol. 49, no. 4, p. 1971-1978.

CAMPBELL, Neil A. y REECE, Jane B. *Biología*. 7 ed. Madrid: medica panamericana, **2007**, 188 p.

CARDOSO UGARTE, Gabriel Abraham, *et al.* Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). En: *Food Science and Technology*. Noviembre, **2014**, vol. 59, no. 1, p. 276-282.

CASTAÑEDA OVANDO, Araceli, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review. En: *Food Chemistry*. Abril, **2009**, vol. 113, no. 4, p. 859-871.

CASTELLANOS SANTIAGO, Elena y YAHIA, Elhadi. Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Junio, **2008**, vol. 56, no. 14, p. 5758-5764.

CASTELLAR, Rosario, *et al.* Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia* Fruits. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marzo, **2003**, vol. 51, no. 9, p. 2772-2776.

CASTELLAR, Rosario, *et al.* Fermentation of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits for betalains concentration. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Mayo, **2008**, vol. 56, no.11, p.4253–4257.

CASTRO MUÑOZ, Roberto. Efecto del secado por aspersion en la estabilidad de componentes bioactivos de tuna morada (*Opuntia ficus-indica*). Tesis de maestría

en ciencias en bioprocesos. Mexico: Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, **2014**. 25 p.

CEJUDO BASTANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson; DELGADO, Angélica y HEREDIA, Francisco. Potential use new Colombian sources of betalains. Effect of the acidity and temperature on the color and betalain content of yellow pitaya (*Selenicereus megalanthus*). En: *Food Research International*. **2015**, sometido.

CHAUHAN, sanjay, *et al.* Analysis of betalains from fruits of *Opuntia* species. En: *Phytochemistry Reviews*. Julio, **2012**, vol. 12, no. 1, p. 35-45.

CHEMAH, T. C., *et al.* Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids. En: *Food Research International*. Noviembre, **2010**, vol. 17, no. 4. p. 1003-1010.

CHEN, Guan-Lin, *et al.* Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. En: *Industrial Crops and Products*. Junio, **2014**, vol. 57, p. 150–157.

CHICA, M.; GARCÍA U. y ROJAS, J. M. Caracterización físico-mecánica de las frutas frescas. En: Caracterización y normalización de los recipientes de cosecha y empaques de comercialización de frutas en Colombia. Chinchiná, Caldas, Cenicafé, **2005**, 166 p.

CORPOICA. Ed. Pitaya Cosecha y Postcosecha. Colombia, **2003**, 3, 22-23 p.

CRAWLEY, Sunny y HILU, Khidir. Caryophyllales: Evaluating phylogenetic signal in *trnK* intron versus *matK*. En: *Journal of Systematics and Evolution*. Septiembre, **2012**, vol. 50, no. 5, p. 387-410.

DAVIES Kevin M. Annual Plant Reviews. Plant Pigments and their Manipulation. Palmerston norte, John Wiley & Sons, **2009**, Vol. 14, 328-331 p.

DOWNHAM, Alison y COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. En: *International Journal of Food Science and Technology*. Febrero, **2000**, vol. 35, no. 1, p. 5-22.

ERMAKOV, Igor, *et al.* Resonance Raman detection of carotenoid antioxidants in living human tissue, En: *Journal of Biomedical Optics*. Noviembre-Diciembre, **2005**, vol. 10, no. 6, doi:10.1117/1.2139974.

ESQUIVEL, Patricia. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. En: *Agronomía Mesoamericana*. Junio, **2004**, vol. 15, no. 2, p. 215-219.

FENNEMA, Owen R. Química de los alimentos. 2 ed. España, Acribia, **1993**, 640-655 p.

FERNÁNDEZ LÓPEZ, José, *et al.* Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. En: *Plant Foods for Human Nutrition*. Septiembre, **2010**, vol. 65, no. 3, p. 253-259.

FEUGANG, Jean Magloire, *et al.* Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. En: *Frontiers in Bioscience*. Septiembre, **2006**, vol. 11, p. 2574-2589.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. En: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **1989**, vol. 28, no. 4, p. 273-314.

GANDÍA HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA CARMONA, Francisco. Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. En: *Planta*. Noviembre, **2005**, vol. 222, no. 4, p. 586-593.

GANDÍA HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA CARMONA, Francisco. Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine-betaxanthin/dopamine-betaxanthin pair. En: *Planta*. Octubre, **2005**, vol. 222, no. 2, p. 307-318.

GENGATHARAN, Ashwini; DYKES, Gary y CHOO, Wee Sim. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. En: *Food Science and Technology*. Diciembre, **2015**, vol. 64, no. 2, p. 645-649.

GONZÁLEZ, Álvaro. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. España: Elsevier, 2010, 25 p.

GUERRA, Elejalde. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. En: *Anales de medicina interna*. Junio, **2001**, vol. 18, no. 6, doi: 10.4321/s0212-71992001000600010.

HALVORSEN, Bente, *et al.* A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. En: *Journal of Nutrition*. Marzo, **2002**, vol. 132, no. 3, p. 461-471.

HARIVAINDARAN, K.V; REBECCA, Ow Phui y CHANDRAN, Chandran. Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. En: *Pakistan Journal of Biological Sciences*. Septiembre, **2008**, vol. 11, no. 18, p. 2259-2263.

HAVLIKOVÁ, Ludmila; MIKOVÁ, Kamila y KYZLINK, Vladimír. Heat Stability of Betacyanins. En: *Z Lebensm Unters Forsch.* Julio, **1983**, vol. 177, no. 4, p. 247-250.

HERBACH, Kirsten, M.; STINTZING, Florian y CARLE, Reinhold. Betalain Stability and Degradation-Structural and Chromatic Aspects. En: *Journal of Food Science.* Mayo, **2006**, vol. 71, no. 4, p. R41-R50.

HERBACH, Kirsten, *et al.* Effects of processing and storage on juice color and betacyanin stability of purplepitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice. En: *European Food Research and Technology.* Mayo, **2007**, vol. 224, no. 5, p. 649-658.

HERBACH, Kirsten, M.; STINTZING, Florian y CARLE, Reinhold. Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. En: *European Food Research and Technology.* Agosto, **2004**, vol. 219, no. 4, p. 377-385.

HERNANDEZ, Ángel Gil. Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos. 2 ed. Madrid, Médica Panamericana, **2010**, 418-419 p.

HERNÁNDEZ, Héctor M. La vida en los desiertos mexicanos. México, Secretaría de Educación Pública, **2006**, 111 p.

HURTADO, Nelson y PÉREZ, Milena. Identificación, Estabilidad y Actividad Antioxidante de las Antocianinas Aisladas de la Cáscara del Fruto de Capulí (*Prunus serotina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). En: *Inf Tecnol.* Febrero, **2014**, .vol. 25, no. 4, p. 131-140.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS Y CERTIFICADOS (ICONTEC). Frutas frescas. Pitahaya amarilla. NTC 3554, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Cenicafé. Bogotá, **1996**, 5-6 p.

JACOBSEN, Neil. NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. Canada, John Wiley & Sons, **2007**, 12-17 p.

JIANG Y. L.; LIN T. S.; LEE C. L.; YEN C. R.; YANG W. J., Phenology, canopy composition, and fruit quality of yellow pitaya in Tropical Taiwan. En: *HortScience.* Noviembre , **2011**, vol. 46, no. 11, p. 1497-1502.

KANELIS, Angelos y MANGANARIS, George. Antioxidants and bioactive compounds in fruits. En: *Fruit Ripening. Physiology, Signalling and Genomics*. Boston, Cabi, **2014**, 108 p.

KAPADIA, Govind J., *et al.* Chemoprevention of lung and skin cancer by Beta vulgaris (beet) root extract. En: *Cancer Letters*. Febrero, **1996**, vol. 100, no. 1-2, p. 211-214.

KHAN, Mohammad Imtiyaj y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: *Phytochemistry*. Septiembre, **2015**, vol. 117, p. 267-295.

KOBAYASHI, Naoko, *et al.* Betalains from Christmas cactus. En: *Phytochemistry*. Junio, **2000**, vol. 54, no. 4, p. 419-426.

KOBAYASHI, Naoko, *et al.* Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. En: *Phytochemistry*. Marzo, **2001**, vol. 56, no. 5, p. 429-436.

KUGLER, Florian, *et al.* Determination of free amino compounds in betalainic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Mayo, **2006**, vol. 54, no. 12, p. 4311-4318.

KUGLER, Florian, *et al.* Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. En: *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*. Junio, **2007**, vol. 62, no. 5-6, p. 311-318.

KUJALA, Tytti S., *et al.* Betalain and phenolic compositions of four beetroot (Beta vulgaris) cultivars. En: *European Food Research and Technology*. Abril, **2002**, vol. 214, no. 6, p. 505-510.

KUNIN, Robert. The use of macroreticular polymeric adsorbents for the treatment of waste effluents. En: *Macromolecular Chemistry-11*. Jerusalén, Eisenberg H., **1975**, 206 p.

KUSKOSKI E. Marta, *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: *Revista de Ciencia y Tecnología*. Octubre-Diciembre, **2005**, vol. 25, no. 4, p. 726-732.

LEON, Jorge. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. Costa Rica, Agroamerica, **2000**, 81 p.

LUQUE, Matilde; RÍOS, Angel y VALCÁRCEL, Miguel. A poly (vinyl chloride) graphite composite electrode flow-injection amperometric determination of

antioxidants. En: *Analytica Chimica Acta*. Agosto, **1999**, vol. 395, no.1-2, p. 217–223

MABRY, Tom J. Selected Topics from Forty Years of Natural Products Research: Betalains to Flavonoids, Antiviral Proteins, and Neurotoxic Nonprotein Amino Acids. En: *Journal of Natural Products*. Diciembre, **2001**, vol. 64, no. 12, p. 1596-1604.

MABRY, Tom J., *et al.* The conversion of betanidin and betanin to neobetanidin derivatives. En: *Tetrahedron*, **1967**, vol. 23, no. 7, p. 3111–3127.

MARTÍNEZ, A. Flavonoides. Medellín, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, **2005**, 8-15 p.

MARTÍNEZ FLÓREZ, S., *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: *Nutrición Hospitalaria*. Agosto, **2002**, vol. 17, no. 6, p. 271-278

MEDINA, Jorge Alberto *et al.* Generalidades del cultivo. En: Manual técnico: Tecnología para el manejo de pitaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran en Colombia. Colombia, Corpoica, **2013**, 17-18 p.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, Antonio J.; VICARIO, Isabel M. y HEREDIA, Francisco J. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. En: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **2007**, vol. 57, no. 2, p. 109-117.

MILLER, Renee; OWENS, Simon J. y RØRSLETT, Bjørn. Plants and colour: Flowers and pollination. En: *Optics and Laser Technology*. Marzo, **2011**, vol. 43, no. 2, p. 282-294.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Características y estructura de los frutales de exportación en Colombia. Bogotá, Observatorio Agrocadenas, **2002**, 22 p.

MULINACCI, Nadia y INNOCENTI, Marzia. Anthocyanins and betalains. En: *Food Analysis by HPLC*. 3 ed. CRC press, **2012**, 769-771 p.

MÜLLER-ESTERL, Werner. Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. España, Reverte, **2008**, 19 p.

NAZARENO, Mónica y PADRÓN PEREIRA, Carlos Alberto. Nuevas tecnologías desarrolladas para el aprovechamiento de las cactáceas en la elaboración de alimentos. Componentes funcionales y propiedades antioxidantes. En: *Revista*

Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Julio, **2011**, vol. 2, no. 1, p. 202-238.

NEMZER, Boris, *et al.* Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. En: *Food and Chemical*. Julio, **2011**, vol. 127, no. 1, p. 42-53.

NERD, Avinoam y MIZRAHI, Yosef. The effect of ripening stage on fruit quality after storage of yellow pitaya. En: *Postharvest Biology and Technology*. Febrero, **1999**, vol. 15, no. 2, p. 99-105.

OSMAN, A. M.; WONG, Ken Y. y FERNYHOUGH, Alan. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. En: *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Julio, **2006**, vol. 346, no. 1, p. 321-329.

PARISH, John y FELKER, Peter. Fruit quality and production of cactuspear (*Opuntia* spp.) fruit clones selected for increased frost hardiness. En: *Journal of Arid Environments*. Septiembre, **1997**, vol. 37, no. 1, p.123-143.

PEREA DALLOS, Margarita *et al.* Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales. Colombia, Universidad Nacional de Colombia, **2010**, 581 p.

PIATTELLI, M. y IMPERATO, F. Betacyanins of the family cactaceae. En: *Phytochemistry*, Agosto, **1969**, vol. 8, no. 8, p. 1503-1507.

PIATTELLI, M. y IMPELLIZZERI, G. 2-Descarboxybetanidin, a minor betacyanin from *Carpobrotus acinaciformis*. En: *Phytochemistry*. Diciembre, **1970**, vol. 9, no. 12, p. 2553-2556.

PRIMO YÚFERA, E. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Barcelona, Editorial Reverte, **1995**, vol. 2, 869-870 p.

RE, Roberta, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: *Free Radical Biology and Medicine*. Mayo, **1999**, vol. 26, no. 9-10, p.1231-1237.

SÁENZ, Carmen. Utilización agroindustrial del nopal. Roma: Food & Agriculture Org, **2006**, 4-5 p.

SAGUY, Israel; KOPELMAN, Isaiah y MIZRAHI, Shimon. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marzo, **1978**, vol. 26, p. 360-362.

SÁNCHEZ GONZÁLEZ, Noe. Extracción y caracterización de los principales pigmentos del opuntia *Opuntia joconoste* c.v. (xoconostle). Tesis de maestría en tecnología avanzada. México, D. F.: Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, **2006**, 37 p.

SANCHEZ GONZALEZ, Noe, *et al.* Extraction, Stability, and Separation of Betalains from *Opuntia joconostle* cv. Using Response Surface Methodology. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Noviembre, **2013**, vol. 61, no. 49, p. 11995-12004.

SANTACRUZ CIFUENTES, Liliana. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Departamento de química, **2011**, 33-34 p.

SCHWARTZ, Steven J. y VON ELBE, Joachim. Identification of betanin degradation products. En: *Z Lebensm Unters Forsch*. Noviembre, **1983**, vol. 176, no. 6, p. 448–453.

SEKIGUCHI, Hiroshi; OZEKI, Yoshihiro y SASAKI, Nobuhiro. Biosynthesis and Regulation of Betalains in Red Beet. En: *Red Beet Biotechnology. Food and Pharmaceutical Applications*. India, Bhagyalakshmi N., **2012**, p.47.

SHIVAPRIYA, Manchali. Stability of Betalain Pigments of Red Beet. En: *Red Beet Biotechnology. Food and Pharmaceutical Applications*. India, Bhagyalakshmi N., **2012**, p. 57-67.

SING DE UGAZ, Olga Lock. Colorantes naturales. Perú, fondo editorial PUCP, **1997**, 119-131 p.

SINGER J. W. y VON ELBE J. H. Degradation rates of vulgaxanthine I. En: *Journal of Food Science*. Mayo, **1980**, vol. 45, no. 3, p. 489-491.

SMITH, Roger. Column liquid chromatography. En: *chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods - part a: fundamentals and techniques*. 6 ed. Amsterdam, E. Heftmann, **2004**, 108 p.

SPÓRNA, A., *et al.* Liquid chromatographic techniques in separation of betacyanins and their derivatives from red beet roots (*Beta vulgaris* L.). En: *Challenges of Modern Technology*. Enero, **2010**, vol. 1, no. 1, p. 19-22.

STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Analisis of betalains. En: *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. Carmen Socaciu, **2007**, 507-509 p.

STINTZING, Florian C., *et al.* Betacyanins and phenolic compounds from *Amaranthus spinosus* L. and *Boerhavia erecta* L. En: *Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*. Febrero, **2004**, vol. 59, no. 1-2, p. 1-8.

STINTZING, Florian C., *et al.* Betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Enero, **2005**, vol. 53, no. 2, p. 442-451.

STINTZING, Florian C.; TRICHTERBORN, Jam y CARLE, Reinhold. Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. En: *Food Chemistry*. Enero, **2006**, vol. 94, no. 2, p.296-309.

STINTZING, Florian C., *et al.* ¹³C-NMR Assignments of Betaxanthins. En: *Helvetica Chimica Acta*. Mayo, **2006**, vol. 89, no. 5, p. 1008-1016.

STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. En: *European Food Research and Technology*. Abril, **2003**, vol. 216, no. 4, p. 303-311.

STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: *Trends in Food Science & Technology*. Enero, **2004**, vol. 15, no. 1, p.19-38.

STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography– Electro spray Ionization Mass Spectrometry. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Marzo, **2002**, vol. 50, no. 8, p. 2302–2307.

STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. En: *European Food Research and Technology*. Marzo, **2001**, vol. 212, no. 4, p. 396-407.

STINTZING, Florian C., *et al.* Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. En: *Food and Chemical*. Febrero, **2004**, vol. 65, no. 4, p. 415-422.

STRACK, Dieter; ENGEL, Ute y WRAY, Victor. Neobetanin: A new natural plant constituent. En: *Phytochemistry*. **1987**, vol. 26, no. 8, p. 2399-2400.

STRACK, Dieter y WRAY, Victor. Recent Advances in Betalain Analysis. En: *Caryophyllales: Evolution and Systematics*. Berlin, Springer Science & Business Media, **1994**, 263-264 p.

STRACK, Dieter; VOGT, Thomas y SCHLIEMANN, Willibald. Recent advances in betalain research. En: *Phytochemistry*, Febrero, **2003**, vol. 62, no. 3, p. 247-269.

SUÁREZ ROMÁN, R. S. Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *selenicereus megalanthus* (haw.) britt & rose y pitahaya roja *hylocereus polyrhizus* (haw.) britt & rose. Trabajo de maestría en Ciencias Agrarias-Fitomejoramiento. Palmira: Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, **2011**, p.31-36.

TSAI, Pi-Jen, *et al.* Thermal and pH Stability of Betacyanin Pigment of Djulis (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and Their Relation to Antioxidant Activity. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Enero, **2010**, vol. 58, no. 2, p. 1020-1025.

VON ELBE J.H.; MAING Il-Young y AMUNDSON C.H. Colour stability of betanin. En: *Journal of Food Science*. Marzo, **1974**, vol. 39, no. 2, p. 334-337.

VON ELBE J.H. y ATTOE E.L. Oxygen involvement in betanin degradation-Measurement of active oxygen species and oxidation reduction potentials. En: *Food and Chemical*. **1985**, vol. 16, no. 1, p. 49-67.

WASSERMAN, Bruce P.; EIBERGER, Laura L. y GUILFOY, Michael P. Effect of hydrogen peroxide and phenolic compounds on horseradish peroxidase-catalysed decolorization of betalain pigments. En: *Journal of Food Science*. Marzo, **1984**, vol. 49, no. 2, p. 536-538.

WEE, Sim Choo y WEE, Khing Yong. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. En: *Adv. Appl. Sci. Res.* **2011**, vol. 2, no. 3, p. 418-425.

WEININGER, Stephen y STERMITZ, Frank. Química orgánica. España, Reverte, **1988**, 813-814 p.

WOLFGANG, W. *et al.* Manual de química orgánica. 19 ed. Barcelona, Reverte, **1987**, 767-768 p.

WYBRANIEC, Sławomir. A method for identification of diastereomers of 2-decarboxy-betacyanins and 2,17-bidecarboxy-betacyanins in reversed-phase HPLC. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Noviembre, **2007**, vol. 389, no. 5, p. 1611-1621.

WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. En: *Phytochemistry*. Diciembre, **2001**, vol. 58, no. 8, p. 1209-1212.

WYBRANIEC, Sławomir y MIZRAHI, Yosef. Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Julio, **2005**, vol. 53, no. 17, p. 6704-6712.

WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Separation of polar betalain pigments from cacti fruits of *Hylocereus polyrhizus* by ion-pair high-speed countercurrent chromatography. En: *Journal of Chromatography A*. Octubre, **2009**, vol. 1216, no. 41, p. 6890-6899.

WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Studies on Nonenzymatic Oxidation Mechanisms in Neobetanin, Betanin, and Decarboxylated Betanins. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Junio, **2013**, vol. 61, n. 26, p. 6465-6476.

XU, Rensheng; YE, Yang y ZHAO, Weimin (Ed). Introduction to Natural Products Chemistry. Beijing, CRC Press, **2011**, 129 p.

YAHIA, E. M. (Ed.) y SÁENZ C. Cactus pear *Opuntia* species. En: Postharvest biology and technology of tropical and subtropical, Vol. 2 fruits: açai to citrus. Cambridge, **2011**, 297 p.

YAMAUCHI, Naoki y WATADA, Alley E. Chlorophyll and xanthophyll changes in broccoli florets stored under elevated CO₂ or ethylene-containing atmosphere. En: *Postharvest Biology and Technology*. Febrero, **1998**, vol. 31, no. 1, p. 114-117.

ZAMPINI, Iris C., *et al.* Nutraceutical properties and toxicity studies of fruits from four Cactaceae species grown in Argentine Northwestern. En: *Food Research International*. Agosto, **2011**, vol. 44, no. 7, p. 2345-2351.

ZHU, Fan, *et al.* Influence of *Amaranthus* Betacyanin Pigments on the Physical Properties and Color of Wheat Flours. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Agosto, **2008**, vol. 56, no. 17, p. 8212-8217.

Anexos

Anexo A. Tabla de medias por mínimos cuadrados para la constante de velocidad con intervalos de confianza del 95.0%, en extracto crudo (ECM).

			<i>Error</i>	<i>Límite</i>	<i>Límite</i>
<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Est.</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
MEDIA GLOBAL	18	31.6889			
pH					
3	6	40.2333	0.101379	40.0124	40.4542
5	6	23.0167	0.101379	22.7958	23.2376
7	6	31.8167	0.101379	31.5958	32.0376
Luz					
AL	9	25.8444	0.0827759	25.6641	26.0248
PL	9	37.5333	0.0827759	37.353	37.7137
pH por Luz					
3,AL	3	32.4667	0.143372	32.1543	32.779
3,PL	3	48.0	0.143372	47.6876	48.3124
5,AL	3	22.3333	0.143372	22.021	22.6457
5,PL	3	23.7	0.143372	23.3876	24.0124
7,AL	3	22.7333	0.143372	22.421	23.0457
7,PL	3	40.9	0.143372	40.5876	41.2124

Anexo B. Pruebas de Múltiple Rangos para la constante de velocidad por Luz, en ECM.

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Luz</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
AL	9	25.8444	0.0827759	X
PL	9	37.5333	0.0827759	X

* Cuando X's no está alineado, hay diferencia significativa

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
AL - PL	*	-11.6889	0.255059

* indica una diferencia significativa.

Anexo C. Pruebas de Múltiple Rangos para la constante de velocidad por pH, en ECM.

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
5	6	23.0167	0.101379	X
7	6	31.8167	0.101379	X
3	6	40.2333	0.101379	X

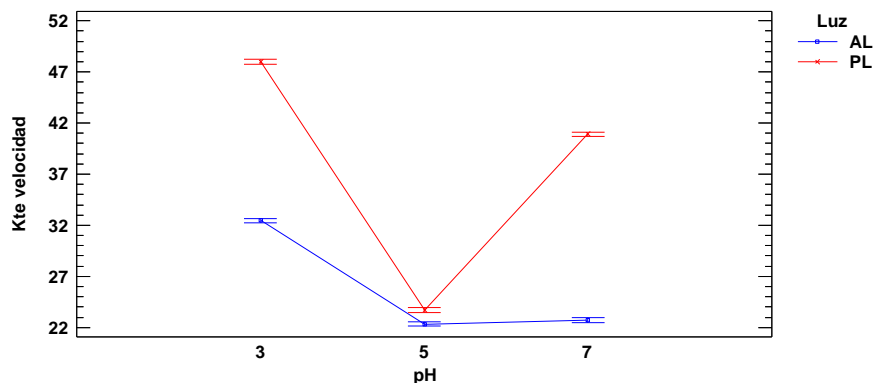
* Cuando X's no está alineado, hay diferencia significativa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 5	*	17.2167	0.312382
3 - 7	*	8.41667	0.312382
5 - 7	*	-8.8	0.312382

* indica una diferencia significativa.

Anexo D. Grafico de interacciones y 95% de Fisher LSD, en ECM

Interacciones y 95.0% de Fisher LSD



* Cuando los intervalos no se traslapan hay diferencia significativa

Anexo E. Tabla de medias por mínimos cuadrados para la constante de velocidad con intervalos de confianza del 95.0%, del extracto purificado (EPM).

Nivel	Casos	Media	Error Est.	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GLOBAL	18	47.0222			
pH					
3	6	61.65	0.250185	61.1049	62.1951
5	6	39.8333	0.250185	39.2882	40.3784
7	6	39.5833	0.250185	39.0382	40.1284
Luz					
AL	9	31.4556	0.204275	31.0105	31.9006
PL	9	62.5889	0.204275	62.1438	63.034
pH por Luz					
3,AL	3	43.7667	0.353815	42.9958	44.5376
3,PL	3	79.5333	0.353815	78.7624	80.3042
5,AL	3	25.1	0.353815	24.3291	25.8709
5,PL	3	54.5667	0.353815	53.7958	55.3376
7,AL	3	25.5	0.353815	24.7291	26.2709
7,PL	3	53.6667	0.353815	52.8958	54.4376

Anexo F. Pruebas de Múltiple Rangos para la constante de velocidad por Luz, en ECM.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Luz	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
AL	9	31.4556	0.204275	X
PL	9	62.5889	0.204275	X

* Cuando X's no está alineado, hay diferencia significativa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
AL - PL	*	-31.1333	0.629436

* indica una diferencia significativa.

Anexo G. Pruebas de Múltiple Rangos para la constante de velocidad por pH, en ECM.

Método: 95.0 porcentaje LSD

pH	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
7	6	39.5833	0.250185	X
5	6	39.8333	0.250185	X
3	6	61.65	0.250185	X

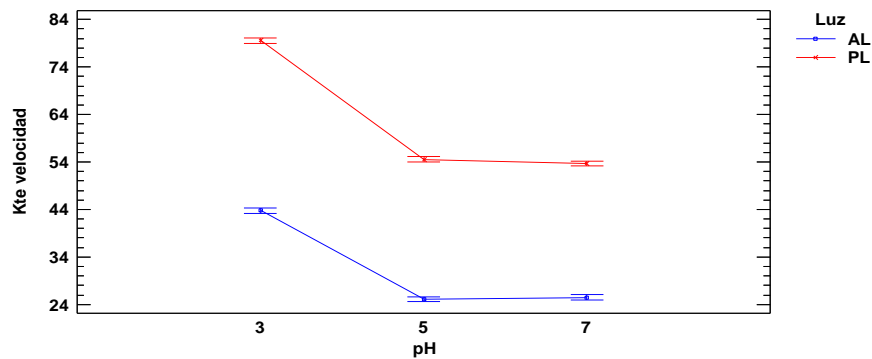
* Cuando X's no está alineado, hay diferencia significativa.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
3 - 5	*	21.8167	0.770899
3 - 7	*	22.0667	0.770899
5 - 7		0.25	0.770899

* indica una diferencia significativa.

Anexo H. Grafico de interacciones y 95% de Fisher LSD, en ECM

Interacciones y 95.0% de Fisher LSD



* Cuando los intervalos no se traslapan hay diferencia significativa