

CONTENIDO DE BETALAÍNAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL
ULLUCO (*Ullucus tuberosus*)

NATALIA ANDREA MOSQUERA QUINTANA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2016

CONTENIDO DE BETALAÍNAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL
ULLUCO (*Ullucus tuberosus*)

NATALIA ANDREA MOSQUERA QUINTANA

Trabajo de grado presentado al Comité Curricular y de Investigaciones del
Departamento de Química como requisito parcial para optar al título de Químico.

Director
Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez,
Doctor en Química Analítica

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2016

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

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

Nota de aceptación:

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez
Director

Jesús Adriano Romo Ramos
Jurado

Juan José Lozada Castro
Jurado

San Juan de Pasto, 26 de agosto de 2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y por las oportunidades que me ha brindado.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

Al docente Nelson Hurtado por su orientación y colaboración brindados a lo largo de todo este trabajo investigativo.

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

A los jurados, los docentes Jesús Romo y Juan José Lozada por el tiempo dedicado a la evaluación del presente trabajo.

A los docentes departamento de Química por haber aportado en mi formación académica.

Al personal de la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño, por toda su colaboración, especialmente a los químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez, encargados del Laboratorio de Cromatografía.

Al Grupo de Investigación Color y Calidad de Alimentos de la Universidad de Sevilla (España), especialmente a los docentes: Francisco Heredia, María Jesús Cejudo y Sandra Montes por el constante interés en la investigación colaborativa sobre el color y sus propiedades.

A mi familia, especialmente a mis abuelos Luz María y Bolívar, mi tía Yolanda y Camila por haber estado conmigo y apoyado durante estos años.

A mis amigos y compañeros Pablo, Angélica, Ángela, Maritza, Jessica, Johana por el tiempo y los momentos compartidos. Así mismo a todos los integrantes del GIPIB por su compañerismo y colaboración.

DEDICATORIA

A mis padres, Miguel y Gladys, por todo su amor y comprensión,
por animarme a seguir adelante y porque gracias a ustedes
me he formado como la persona que hoy soy.
Ustedes son mi motivación en cada etapa de mi vida.

A mi abuelita Luz María por todo el cariño que me ha dado
y por siempre preocuparse por mi bienestar.
A mi abuelito Bolívar que a pesar de su ausencia física,
siempre permanecerá en mi corazón.

Ustedes han sido mi bendición.
Todo esto es por ustedes,

Natalia Andrea Mosquera Quintana

RESUMEN

En el presente estudio se aislaron, purificaron e identificaron los pigmentos tipo betalaína de una variedad de *Ullucus tuberosus* cultivada en la vereda Cruz de Amarillo y de color rojo magenta comúnmente conocido como ulluco “chincheño”, evaluando además su actividad antioxidante *in vitro* y contenido fenólico. Las betalaínas fueron aisladas del material vegetal mediante extracción con metanol al 60% y posteriormente, se purificaron al eliminar los mucílagos por precipitación con etanol, resultando los extractos que se denominaron: crudo (EC) y purificado (EP), respectivamente. Mediante espectroscopia UV-Vis se determinó que la coloración rojo magenta es resultado de una mezcla tanto de betacianinas rojizas ($44,5 \pm 0,8 \mu\text{g}$ de betanina/g de cáscara de ulluco) como de betaxantinas amarillas ($21,8 \pm 0,6 \mu\text{g}$ de indicaxantina/ g de cáscara de ulluco). Las dos clases de betalaínas se separaron mediante la técnica de cromatografía en columna obteniéndose una fracción rica en betacianinas (FBC) y una rica en betaxantinas (FBX); así mismo se obtuvo una fracción intermedia (FI) de color naranja. En los extractos y fracciones, un total de 18 betacianinas y 8 betaxantinas se caracterizaron mediante espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS) y espectroscopia UV-Vis. Los compuestos mayoritarios fueron tentativamente asignados como filocactina [betanidina 5-O-(6'-O-malonil)- β -glucósido] y vulgaxantina I [Glutamina-Betaxantina]. Por otra parte, el análisis de la actividad antioxidante mostró que la fracción FBC tiene una capacidad para capturar los radicales libres sintéticos ABTS (TEAC = $1387,52 \mu\text{mol Trolox/g Muestra}$) y DPPH ($\text{EC}_{50} = 4,87 \text{ E-1 g Muestra/g DPPH}$) superior a la FI, seguida del EC, EP y FBX. De igual manera, el contenido fenólico resultó ser mayor en la FBC, con un valor de $267,17 \text{ mg AG/g Muestra}$, seguido nuevamente de la FI, EC, EP y FBX. Estos resultados permitieron establecer que existe una fuerte correlación ($r^2 = 0,9944$) entre la capacidad antioxidante *in vitro* y el contenido fenólico y sugieren que en cuanto a estos dos parámetros, la mezcla de betacianinas supera a la de betaxantinas.

ABSTRACT

In the present study the betalains from red magenta ulluco (*Ullucus tuberosus*), commonly known as 'Chincheno' and collected in the village of 'Cruz de Amarillo', were isolated, purified and identified. Test about their antioxidant activity *in vitro* and phenolic content was carried out too. The betalain pigments were isolated from vegetal material using methanol (60%) and then, they were purified with ethanolic precipitation, resulting the next extracts: crude (EC) and purified (EP), respectively. UV-Vis spectroscopy pointed that the magenta-red color is the result of a mixture of red betacyanins ($44,5 \pm 0,8 \mu\text{g}$ betanina/g ulluco shell) as yellow betaxanthins ($21,8 \pm 0,6$ indicaxanthin $\mu\text{g/g}$ ulluco shell). Both types of pigments were separated by column chromatography to obtain a fraction with high content of betacyanins (FBC) and with high content of betaxanthins (FBX). Likewise, an intermediate fraction (FI) orange color was obtained. In these extracts and fractions, a total of 18 betacyanins and 8 betaxanthins were characterized mainly using the mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) and also with the aid of the UV-Vis spectroscopy. The major compounds were assigned as filocactina [bethanidine 5-O- (6'-O-malonyl) - β -glucoside] and vulgaxanthin I [Glutamine-betaxanthin]. Moreover, the antioxidant activity analysis showed that the fraction FBC has the ability to scavenge synthetic free radicals such as ABTS (TEAC = $1387,52 \mu\text{mol Trolox/g sample}$) and DPPH ($\text{EC}_{50} = 4,87\text{E-}1 \text{ g Sample/g DPPH}$) higher than FI, followed by EC, EP and FBX. Similarly, the phenolic content was greater in the FBC, with a value of $267,17 \text{ mg AG/g sample}$, again followed by the FI, EC, EP and FBX. These results allowed to establish that there is a strong correlation ($r^2 = 0,9944$) between the *in vitro* antioxidant capacity and phenolic content and also, suggest that in terms of these two parameters, the mixture of betacyanins is superior than the mixture of betaxanthins.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	27
1. OBJETIVOS	30
1.1 OBJETIVO GENERAL	30
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
2. MARCO TEÓRICO	31
2.1 TUBÉRCULOS EN LA REGIÓN ANDINA	31
2.2 ULLUCO (<i>Ullucus tuberosus</i>)	34
2.2.1 Origen	34
2.2.2 Descripción de la planta	34
2.2.2.1 <i>Taxonomía.</i>	34
2.2.2.2 <i>Morfología.</i>	35
2.2.3 Características del cultivo y distribución en Colombia	37
2.2.4 Valor nutricional y composición química	38
2.3 PIGMENTOS NATURALES	39
2.3.1 Clorofilas	39
2.3.2 Carotenoides	40
2.3.3 Flavonoides	41
2.3.3.1 <i>Antocianinas</i>	41

2.4 BETALAÍNAS	43
2.4.1 Características estructurales y espectrales	43
2.4.1.1 <i>Betacianinas (BC)</i> .	43
2.4.1.2. <i>Betaxantinas (BX)</i> .	47
2.4.2 Biosíntesis	49
2.4.3 Distribución de las betalaínas en la Naturaleza.	51
2.4.4 Estabilidad	52
2.4.4.1 Efectos de algunos factores en la estabilidad de las betalaínas.	53
2.4.4 Las betalaínas como agentes colorantes para sustituir el uso de los colorantes sintéticos	55
2.4.5 Las betalaínas como antioxidantes	57
2.5 ASPECTOS METODOLÓGICOS	59
2.5.1 Extracción de betalaínas por maceración	59
2.5.2 Purificación, separación e identificación de betalaínas	60
2.5.3 Cuantificación del contenido fenólico	63
2.5.4 Actividad antioxidante	64
2.5.4.1 <i>Método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox)</i> .	64
2.5.4.2 <i>Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)</i> .	66
3. ANTECEDENTES	68
4. METODOLOGÍA	72
4.1 RECOLECCIÓN DEL TUBÉRCULO	72
4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL TUBÉRCULO	73
4.2.1 Determinación de porcentaje de humedad	73

4.2.2 Determinación de pH	73
4.2.3 Determinación de sólidos solubles totales (SST).	73
4.2.4 Determinación de firmeza	73
4.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	74
4.4 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS	74
4.4.1 Obtención del extracto crudo (EC)	74
4.4.1.1 <i>Determinación de la presencia de betalaínas en la muestra.</i>	75
4.4.2 Obtención del extracto purificado (EP)	75
4.4.3 Cuantificación del contenido betalaínico	76
4.5 SEPARACIÓN DE BETAXANTINAS Y BETACIANINAS	76
4.6 ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE BETALAÍNAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	78
4.6.1 Análisis de betalaínas por HPLC analítica	78
4.6.2 Caracterización de betalaínas mayoritarias por HPLC-MS	79
4.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO	79
4.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	79
4.8.1 Método TEAC (actividad antioxidante equivalente a trolox)	80
4.8.2 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	80
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
5.1 CARACTERÍSTICAS INICIALES DEL ULLUCO	82
5.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE BETALAÍNAS EN LA MUESTRA	83
5.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS	85

5.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS TIPO BETACIANINAS Y BETAXANTINAS	86
5.5. SEPARACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS	87
5.6 CARACTERIZACIÓN DE BETALAÍNAS MAYORITARIAS	88
5.6.1 Análisis general de betalaínas por HPLC analítica.	88
5.6.2. Identificación de betalaínas	91
5.7 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	116
5.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	119
5.8.1 MÉTODO TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox)	120
5.8.2. MÉTODO DPPH	123
CONCLUSIONES	129
PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN	131
RECOMENDACIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	134

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Nombres comunes de tubérculos en algunos países de la región Andina	32
Tabla 2. Clasificación general de las betalaínas.	49
Tabla 3. Solventes utilizados como fase móvil en la cromatografía de columna con silica C ₁₈ .	76
Tabla 4. Características fisicoquímicas del ulluco.	83
Tabla 5. Contenido de betacianinas y betaxantinas para el extracto crudo por gramo de material vegetal fresco.	86
Tabla 6. Características de compuestos encontrados en la corteza del ulluco.	115
Tabla 7. Resultados del método Folin-ciocalteau con patrones de ácido gálico.	117
Tabla 8. Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método F-C.	117
Tabla 9. Contenido de fenoles totales en los extractos y fracciones obtenidos de <i>Ullucus tuberosus</i> .	118
Tabla 10. Resultados del método ABTS con patrones de trolox.	120
Tabla 11. Estadísticas de la regresión lineal del método TEAC.	121
Tabla 12. Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox en los extractos y fracciones obtenidos de <i>Ullucus tuberosus</i> .	122
Tabla 13. Datos para la curva de calibrado del método DPPH [•] .	124
Tabla 14. Estadísticas de la regresión lineal (para la curva de calibración) del método DPPH.	125

Tabla 15. Parámetros estadísticos de las curvas de regresión para el ácido gálico (AG), extractos (EC y EP) y fracciones (FBX, FI y FBC) del <i>Ullucus tuberosus</i> con el método DPPH.	126
Tabla 16. EC ₅₀ en los extractos y fracciones obtenidos de <i>Ullucus tuberosus</i> .	127

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Tubérculos Andinos.	31
Figura 2. Planta de ulluco y sus diferentes partes.	36
Figura 3. Partes del tubérculo de ulluco.	37
Figura 4. Estructura química de la clorofila <i>a</i> y <i>b</i> .	40
Figura 5. Estructura química de carotenoides.	41
Figura 6. Estructura química de diferentes flavonoides.	42
Figura 7. Estructura química de la antocianina.	42
Figura 8. Estructuras generales del ácido betalámico, y las betalainas indicando la resonancia del cromóforo.	43
Figura 9. Estructura general de las betacianinas.	44
Figura 10. Residuos acilo (alifáticos y aromáticos) comunes en la sustitución de betacianinas.	45
Figura 11. Estructuras generales de las betacianinas/isobetacianinas.	46
Figura 12. Estructura de la neobetanina.	47
Figura 13. Estructuras de las betaxantinas más comunes.	48
Figura 14. Pasos de la ruta biosintética de las betalainas.	50
Figura 15. Algunas especies vegetales con contenido de betalainas	52
Figura 16. Factores que afectan la estabilidad de las betalainas.	52
Figura 17. Sitios propensos a degradación en betacianinas.	53
Figura 18. Reacción de degradación de la betanina en medio básico.	54

Figura 19.	Esquema de la reacción de fenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu	64
Figura 20.	Estructura del ABTS ácido 2,2 – azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico y su radical.	65
Figura 21.	Esquema general de la reacción con ABTS.	65
Figura 22.	Oxidación de la betanina por acción del radical ABTS.	66
Figura 23.	Estructura del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y su radical.	66
Figura 24.	Fotografías del muestreo del ulluco.	73
Figura 25.	Aspecto del ulluco recolectado.	74
Figura 26.	Pasos para la obtención del extracto crudo (EC).	75
Figura 27.	Apariencia del sólido correspondiente al extracto purificado (EP).	75
Figura 28.	Pasos del fraccionamiento de betacianinas y betaxantinas.	77
Figura 29.	Fracciones obtenidas del procedimiento de cromatografía en columna.	78
Figura 30.	Planta de ulluco radicada en el herbario de la Universidad de Nariño.	82
Figura 31.	Test cualitativo para confirmar la presencia de betalaínas en el extracto de ulluco.	84
Figura 32.	Espectros de absorción de la porción superficial color magenta y la zona cortical del ulluco.	85
Figura 33.	Porcentajes del contenido de betacianinas y betaxantinas en el <i>U. tuberosus</i> .	87
Figura 34.	Espectros de absorción de las tres fracciones: amarilla (FBX), naranja (FI) y magenta (FBC) obtenidas en el procedimiento de separación.	88
Figura 35.	Perfiles cromatográficos a 480 y 538 nm del extracto purificado EP.	89

Figura 36.	Espectros UV-Vis on-line de algunos picos cromatográficos del extracto purificado EP.	90
Figura 37.	Perfiles cromatográficos a 538 y 480 nm de la fracción rica en betacianinas FBC de coloración magenta.	92
Figura 38.	Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos 13 y 17.	93
Figura 39.	Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 13 y 17.	93
Figura 40.	Estructura de filocactina/isofilocactina propuestas para los compuestos 13 y 17.	93
Figura 41.	Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos 9 y 10.	94
Figura 42.	Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 9 y 10.	94
Figura 43.	Comparación del perfil cromatográfico a 538 nm de la fracción rica en betaxantinas (FBC) con el perfil a 538 del extracto de remolacha (ER).	95
Figura 44.	Estructura betanina/isobetanina propuesta para los compuestos 9 y 10.	95
Figura 45.	Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos 27 y 29.	96
Figura 46.	Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 27 y 29.	96
Figura 47.	Estructura de Gomfrenina III/Isogomfrenina III propuestas para los compuestos 27 y 29.	97
Figura 48.	Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 26 y 28.	97
Figura 49.	Estructura de la lamprantina II/isolamprantina II propuesta para el compuesto 26 y 28.	98
Figura 50.	Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos 11 y 12.	98
Figura 51.	Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 11 y 12.	99
Figura 52.	Espectro de masas $[M + H]^+$ de la señal 15.	99
Figura 53.	Espectro de absorción UV-Vis de la señal 15.	99

Figura 54.	Estructuras propuestas para los compuestos encontrados en el $t_R=$ 9,8 (pico 15).	100
Figura 55.	Espectros de masas $[M + H]^+$ del compuesto 16.	100
Figura 56.	Espectros de absorción UV-Vis del compuesto 16.	100
Figura 57.	Estructura de 4'-O-Malonil-betanina propuesta para el compuesto 16.	101
Figura 58.	Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 24b y 25.	101
Figura 59.	Espectro de masas $[M + H]^+$ del compuesto 24b.	101
Figura 60.	Estructura propuesta para los compuestos 24b y 25.	102
Figura 61.	Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 19 y 20.	103
Figura 62.	Espectros de masas de los compuestos 19 y 20.	103
Figura 63.	Espectro de masas $[M + H]^+$ del compuesto 22b.	104
Figura 64.	Espectro de absorción UV-Vis del compuesto 22b.	104
Figura 65.	Estructura de 2-decarboxi-filocactina/isofilocactina propuesta para el compuesto 22b.	104
Figura 66.	Perfiles cromatográficos a 480 nm y a 538 nm de la fracción amarilla FBX.	105
Figura 67.	Espectros de absorción de los compuestos mayoritarios (5 y 6) en la fracción amarilla FBX.	106
Figura 68.	Estructura de la arginina-bx y vulgaxantina I propuestas para los compuestos principales (5 y 6) en la fracción amarilla FBX.	107
Figura 69.	Espectro de masas $[M + H]^+$ del compuesto 1.	107
Figura 70.	Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos 7 y 8.	108
Figura 71.	Espectros de absorción de los compuestos 7 y 8.	108

Figura 72.	Estructura de la alanina-bx y prolina-bx propuestas para los compuestos 7 y 8.	108
Figura 73.	Perfiles cromatográficos a 538 y 480 nm de la fracción intermedia FI.	109
Figura 74.	Espectros de absorción de los compuestos en el perfil a 480 nm de la fracción intermedia FI.	110
Figura 75.	Espectro de masas $[M - H]^-$ del compuesto 18.	111
Figura 76.	Estructura de la neobetanina propuesta para el compuesto 18.	111
Figura 77.	Comparación del perfil cromatográfico a 480 nm de la fracción intermedia (FI) con el perfil a 480 del extracto de remolacha (ER).	112
Figura 78.	Estructura de la Leucina-bx y y fenilalanina-bx propuestas para los compuestos 22a y 24a.	112
Figura 79.	Comparación de los perfiles cromatográficos a 480 nm y a 538 nm del extracto purificado EP y las tres fracciones (FBX, RI y FBC).	114
Figura 80.	Curva de calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales.	117
Figura 81.	Diagrama de barras del contenido fenólico (<i>mg AG/g Muestra</i>) de extractos y fracciones obtenidos a partir de <i>Ullucus tuberosus</i> .	119
Figura 82.	Espectro de absorción del catión radical ABTS ^{•+} .	120
Figura 83.	Curva de calibración con trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).	121
Figura 84.	Diagrama de barras de valores de TEAC (<i>μmol trolox/ g Ant</i>) de extractos y fracciones obtenidos a partir de <i>Ullucus tuberosus</i> .	122
Figura 85.	Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante frente al Trolox.	123
Figura 86.	Espectro de absorción del catión DPPH [•] .	123
Figura 87.	Curva de calibrado del método DPPH.	124

Figura 88.	Curvas de calibrado para ácido gálico, extractos y fracciones de ulluco.	126
Figura 89.	Diagrama de barras de valores de EC_{50} (g Antioxidante/g DPPH) de extractos y fracciones obtenidos a partir de <i>Ullucus tuberosus</i> .	128
Figura 90.	Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante frente al DPPH.	128

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Muestra de ulluco a la cual se le determinó el pH.	149
Anexo B. Determinación de firmeza en el ulluco.	149
Anexo C. Coloración azul característica de la reacción del Método de Folin.	149
Anexo D. Coloración azul-verdosa característica del radical ABTS ^{•+} .	149
Anexo E. Coloración violeta característica del radical DPPH [•] .	150
Anexo F. Tabla de porcentaje de áreas y altura de los picos cromatográficos señalados en la fracción FBC.	150
Anexo G. Cromatogramas del extracto purificado (EP) por HPLC-MS a diferentes longitudes de onda.	150
Anexo H. Cromatogramas del extracto de remolacha (ER) por HPLC-PDA y algunos espectros de masas.	151
Anexo I. Cromatograma a 280 nm de la fracción amarilla (FBX) por HPLC-PDA.	153
Anexo J. Tabla de porcentaje de áreas y altura de los picos cromatográficos señalados en la fracción FBX.	153
Anexo K. Cromatogramas a 480 nm de la extracto de remolacha (ER) y ulluco (EP).	153
Anexo L. Verificación de varianza de los datos de la curva de calibrado para determinar el contenido fenólico.	154
Anexo M. Ecuación de la desviación estándar del estimado S_{x_0}	154
Anexo N. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones (EC, EP, FBC, FI y FBX).	154
Anexo O. Verificación de varianza de los datos de la curva de calibrado para determinar la actividad antioxidante equivalente al Trolox.	155

Anexo P.	Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) en los extractos y fracciones (EC, EP, FBC, FI y FBX).	155
Anexo Q.	Verificación de varianza de los datos de la curva de calibrado del método DPPH.	155
Anexo R.	Prueba de Múltiple Rangos para los valores EC_{50} de los extractos y fracciones (EC, EP, FBC, FI y FBX).	156

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
$A_{m\acute{a}x}$	Absorbancia máxima
ABTS	cido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
AG	cido gálico
a	Ordenada en el origen de la recta de regresión
BC	Betacianinas
BX	Betaxantinas
b	Pendiente de la recta de regresión
CC	Cromatografía de Columna
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EC_{50}	Concentración de antioxidante necesario para disminuir la concentración de DPPH' en un 50%.
FBC	Fracción rica en betacianinas
FBX	Fracción rica en betaxantinas
FI	Fracción intermedia
FM	Fase móvil
F-C	Folin-Ciocalteu
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas
HPLC-PDA	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a un Detector de Arreglo de Diodos
LC	Intervalos de confianza
n	Tamaño muestral
S	Desviación estándar de una muestra
S_a	Desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de regresión
S_b	Desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión
S_{x_0}	Desviación estándar del valor de x estimado utilizando la recta de regresión
ssp.	Subespecie
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox
TLC	Cromatografía de Capa Delgada
t_R	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
x_0	Valor de x estimado utilizando la recta de regresión
λ	Longitud de onda
$\lambda_{m\acute{a}x}$	Longitud de onda de máxima absorción

GLOSARIO

ACILO: grupo funcional derivado de un oxoácido, normalmente un ácido carboxílico, por eliminación de al menos un grupo hidroxilo. Tienen como fórmula general R-CO-.

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

ANTIOXIDANTE: sustancia que protege las células de los daños que causan los radicales libres.

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

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

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

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

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

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

DIVERSIFICACIÓN: práctica de variar productos, operaciones, etc, con el fin de distribuir el riesgo, ampliar, explotar la capacidad disponible, etc. Convertir en múltiple y diverso lo que era uniforme y único.

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

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

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

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

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

FITOQUÍMICO: sustancia química que se produce de forma natural en una planta, la cual puede ser biológicamente activa, pero no se consideran como un nutriente esencial.

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

HOMOCESTICIDAD: concepto estadístico que indica que la varianza de los errores en los datos es constante.

IN VITRO: que sucede o que tiene lugar en un tubo de ensayo, en un medio de cultivo o en otro ambiente artificial en el laboratorio.

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

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

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

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

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

TUBÉRCULO: parte de un tallo subterráneo, o de una raíz, que engruesa considerablemente, en cuyas células se acumula una gran cantidad de sustancias de reserva.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una creciente preocupación por el uso constante de colorantes sintéticos en la industria alimenticia, debido a sus comprobados efectos adversos en la salud humana. Diversas publicaciones indican que pueden causar hiperactividad en los niños, dermatitis e incluso algunos pueden ser carcinógenos^{1,2}. Es por esto, que la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) ha prohibido y excluido, a algunos de ellos, de la lista de aditivos aprobados para alimentos, especialmente a aquellos de color rojo y amarillo³. No obstante, la gran demanda de estos colores promueve la búsqueda de alternativas de reemplazo e incentiva la exploración de pigmentos hidrosolubles de origen natural, como por ejemplo las antocianinas o betalaínas, que a diferencia de los colorantes sintéticos, están asociadas con propiedades nutraceuticas⁴.

La investigación de las características fisicoquímicas de las betalaínas es de gran utilidad ya que además de tener una actividad antioxidante, asociada a la capacidad de reducir el riesgo de enfermedades degenerativas causadas por el estrés oxidativo⁵, entre las que se encuentra el cáncer, cataratas, arteriosclerosis, entre otras⁶; constituyen también una excelente alternativa como aditivo para alimentos, por mantenerse estables en un rango de pH comprendido entre 3 y 7, siendo esta la característica aplicativa más interesante, ya que las hace particularmente adecuadas para su adición en una amplia variedad de productos alimenticios neutros o de baja acidez, lo cual representa una ventaja frente a las antocianinas inestables a valores de pH superiores a 3. Adicionalmente, son más solubles en agua y presentan diversidad de tonalidades (rojizas y amarillas) con una alta capacidad tintórea hasta tres veces mayor que las antocianinas⁷.

¹ SHARMA, Vinita; MCKONE, Harold T. y MARKOW, Peter G. Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic Food Dyes. En: Journal of Chemical Education, 2011. vol. 88, no. 1, p. 24-28.

² STEVENS, Laura J., *et al.* Mechanisms of behavioral, atopic, and other reactions to artificial food colors in children. En: Nutrition reviews, 2013. vol. 71, no. 5, p. 268-281.

³ FDA. Food Additive Status List [en línea]. Estados Unidos: Department of Health and Human Services U.S. Actualizado 16 de diciembre de 2014 [citado 12 de enero 2016]. Disponible en < <http://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditiveinventories/ucm106626.htm>>

⁴ DOWNHAM, Alison y COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. En: International Journal of Food Science and Technology, 1999. vol. 35, p. 5-22.

⁵ STRACK, Dieter; VOGT, Thomas y SCHLIEMANN, Willibald. Recent advances in betalain research. En: Phytochemistry, 2003. vol. 62, no. 3, p. 247-269.

⁶ POLJSK, Borut; ŠUPUT, Dušan y MILISAV, Irina. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. En: Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013. vol. 2013, p. 1.

⁷ STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Betalains—emerging prospects for food scientists. En: Trends in Food Science & Technology, 2007. vol. 18, no. 10, p. 514-525.

Las investigaciones publicadas en este campo enfocan la atención, principalmente, en el extracto de la remolacha roja que es mundialmente utilizado como colorante rojo alimenticio E-162 y como un colorante natural en cosméticos y medicamentos⁸. No obstante, debido a su característico sabor residual que imparte la presencia de geosmina en este tipo de extractos, su aplicación está limitada, por ejemplo al agregarla en alimentos lácteos⁹. Este hecho, ha conllevado a explorar productos que estén libres de geosminas especialmente algunas flores de Amaranteaceas y los frutos de algunas especies de Cactáceas (tunas y pitahayas) que de acuerdo a algunos autores tienen mejores propiedades organolépticas¹⁰. Sin embargo, el mercado actual del color exige un alto grado de diversificación¹¹, por lo tanto es de gran interés dedicar esfuerzos investigativos en la búsqueda de nuevas fuentes que contengan este tipo de pigmentos. En este ámbito, el Departamento de Nariño nos ofrece una gran biodiversidad de materias primas que pueden ser fuentes de betalaínas, como es el caso del ulluco (*Ullucus tuberosus*), una planta que se cultiva en la vereda Cruz de Amarillo, que crece sobre los 2800 msnm, perteneciente a la familia Basellaceae y que podría ser potencialmente utilizado como colorante a nivel industrial.

Las betalaínas del *Ullucus tuberosus* solamente se han estudiado en Perú y Nueva Zelanda. La presencia de estos pigmentos y su capacidad antioxidante hidrofílica no fue reportada sino hasta el año 2006 en algunas variedades peruanas, principalmente de color amarillo¹². Por otro lado, al investigar variedades de ulluco introducidas en Nueva Zelanda¹³ se reportaron por primera vez tanto las betacianinas como las betaxantinas presentes en una planta de la familia *Basellaceae*. Sin embargo, sobre el ulluco “chincheño”, motivo de esta investigación, no se reportan estudios de la identificación de sus pigmentos ni de su actividad antioxidante.

En el presente trabajo se pudo generar información fundamental no sólo respecto a la composición de las betalaínas aisladas de la cáscara del ulluco “chincheño”, cultivado en la Cruz de Amarillo, sino también a la actividad antiradical *in vitro* de este tipo de extractos. Los resultados demostraron que el extracto puede ser una fuente de pigmentos bioactivos hidrosolubles de tonalidades principalmente rojas y amarillas (además de la gama que podría resultar de sus combinaciones) que son de alta

⁸ KAPADIA Govind J. y SUBBA RAO G. Anticancer Effects of Red Beet Pigments. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 125.

⁹ LU, Guiping, *et al.* Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.). En: Journal of agricultural and food chemistry, 2003. vol. 51, no. 4, p. 1026-1029.

¹⁰ AZEREDO, Henriette. Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. En: International Journal of Food Science & Technology, 2009. vol. 44, no. 12, p. 2367.

¹¹ STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit., p. 522.

¹² CAMPOS, David, *et al.* Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. vol. 86. p. 1481–1488.

¹³ SVENSON, Johan, *et al.* Betalains in Red and Yellow Varieties of the Andean Tuber Crop Ulluco (*Ullucus tuberosus*). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. vol. 56. p. 7731.

demanda en la industria colorante, lo que representa una gran ventaja frente a otras fuentes alimenticias donde solamente logran aislar una tonalidad. La información generada en el presente estudio puede utilizarse para promover o incentivar futuras investigaciones tanto en el ulluco como en matrices vegetales con contenido betalaínico con potencial para ser usado como colorante industrial, lo que a su vez contribuiría al desarrollo económico de la región.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición y actividad antioxidante *in vitro* de las betalaínas de la cáscara del Ulluco (*Ullucus tuberosus*) de color rojo-magenta cultivado en el Departamento de Nariño.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Extraer y purificar las betalaínas mayoritarias de la cáscara del Ulluco (*Ullucus tuberosus*) mediante la extracción con solvente y técnicas cromatográficas.

Identificar las betalaínas mayoritarias del Ulluco (*Ullucus tuberosus*) mediante el uso de técnicas como la espectroscopia UV-Vis y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

Establecer la capacidad antioxidante de los extractos de betalaínas a nivel *in vitro* mediante los ensayos TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 TUBÉRCULOS EN LA REGIÓN ANDINA

La región Andina se ha caracterizado por el cultivo de una gran diversidad de granos, frutas, vegetales, raíces, y tubérculos¹⁴, siendo estos últimos de especial importancia debido a que su utilización para uso alimenticio ha sido mayor en Los Andes que en ningún otro lugar del mundo; tanto así, que se conoce como centro de origen de los cuatro únicos cultivos que producen tubérculos: la papa (*Solanum tuberosum*), el ulluco (*Ullucus tuberosus*), la oca (*Oxalis tuberosa*) y la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)¹⁵. Todos ellos pertenecen a familias botánicas distintas y presentan variedades que se caracterizan por sus múltiples tamaños, formas, y colores¹⁶, que se aprecian en la figura 1.

Figura 1. Tubérculos Andinos.



*De izquierda a derecha: Papa, Ulluco, Oca y Mashua. Fuente: Imágenes tomadas de VALLADOLID (2010) y “Common Varieties and Uses for Potatoes” (2010).

En cuanto a su morfología externa, los tubérculos de papa se reconocen fácilmente por su forma generalmente comprimida, redondeada u ovalada¹⁷. Por su parte, el ulluco se distingue por su superficie lisa y la ocasional pigmentación moteada de su cáscara. Mientras que para diferenciar a primera vista la oca y la mashua se requiere algo de

¹⁴ JACOBSEN, Sven Erik; MUJICA, Ángel y ORTIZ, Rene. La Importancia de los Cultivos Andinos. En: Fermentum, 2003. vol. 13, no. 36, p. 14.

¹⁵ SURCO LAOS, Felipe Artemio. Caracterización de almidones aislados de tubérculos andinos: mashua (*Tropaeolum tuberosum*), oca (*Oxalis tuberosa*), ulluco (*Ullucus tuberosus*) para su aplicación tecnológica. Tesis de Magister en Ciencias de los Alimentos. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2004. p. 9.

¹⁶ TAPIA, Mario E. y FRIES, Ana M. Guía de campo de los cultivos andinos. Lima: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Asociación Nacional de los Productores Ecológicos (ANPE), 2007. p. 25, 43, 48, 51.

¹⁷ GÓMEZ, Rene. Guía para las Caracterizaciones Morfológicas Básicas en Colecciones de Papas Nativas. En: Manual para caracterización In situ de cultivos nativos. Lima, Perú: Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA), 2006. p. 26–50.

práctica ya que ambos tubérculos se caracterizan por tener yemas u “ojos” bastante hundidos, pero la forma de la mashua es cónica y los ojos están mayormente concentrados cerca del ápice (punta del tubérculo)¹⁸. Estos también pueden distinguirse por la presencia de sustancias mucilaginosas, que si bien están presentes en las últimas tres especies, resultan mucho más abundantes en *Ullucus*. Los oxalatos predominan en *Oxalis* y la mirosina caracteriza a *Tropaeolum*¹⁹.

La existencia de estas especies autóctonas se reporta desde aproximadamente el año 8000 a.C.²⁰, las cuales se distribuyeron ampliamente a lo largo de los Andes (Argentina, Chile, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela), llegando así a adquirir muchos nombres vernáculos o comunes^{21,22} que se han anotado en la tabla 1. Solamente la papa (*Solanum tuberosum*) que pertenece a la familia Solanaceae ha conservado su nombre común en la mayoría de regiones²³.

Tabla 1. Nombres comunes de tubérculos en algunos países de la región Andina

Nombre científico	Familia	Nombres comunes	
		Colombia	Otros países
<i>Oxalis tuberosa</i> Molina	Oxalidaceae	Oca, ibia	Ecuador: Oca Perú: Oca, apilla Bolivia: Oca, apilla
<i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruíz & Pavón	Tropeolaceae	Cubio, nabo, mashua	Ecuador: Mashwa, mashua Perú: Isaño, año, mashwa, maswallo, mazuko, mascho Bolivia: Isaño, año
<i>Ullucus tuberosus</i> Caldas	Basellaceae	Olluco, ulluco rubas, chugua chigua, hubas, tiguíño, timbo, camarones de tierra	Ecuador: Melloco, olluco, melluco, milluco Perú: olluco, ulluco, lisa, papalisa Bolivia: Papa lisa, lisa, olluco, ulluku Venezuela: michurui, michuri, miguri, micuche, ruba, rubia, timbo, tiquiño Argentina: olloco, ulluca, ulluma

Fuente: Adaptado de CLAVIJO (2014), SUQUILANDA (2012) y SURCO LAOS (2004).

¹⁸ HERMANN, Michael. Raíces y tubérculos andinos: Prioridades de investigación para un recurso alimentario pospuesto. Lima: Centro internacional de la papa (CIP), 1992. p. 2.

¹⁹ MELCHIORRE, P. Identificación de tubérculos andinos (*Oxalis tuberosa*, *Ullucus tuberosus* y *Tropaeobim tuberosum*) mediante caracteres anatómicos y exomorfológicos. *En*: Revista de la Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires, 1985. vol. 6, no. 3. p. 141-153.

²⁰ CLAVIJO, Neidy, BARÓN, María y COMBARIZA, Juliana. Tubérculos Andinos: Conservación y uso desde una perspectiva agroecológica. 1 ed. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2014. p. 19-20.

²¹ SUQUILANDA, Manuel. Producción Orgánica de Cultivos Andinos (Manual Técnico). Ecuador: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Unión de Organizaciones Campesinas del Norte del Cotopaxi (UNOCANC) y Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2012. p. 34

²² SURCO LAOS. Op. cit., p. 12.

²³ TAPIA y FRIES. Op. cit., p. 24.

Estos tubérculos se siembran en altitudes que van aproximadamente desde los 1000 hasta los 4200 msnm²⁴, siguiendo los sistemas tradicionales de cultivo asociado debido a que comparten condiciones ambientales similares²⁵. Se han distinguido por su capacidad de adaptación a entornos marginales como climas fríos, días más cortos, temperaturas extremas a diario y escasas precipitaciones. Poseen una extraordinaria tolerancia a las enfermedades y plagas, y se pueden cultivar sin extensos insumos (pesticidas, fertilizantes o agroquímicos)^{26,27}. Además, se han caracterizado por su alto contenido de almidones (carbohidratos) convirtiéndolos en una fuente importante de energía, y también por la presencia de minerales (Calcio, Fósforo, Hierro), vitaminas (A, B1, B2, C, Niacina) y otros metabolitos secundarios (polifenoles, carotenoides, antocianinas, betalainas) que aportan a su perfil antioxidante haciéndolos ideales para la salud y la nutrición. El reconocimiento y el uso de estas propiedades medicinales y nutritivas, por parte de las comunidades precolombinas en la región andina, se ha llevado a cabo desde tiempos muy antiguos^{28,29}.

Sin embargo, su importancia a nivel mundial se ha visto afectada debido a que en la época de la conquista los cultivos que sostenían las civilizaciones andinas recibieron poca atención y perdieron importancia, hasta el punto de ser estigmatizados como comida para campesinos o indios, quienes para la época eran considerados como la clase social más baja³⁰. Con el tiempo, solamente la papa adquirió relevancia hasta llegarse a considerar el cuarto cultivo más importante del mundo después del arroz, el trigo y el maíz³¹; mientras que los otros tres (ulluco, oca y mashua), conocidos como el trío andino de tubérculos alimenticios³², permanecieron relegados llegando a ubicarse dentro de las especies infrautilizadas o cultivos de producción marginal³³ que se consumen e intercambian básicamente sólo a nivel de las familias campesinas y no se consideran cultivos principales en su agricultura, lo cual ha conllevado a la pérdida de algunas variedades³⁴.

²⁴ TAPIA y FRIES. Op. cit., p. 24.

²⁵ HERMANN. Op. cit., p. 2.

²⁶ RUEDA, José Luis. Guía para nueve raíces y tubérculos andinos. Perú: Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN), 1997. p. 2.

²⁷ CARRASCO, Enrique, *et al.* Los Tubérculos Andinos: Tesoro de los Andes. En: ALFARO DENUS, Gonzalo y SALAS, Sonia (Eds.). Alimentos del Mundo Andino: Ciclo de Conferencias sobre Alimentos Andinos. Lima, Perú: Universidad Mayor de San Simón, Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN) y el Centro Internacional de la Papa (CIP), 1997. p. 45.

²⁸ AYALA, Guido. Aportes de los cultivos andinos a la nutrición humana. En: Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y la capacitación. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004. p. 108-109.

²⁹ ROCA, William M., *et al.* Indigenous Andean root and tuber crops: New foods for the new millennium. En: *Chronica Horticulturae*, 2007. vol. 47, no. 4, p. 13-19.

³⁰ CLAVIJO, BARÓN y COMBARIZA. Op. cit., p. 20.

³¹ CARRASCO, *et al.* Op. cit., p. 39.

³² SURCO LAOS. Op. cit., p. 14.

³³ CLAVIJO, BARÓN y COMBARIZA. Op. cit., p. 11.

³⁴ ALFARO DENUS, Gonzalo. El Mundo Andino. y sus Alimentos. En: ALFARO DENUS, Gonzalo y SALAS, Sonia (Eds.). Alimentos del Mundo Andino: Ciclo de Conferencias sobre Alimentos Andinos. Lima, Perú: Universidad Mayor de San Simón, Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN) y el Centro Internacional de la Papa (CIP), 1997. p. 7.

El trio andino de tubérculos ha sido mucho menos estudiado en comparación a la papa. A pesar de esto, en las últimas décadas se ha evidenciado un interés renovado en estos cultivos³⁵ y un esfuerzo constante por abordar investigaciones no solo enfocadas en su conservación sino también en aprovechar sus propiedades y composición para usos alternativos potenciales³⁶. La oca tiene amplia posibilidad de transformación en harinas, obtención de oxalatos, y mermeladas. La mashua tiene un elevado potencial de rendimiento asociado al alto contenido de glucosinolatos, que le da un lugar preferencial para su utilización en la agroindustria, se consume en forma de helado en postres y también es posible obtener harina a partir de este tubérculo. Por su parte, el ulluco tiene varios aspectos en los que falta incursionar: sus hojas pueden ser usadas en la alimentación, tanto frescas como secas y encurtidas; el uso de su contenido de mucílagos; la elaboración de sopas instantáneas y la obtención de harinas. Otra característica que aún no se ha utilizado comercialmente son los colorantes o pigmentos de algunos genotipos, que pueden utilizarse en la elaboración de productos alimenticios, entre otros³⁷. Es por esta última razón que el ulluco ha llamado la atención como matriz de este estudio y sus características se detallan a continuación.

2.2 ULLUCO (*Ullucus tuberosus*)

2.2.1 Origen

El ulluco es una planta milenaria y endémica de la región Andina, probablemente su cultivo fue extendido desde los Andes de Venezuela (10° lat. N) hasta el noroeste argentino y noreste chileno (25° lat. S) en épocas prehispánicas. No se conoce el país exacto de su origen; sin embargo, el vestigio más antiguo es la presencia de almidón entre los restos vegetales de hace 4000 años en la costa del Perú³⁸. Por otra parte, se reporta que los tipos de ulluco colombiano son los más primitivos³⁹. Su amplia distribución y antigüedad se evidencian en la profusión de denominaciones regionales (ver tabla 1).

2.2.2 Descripción de la planta

2.2.2.1 *Taxonomía*. El ulluco es la planta más importante del género *Ullucus* y probablemente también de la familia Basellaceae a la que pertenece. El género *Ullucus* tiene una sola especie, el *Ullucus tuberosus* Caldas o Loz, que a su vez reporta dos subespecies: *aborigineus* y *tuberosus*. Dentro de la ssp. *aborigineus* están incluidos

³⁵ TAPIA y FRIES. Op. cit., p. 1.

³⁶ CADIMA, Ximena, ZEBALLOS, José y FORONDA, Edson. Catálogo de papalisa. Bolivia: Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA) e Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), 2010. p. 8.

³⁷ JACOBSEN, MUJICA y ORTIZ. Op. cit., p. 21-22.

³⁸ ARBIZU, C. y TAPIA, M. Andean tubers. En: HERNÁNDEZ BERMEJO, J.E. y LEÓN, J. (Eds.). Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1994. p. 159.

³⁹ CLAVIJO, BARÓN y COMBARIZA. Op. cit., p. 33.

todos los ullucos silvestres amargos y no comestibles asociados a plantas espinosas y rastreras, con longitud de tallo de 1 m o más, con pocas ramas, en suelos sueltos, húmidos y de buen drenaje, o en ambientes rocosos de difícil acceso, formando tubérculos de 0.5 a 1.0 cm de diámetro, de colores rosados, rojos, marrón oscuros y a veces blancos. Por su parte, en la ssp. *tuberosus* están incluidas decenas de ullucos cultivados y consumibles asociados a plantas de hábito erecto o rastrero, con tallos que alcanzan hasta 80 cm de altura y generalmente con ramas basales que producen estolones aéreos, capaces de formar tubérculos con diversas características morfológicas (múltiples formas y hasta 12 colores). La identificación taxonómica del ulluco^{40,41} se muestra a continuación.

División: Espermatofita
Subdivisión: Angiospermas
Clase: Dicotiledoneas
Orden: Centrospermas (también conocido como Caryophyllales⁴²)
Suborden: Portulacineas
Familia: Basellaceae
Género: *Ullucus*
Especie: *tuberosus*
Subespecies: *U. tuberosus. aborigeneus* y *U. tuberosus. tuberosus*

2.2.2.2 *Morfología.* Las variedades cultivadas de ulluco pueden identificarse visualmente a través de los descriptores del ulluco⁴³ (características visuales de la planta y de los tubérculos). La planta del ulluco es herbácea y su follaje es mucilaginoso y compacto con hábitos de crecimiento erecto, rastrero y semirastrero. Las demás partes de esta planta se muestran en la figura 2 y se describen en seguida^{44,45,46,47}:

➤ Tallos: Los tallos aéreos del ulluco son erectos en plantas tiernas y posteriormente rastreros. Su altura varía de 30 a 80 cm. Son aristados y carnosos. Generalmente son de un color verde intenso, también los hay rosados o púrpuras según la variedad. Los

⁴⁰ ARBIZU, Carlos. Clasificación y Morfología. En: LÓPEZ, Glicerio y HERMANN, Michael (Eds.). El cultivo del ulluco en la sierra central del Perú. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 3. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional del Centro, Instituto Vida en los Andes, Universidad Nacional Agraria La Molina, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), 2004. p. 5-6.

⁴¹ VIMOS, Carlos; NIETO, Carlos y RIVERA, Marco. El melloco. Características, técnicas de cultivo y potencial en el Ecuador. Publicación miscelánea No. 60. Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 1993. p. 2.

⁴² BEHNKE, H.-D. y MABRY, T.J. (Eds.). Caryophyllales: evolution and systematics. 1ed. Berlin: Springer-Verlag, 2012. p. 11.

⁴³ IPGRI/CIP. Descriptores del Ulluco (*Ullucus tuberosus*). Roma, Italia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP), 2003. 42 p.

⁴⁴ ARBIZU. Op. cit., p. 10.

⁴⁵ TAPIA, Mario E. Agricultura Andina. Avances en las investigaciones sobre tubérculos alimenticios de los Andes. Perú: Proyecto Investigación de los Sistemas Agrícolas Andinos (PISCA), 1987. p. 13.

⁴⁶ VIMOS, NIETO y RIVERA. Op. cit., p. 3.

⁴⁷ RUEDA. Op. cit., p. 4.

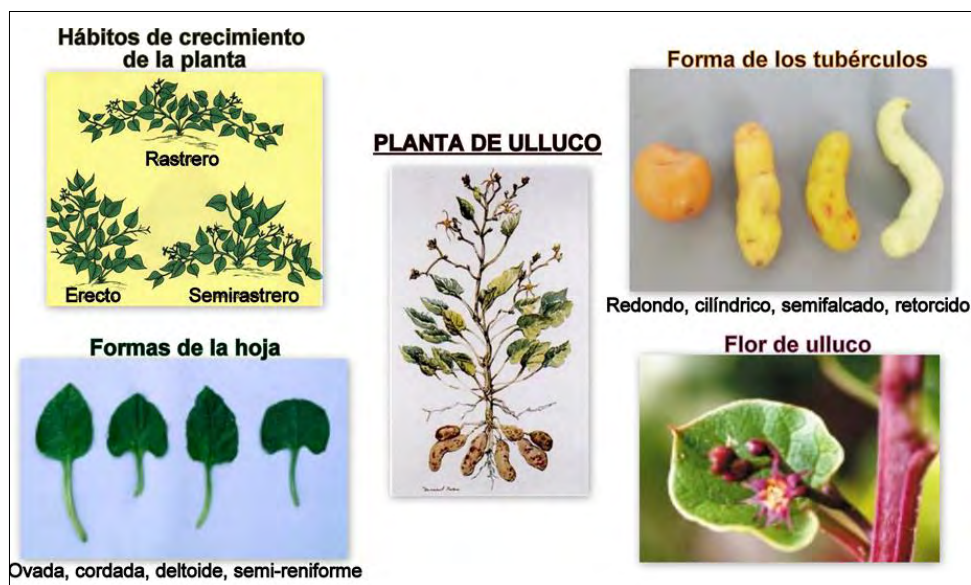
tallos en las formas colombianas son además rojizos, mientras que en las selectas de bolivianos hay completamente verdes.

➤ Hojas: Son carnosas de color verde oscuro en el haz y más claro y a veces pigmentado de púrpura en el envés. Su tamaño varía de 4 a 8 cm de largo por 4 a 7 cm de ancho y presenta diferentes formas ovada, cordada, deltoide, semi-reniforme.

➤ Flores: Tienen forma de estrella y el color de sus pétalos puede variar entre verde-amarillentos y púrpura-rojizo, pero son relativamente de difícil observación porque casi siempre están cubiertas por el follaje.

➤ Tubérculos: Pueden medir de 1 a 6 cm de diámetro. Son redondos, cilíndricos, semi-falcados o retorcidos, y de una infinidad de formas intermedias. Todos son de superficie lisa brillante, con ojos o yemas poco profundas, de hasta doce colores que van desde el blanco-amarillento hasta el púrpura-rojizo pasando por una gran gama de tonalidades intermedias como el verde-amarillento, amarillo, amarillo-oscuro, amarillo-grisáceo, amarillo-anaranjado, naranja-pálido, naranja, naranja-rojizo, rojo-claro o rosado, y rojo; ya sea en colores enteros (cerca del 75 % de los cultivares) o combinados con pigmentaciones en forma de puntos o manchas.

Figura 2. Planta de ulluco y sus diferentes partes.

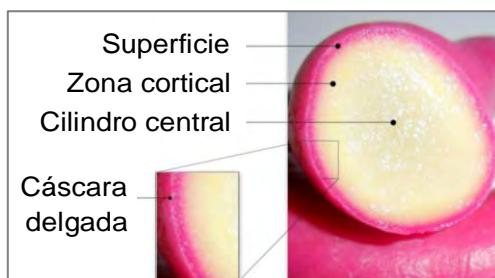


Fuente: Imágenes tomadas de RUEDA (1997), VIMOS (1993) y ARBIZU (2004)

En un corte transversal de un ejemplar de ulluco se distinguen las siguientes partes: la superficie, la zona cortical y el cilindro central con mucho mucílago; además de una delgada cáscara que lo protege de factores externos, como se observa en la figura 3. Tanto la zona cortical como el cilindro central generalmente presentan colores variados, principalmente el amarillo, verde-amarillento y blanco-amarillento y en menor proporción se encuentran colores como naranja, naranja-rojizo y rojo-claro o rosado⁴⁸.

⁴⁸ ARBIZU. Op. cit., p. 10.

Figura 3. Partes del tubérculo de ulluco.



*El ejemplar de la fotografía corresponde a la variedad de ulluco estudiada (ulluco "chicheño"). Fuente: Esta investigación.

2.2.3 Características del cultivo y distribución en Colombia

El *U. tuberosus* se desarrolla adecuadamente en un clima fresco y húmedo, a temperaturas entre los 8 y 14 °C y precipitación anual de 600 a 1.400 mm, pero, fuera de estos límites se ve afectado el crecimiento y la tuberización. El cultivo es tolerante a las heladas, posiblemente, debido a su particular hábito de crecimiento; plantas pequeñas y compactas que lo protegen⁴⁹. La cosecha del ulluco se realiza manualmente cuando las plantas han alcanzado su madurez fisiológica. Esto ocurre entre los 160 y 260 días después de la siembra, cuando se observa el envejecimiento general de follaje (amarillamiento generalizado). Más allá de este periodo el ulluco adquiere una apariencia escamosa, producto de la deshidratación del tubérculo⁵⁰. Además, la cosecha debe ser oportuna para evitar que los tubérculos expuestos tomen una coloración verde o negra, por efecto de los rayos solares⁵¹. En general, la luz puede alterar el color de la superficie de los tubérculos. Así, los ullucos amarillos o los anaranjados se tornan verde-oscuros y no son aptos para el consumo, mientras que los de tonalidades rojizas son difícilmente afectados por la luz.

Los ullucos de colores enteros más vivos en magenta o púrpura, pardo (amarillo-grisáceo) y verde, de tamaño mediano o pequeño se cultivan en Colombia, siendo los clones más corrientes aquellos de color rojo-púrpura y forma alargada, que se conocen como "chicheño" y tienen mucha demanda en el sur del país, donde se dice que es la variedad predilecta⁵². Los tubérculos de color verde claro y los amarillo moteado con manchas púrpuras son los más comunes y apreciados en Bolivia y Perú. En Ecuador predominan los de coloración amarilla y rosada^{53,54}.

⁴⁹ SUQUILANDA. Op. cit., p. 36.

⁵⁰ CLAVIJO, BARÓN y COMBARIZA. Op. cit., p. 37.

⁵¹ SUQUILANDA. Op. cit., p. 43.

⁵² BARRERA, Víctor, *et al.* Caracterización de las Raíces y los Tubérculos Andinos en la Ecoregión Andina del Ecuador (Capítulo 1). En: BARRERA, Víctor; TAPIA, César y MONTEROS, Alvaro (Eds.). Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 4. Quito, Ecuador – Lima, Perú: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa (CIP), Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), 2004. p. 11.

⁵³ SURCO LAOS. Op. cit., p. 13.

En Colombia, el cultivo de ulluco tiene una importancia menor en términos de consumo y áreas de crecimiento con respecto a Ecuador, Perú y Bolivia. Se cultiva en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca (en el noreste de los Andes colombianos) y Cauca y Nariño (en el suroeste de los Andes colombianos), a una altura entre 2.500 y 3.300 msnm⁵⁵. También se puede encontrar en algunos lugares del Huila (Moscopán y Santa Leticia) sobre los 2230 msnm⁵⁶. Parra *et al*⁵⁷ encontraron que en Colombia, el ulluco muestra una notable diversidad morfológica.

2.2.4 Valor nutricional y composición química

El ulluco es apreciado por los nativos andinos porque se considera como un producto desinflamante utilizado en emplastos para facilitar los partos, curar traumatismos internos y rebajar hinchazones del cuerpo⁵⁸. Además, son una fuente importante de hidratos de carbono y proteínas para las poblaciones locales que viven en zonas de alta montaña. Los tubérculos frescos tienen alrededor de 85% de humedad, 14% de almidones y carbohidratos (azúcares) y entre el 1-2% de proteínas; generalmente tienen alto contenido de vitamina C⁵⁹ y en menor proporción vitamina A y B1. Dentro de los minerales, varios autores resaltan los contenidos de fósforo, lo que sería una ventaja muy particular en la alimentación humana⁶⁰.

Una de las características típicas del tubérculo de ulluco es el contenido de mucílago⁶¹, que es un metabolito secundario de textura viscosa formado por compuestos de alto peso molecular, principalmente polisacáridos⁶². La presencia del mucílago en el ulluco le atribuye características benéficas para el tratamiento de problemas gástricos similar al efecto de otros vegetales mucilaginosos como la sábila o la linaza⁶³; aunque el mismo que puede ser una limitante para el consumo. Sin embargo, en el Programa de Cultivos Andinos del INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) del Ecuador, se han identificado varios clones de bajo contenido de

⁵⁴ SALAS DOMÍNGUEZ, Sonia. Avances en la Investigación en Posproducción de Alimentos Andinos en el Marco de Condesan. Lima, Perú: Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN) y Centro Internacional de la Papa (CIP), 1998. p. 6.

⁵⁵ URIBE CALAD, Alvaro Francisco. Principales avances en investigación y desarrollo tecnológico por sistemas de producción agrícola. Corpoica cinco años. Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, 1998. p. 446.

⁵⁶ CARRASCO, *et al.* Op. cit., p. 35.

⁵⁷ PARRA-QUIJANO, Mauricio, *et al.* Diversity of *Ullucus tuberosus* (Basellaceae) in the Colombian Andes and notes on ulluco domestication based on morphological and molecular data. *En*: Genetic resources and crop evolution, 2012. vol. 59, no. 1, p. 49-66.

⁵⁸ SUQUILANDA. Op. cit., p. 36.

⁵⁹ BARRERA. Op. cit., p. 4.

⁶⁰ SUQUILANDA. Op. cit., p. 34.

⁶¹ *Ibíd.*, p. 34.

⁶² WATANABE, Toshihiro, *et al.* Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *En*: New Phytologist, 2008. vol. 178, no. 3, p. 581.

⁶³ ESPÍN, Susana; VILLACRÉS, Elena y BRITO, Beatriz. Caracterización Físico-Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos (Capítulo 4). *En*: BARRERA, Víctor; TAPIA, César y MONTEROS, Alvaro (Eds.). Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 4. Quito, Ecuador – Lima, Perú: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa (CIP), Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), 2004. p. 108.

mucílago los que podrían ser una alternativa de producción para fomentar el consumo⁶⁴. El ulluco también se caracteriza por la abundante presencia de otros metabolitos secundarios como flavonoides y compuestos fenólicos⁶⁵. Su delgada cáscara es rica en polifenoles. También, por la presencia de saponinas en los tubérculos de color rojo⁶⁶. Otra característica evidente a la vista es su coloración la cual se debe a la presencia de un tipo de pigmentos naturales conocidos como betalaínas⁶⁷.

2.3 PIGMENTOS NATURALES

En general, los pigmentos naturales se consideran metabolitos secundarios, que a diferencia de los primarios (carbohidratos, polisacáridos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, ADN y el ARN) no son necesarios para la supervivencia de los organismos. Sin embargo, esta clasificación es menos evidente en el caso de los pigmentos tales como carotenoides y clorofilas, que están implicados en la fotoprotección y fotosíntesis, procesos esenciales para la supervivencia del organismo. En otros casos, están involucrados en el camuflaje (mecanismo de protección de los anfibios) y en el proceso de reproducción⁶⁸.

También, una gran cantidad de ellos tienen una actividad farmacológica en enfermedades cardiovasculares y el cáncer; razones por las cuales se hace hincapié en la importancia de los pigmentos en la alimentación de los seres humanos⁶⁹. Entre los principales pigmentos naturales que imparten coloración a los alimentos, particularmente a frutas y vegetales, se encuentran los siguientes cuatro grupos: clorofilas, carotenoides, antocianinas (flavonoides) y betalaínas^{70,71}. Los primeros son liposolubles mientras que los dos últimos son hidrosolubles⁷².

2.3.1 Clorofilas

Las clorofilas son los principales pigmentos verdes que contienen los organismos fotosintéticos, incluyendo las plantas verdes, algas y bacterias⁷³. La clorofila tiene un papel vital en el proceso de la fotosíntesis mediante el cual las plantas convierten el

⁶⁴ SUQUILANDA. Op. cit., p. 34-35.

⁶⁵ DINI, A., *et al.* Minor components in food plants-Note I. Flavonol glycosides from *Ullucus tuberosus*. En: Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale, 1991. vol. 67, no. 12, p. 1053-1058.

⁶⁶ SALAS DOMÍNGUEZ. Op. cit., p. 10-11.

⁶⁷ ROCA, *et al.* Op. cit., p. 18.

⁶⁸ DELGADO-VARGAS, Francisco y PAREDES-LÓPEZ, Octavio. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 28-29.

⁶⁹ DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R. y PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. En: Critical reviews in food science and nutrition, 2000. vol. 40, no. 3, p. 176.

⁷⁰ RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Natural food pigments and colorants. En: Current Opinion in Food Science, 2016. vol. 7, p. 20.

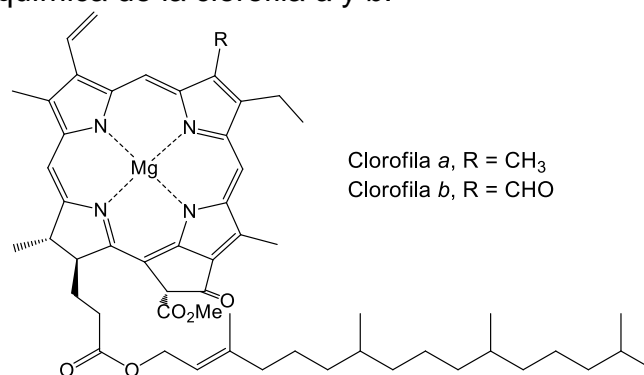
⁷¹ CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. vol. 51, no. 8, p. 2288.

⁷² DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 32.

⁷³ DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. y FENNEMA, Owen R. (Eds.). Fennema's food chemistry. 4 ed. Boca Raton: CRC press, 2007. p. 579.

agua, dióxido de carbono y luz solar en carbohidratos (energía química)⁷⁴. Las clorofilas son compuestos tetrapirrólicos similares a los pigmentos hemo en la carne. Están constituidos por un anillo de porfirina tetrapirrólico sustituido con un ion de magnesio coordinado en el medio y un grupo fitol de 20 carbonos monoinsaturado y esterificado que hace que estos compuestos sean parcialmente solubles en aceite, aunque el anillo de porfirina también le da a la molécula características polares. Varias clorofilas se encuentran en la naturaleza, las cuales difieren en los sustituyentes del anillo de porfirina, pero en las plantas verdes solamente hay dos variedades, las clorofilas *a* y *b*, que se encuentran en una proporción aproximada de 3:1. Las estructuras de las clorofilas *a* y *b* se diferencian sólo en un sustituyente y se muestran en la figura 4. Usualmente, las clorofilas presentan dos bandas de absorción en el espectro UV-Vis: una en la región roja entre 600 y 700 nm y la otra en la región azul entre 400 y 500 nm⁷⁵.

Figura 4. Estructura química de la clorofila *a* y *b*.



Fuente: Adaptado de KAIMAINEN (2014).

2.3.2 Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles, de color amarillo, naranja o rojo que se encuentran en la mayoría de las plantas superiores⁷⁶. Estructuralmente son compuestos constituidos por ocho unidades de isoprenoide que forman una cadena principal de 40 carbonos⁷⁷, cuyo orden se invierte en el centro de la molécula⁷⁸ (Figura 5). Los carotenoides que contribuyen significativamente a los colores de la planta incluyen tres formas de caroteno (α , β , y γ), licopeno y las xantofilas que contienen oxígeno. El β -caroteno y las xantofilas de color amarillo predominan en las hojas y otros tejidos fotosintéticos. El licopeno rojo se encuentra en el pimentón, tomate, sandía y algunas otras frutas. Las zanahorias contienen pequeñas cantidades de α -caroteno, pero la

⁷⁴ ALKEMA, J. y SEAGER, S.L. The chemical pigments of plants. En: Journal of Chemical Education, 1982. vol. 59, no. 3, p. 183.

⁷⁵ KAIMAINEN, Mika. Stability of Natural Colorants of Plant Origin. Tesis Doctoral en Ciencias de los Alimentos. Turquía: University of Turku. Food Chemistry and Food Development. Department of Biochemistry, 2014. p. 3.

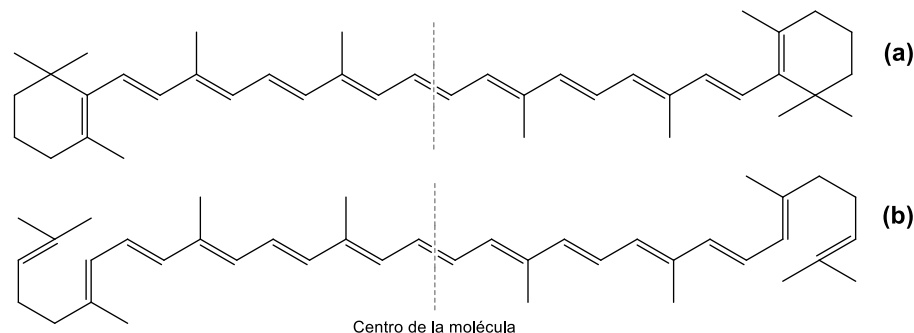
⁷⁶ MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. En: Pure and Applied Chemistry, 2006. vol. 78, no. 8, p. 1478.

⁷⁷ KAIMAINEN. Op. cit., p. 6.

⁷⁸ DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 197.

presencia de β -caroteno es muy abundante⁷⁹. Usualmente su espectro de absorción muestra tres bandas entre 300 y 500 nm, cuyos valores exactos de $\lambda_{\text{máx}}$ dependen de la naturaleza del doble enlace y del disolvente⁸⁰.

Figura 5. Estructura química de carotenoides (a) β -caroteno y (b) licopeno.



Fuente: Adaptado de KAIMAINEN (2014).

2.3.3 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular que comprenden colores como el amarillo, naranja, rojo, azul y violeta; además de compartir un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C, de manera que se pueden clasificar en: Flavanos, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C; flavonoles, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C; flavonas, con un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3 y en antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Las flavonas y flavonoles de color amarillo se encuentran en las hojas de algunas plantas; sin embargo, la mayor parte de sus contribuciones al color de la planta aparecen en los pétalos de las flores⁸¹. La figura 6 muestra algunas estructuras básicas de los diferentes tipos de flavonoides.

2.3.3.1 Antocianinas. Son los pigmentos hidrosolubles más importantes dentro de la familia de los flavonoides⁸² y responsables de los colores naranja brillante, rosa, rojo, azul y violeta en flores y frutas de algunas plantas. Su color está significativamente

⁷⁹ ALKEMA y SEAGER. Op. cit., p. 183-184.

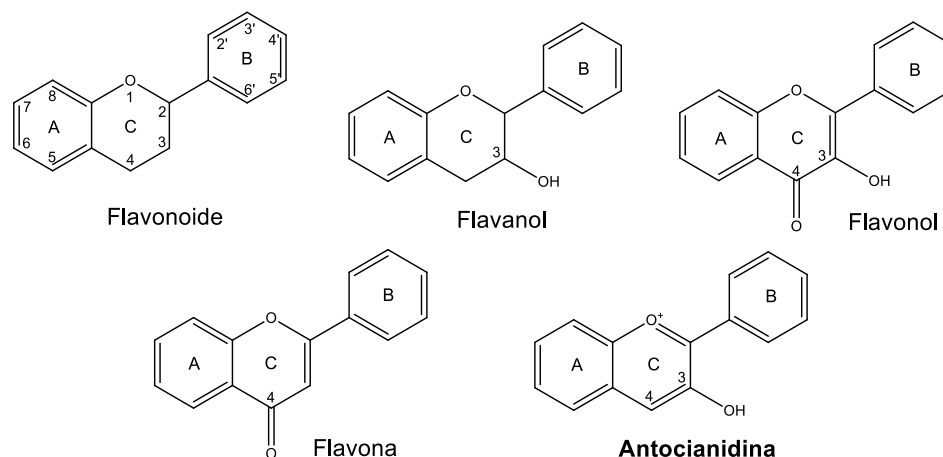
⁸⁰ EDER, Reinhard. Pigments. En: NOLLET, Leo M.L. (Ed.). Food analysis by HPLC. 2 ed. Nueva York: Marcel Dekker, Inc., 2012. p. 826.

⁸¹ MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., *et al.* Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: Nutrición hospitalaria, 2002. vol. 17, no. 6, p. 271-278.

⁸² CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review. En: Food chemistry, 2009. vol. 113, no. 4, p. 859-871.

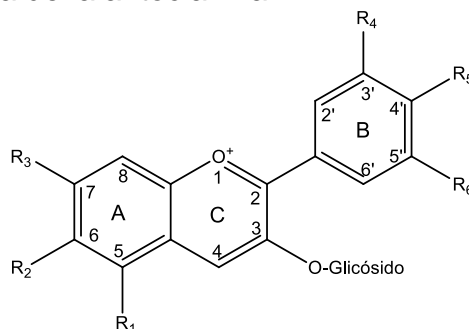
influenciado por el pH del medio en el que se disuelven⁸³. Algunas antocianinas son de color rojo en soluciones ácidas; violeta o morado en soluciones neutras, y azul a pH alcalino⁸⁴. Estructuralmente son derivados glicosilados (posición 3 del anillo C, figura 7) de las antocianidinas (aglicona) y difieren entre ellas de acuerdo al número de grupos hidroxilados o metoxilados, la naturaleza y el número de azúcares unidos a su estructura, los ácidos carboxílicos alifáticos o aromáticos unidos al azúcar en la molécula y la posición de estos enlaces. Se encuentran en las uvas, fresas, col roja, manzanas, rábanos, entre otros⁸⁵. Las características espectroscópicas de las antocianinas proporcionan información valiosa sobre su estructura (acilación, glicosilación, la presencia de grupos metoxilo, y copigmentos), aunque en general se observa un banda máxima entre 250–275 nm asociada con la absorción del anillo A y otra entre 465-560 nm asociada con la absorción de los anillos B y C⁸⁶.

Figura 6. Estructura química de diferentes flavonoides.



Fuente: Adaptado de MARTÍNEZ-FLÓREZ (2014).

Figura 7. Estructura química de la antocianina.



*R_x puede ser H, OH o OCH₃ dependiendo del tipo de antocianina. Fuente: Adaptado de DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ (2002).

⁸³ ALKEMA y SEAGER. Op. cit., p. 184-185.

⁸⁴ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 184.

⁸⁵ CASTAÑEDA-OVANDO, *et al.* Op. cit., p. 859-871.

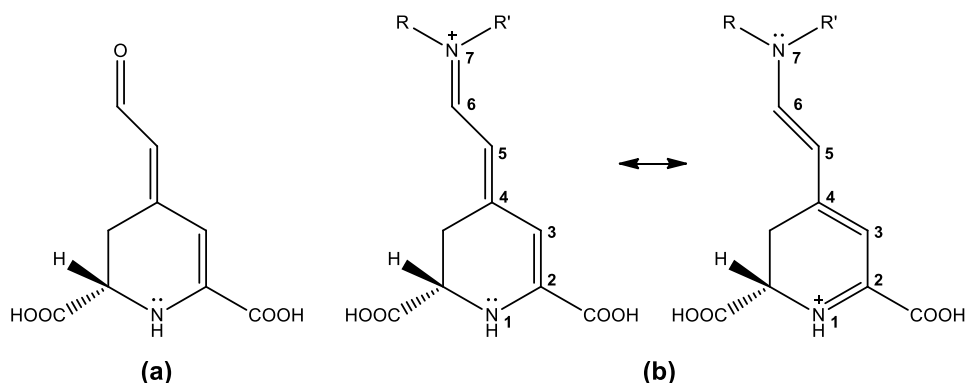
⁸⁶ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 180-181.

2.4 BETALAÍNAS

2.4.1 Características estructurales y espectrales

Las betalaínas son pigmentos vegetales hidrosolubles que son derivados iminados del ácido betalámico (figura 8a), su fórmula general se basa en una subestructura cromófora con un sistema protonado 1,2,4,7,7-pentasustituido 1,7-diazaheptametino (figura 8b)^{87,88}. Las diferencias en la sustitución de R y R' resultan en la formación de dos grupos estructurales conocidos como betacianinas (desde el rojo hasta el violeta) y betaxantinas (desde el amarillo al naranja), que exhiben máximos de absorción cercanos a 540 y 480 nm, respectivamente⁸⁹. Los nombres comunes de las betalaínas se asignaron en relación a la planta de donde fueron aisladas por primera vez: las betacianinas amarantina-I de *Amaranthus tricolor*, la betanina de *Beta vulgaris*, y gomfrenina-I de *Gomphrena globosa*; y las betaxantinas miraxantina de las flores *Mirabilis jalapa*, vulgaxantina I y II de las raíces de remolacha roja (*B. vulgaris*), y portulaxantina de los pétalos de *Portulaca grandiflora*⁹⁰.

Figura 8. Estructuras generales de: **(a)** el ácido betalámico, y **(b)** las betalaínas indicando la resonancia del cromóforo.



Fuente: Adaptado de Delgado (2002).

2.4.1.1 *Betacianinas (BC)*. Son producto de la condensación del ácido betalámico con compuestos imino como el *ciclo-DOPA* (ciclo-3,4-dihidroxifenilalanina) o sus derivados glicosilados⁹¹. Están formados por una estructura base llamada betanidina, que es la aglicona de las BC. Los diferentes patrones de glicosilación de los grupos hidroxilo situados en la posición 5 o 6 de la betanidina, así como la acilación del glicósido resultante, pueden formar una gran variedad de betacianinas⁹² (figura 9). La BC más

⁸⁷ DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 251.

⁸⁸ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 192-193.

⁸⁹ AZEREDO. Op. cit., p. 2365.

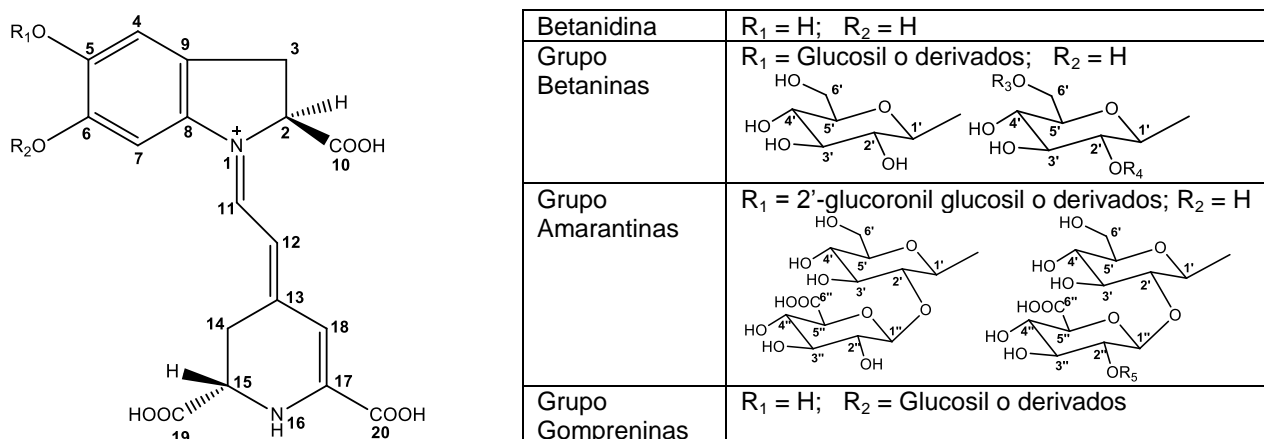
⁹⁰ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 192.

⁹¹ KHAN, Mohammad Imtiaz y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: Phytochemistry, 2015. vol. 117, p. 268.

⁹² AZEREDO. Op. cit., p. 2365.

conocida es la betanina (betanidina-5-*O*- β -glucósido) que es el pigmento mayoritario de la remolacha roja, *Beta vulgaris*⁹³.

Figura 9. Estructura general de las betacianinas.



Fuente: Adaptado de KHAN y GIRIDHAR (2015).

La gran mayoría de las BC se encuentran glicosiladas en el C5 (5-*O*-glicósidos), raramente en el C6 (6-*O*-glicósidos) pero nunca se ha detectado glicosilación en ambas posiciones. Las primeras se conocen como betaninas y las segundas como gompreninas cuando la unidad de azúcar enlazada es la glucosa^{94,95}. Otras unidades de azúcar que se encuentran menos frecuentemente son la soforosa y ramnosa⁹⁶. En algunos casos la estructura básica de la betanina se extiende a una molécula de ácido glucorónico unida a la posición 2' de la glucosa, este tipo de BC se conocen como Amarantinas. En otros casos la estructura no posee el grupo carboxilo en la posición 2, por tanto se conocen como 2-descarboxi-betalainas⁹⁷. Los residuos glucosil o 2'-glucoronil glucosil de las BC pueden ser modificados a través de la esterificación con ácidos alifáticos o aromáticos. Entre los numerosos residuos acilantes que se han identificado; los más comunes son el ácido malónico, el 3-hidroxi-3-metilglutárico y ácidos hidroxicinámicos tales como el cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y aunque pocas veces también se ha encontrado el ácido sinápico^{98,99}. Algunos de ellos se muestran en la figura 10.

⁹³ HERBACH, Kirsten M.; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *En: Journal of Food Science*, 2006. vol. 71, no. 4, p. R41.

⁹⁴ AZEREDO. Op. cit., p. 2365.

⁹⁵ ESATBEYOGLU, Tuba, *et al.* Betanin—A food colorant with biological activity. *En: Molecular nutrition & food research*, 2015. vol. 59, no. 1, p. 36

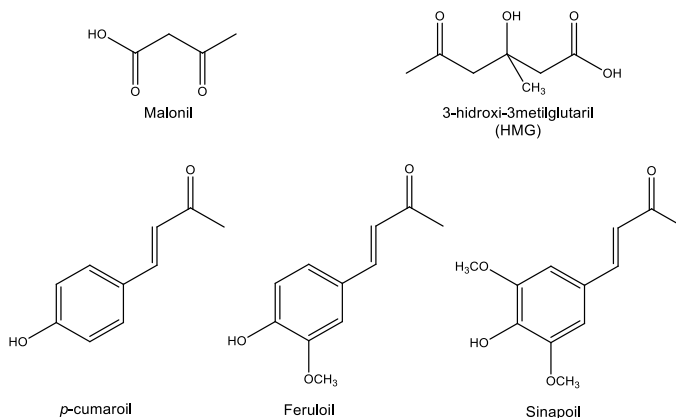
⁹⁶ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 193.

⁹⁷ ESATBEYOGLU, Op. cit., p. 36-37.

⁹⁸ EDER. Op. cit., p. 860.

⁹⁹ STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit., p. 514-515.

Figura 10. Residuos acilo (alifáticos y aromáticos) comunes en la sustitución de betacianinas.



Fuente: Adaptado de Delgado (2002).

De acuerdo a la fórmula general de las BC (figura 9), hay dos átomos de carbono asimétrico en la molécula (C2 y C15); por lo tanto, todas las betacianinas son ópticamente activas¹⁰⁰. El epímero C15 de la betanidina (2S,15S) es llamado isobetanidina (2S, 15R)¹⁰¹, cuyas estructuras generales se muestran en la figura 11. La isomerización puede ser generada *in vitro* o *in vivo*. En cuanto a las condiciones *in vitro* que pueden dar lugar a las isobetacianinas se encuentran la acidez y/o la aplicación de calor¹⁰² así como los procedimientos de extracción y aislamiento¹⁰³. Sin embargo, Stintzing y Carle¹⁰⁴ indican que esto únicamente debe tenerse en cuenta cuando el grado real de isomerización en los tejidos vegetales es de interés. Por otro lado, concluyen que la isomerización *in vivo* está controlada por factores ambientales más que por las condiciones específicas del tejido vegetal. Esto con base en estudios donde no han encontrado una proporción definida entre la ocurrencia de betacianinas respecto a sus epímeros (isobetacianinas) tanto en las diferentes partes de la misma planta como entre diferentes especies de remolacha¹⁰⁵ y amaranto¹⁰⁶. Sin embargo, en general con el aumento de concentración de pigmento se ha observado un menor contenido de isómeros C15. La importancia fisiológica de este cambio conformacional está lejos de ser clara¹⁰⁷.

¹⁰⁰ EDER. Op. cit., p. 860.

¹⁰¹ DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 251.

¹⁰² EDER. Op. cit., p. 860.

¹⁰³ 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, 2004. vol. 15, no. 1, p. 24.

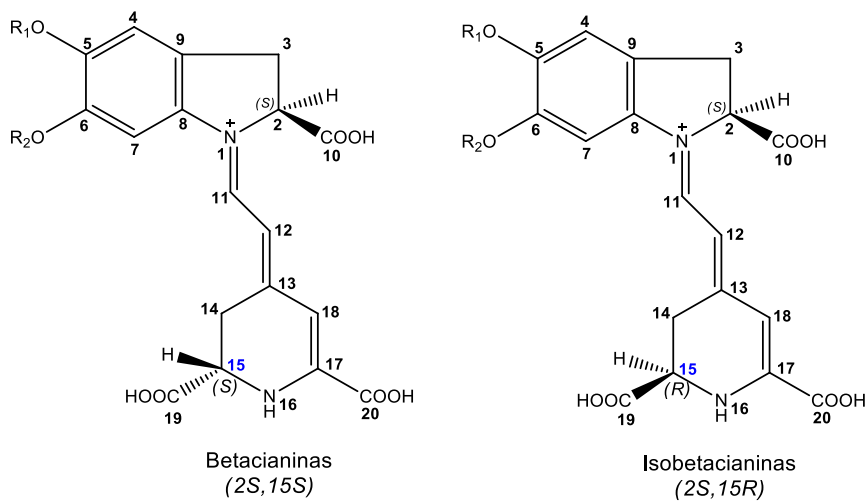
¹⁰⁴ Ibíd. p. 24.

¹⁰⁵ KUJALA, T.S., *et al.* Betalain and phenolic compositions of four beetroot (*Beta vulgaris*) cultivars. En: European Food Research and Technology, 2002. vol. 214, no. 6, p. 505-510.

¹⁰⁶ CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in Amaranthaceae. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. vol. 49, p. 1971-1978.

¹⁰⁷ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 24.

Figura 11. Estructuras generales de las betacianinas/isobetacianinas.



Fuente: Adaptado de ESATBEYOGLU (2015).

En cuanto a sus características espectrales, las betacianinas son conocidas por presentar dos máximos de absorción, el primero en el rango UV entre 270 y 280 nm debido a la estructura *ciclo*-DOPA y el segundo en el rango visible entre 532-550 nm. La acilación con ácidos hidroxicinámicos produce un tercer máximo alrededor de 300-330 nm, mientras que los derivados de ácidos alifáticos no son distinguibles de sus correspondientes betanidinas glicosiladas^{108,109}. El desplazamiento batocrómico de las BC, en la región visible, de 50 a 70 nm en comparación con las betaxantinas se atribuye a que la resonancia electrónica se extiende a la estructura aromática del residuo *ciclo*-DOPA¹¹⁰. La coloración (roja a violeta) de las diferentes betacianinas y sus respectivos máximos de absorción están influenciados por el tipo de sustitución de la estructura base de la betanidina.

Generalmente, la glicosilación de la betanidina genera un cambio hipsocrómico de alrededor de 6 nm, mientras que un segundo residuo de azúcar unido a la primera aparentemente no afecta en gran medida la apariencia visual¹¹¹. La glucosa unida al C6 influye en menor medida este tipo de cambio que la glicosilación en el C5¹¹². La esterificación de ambas betanidinas con ácidos aromáticos (hidroxicinámicos) puede incrementar la estabilidad del pigmento¹¹³ e inducir un cambio batocrómico de más de 12 nm¹¹⁴, que ha sido explicado como una asociación intramolecular como la copigmentación; de hecho la unión de acilglicósidos al C6 incrementa el

¹⁰⁸ KHAN y GIRIDHAR. Op. cit., p. 267-295.

¹⁰⁹ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 23.

¹¹⁰ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R41.

¹¹¹ AZEREDO. Op. cit., p. 2366.

¹¹² HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R41-42.

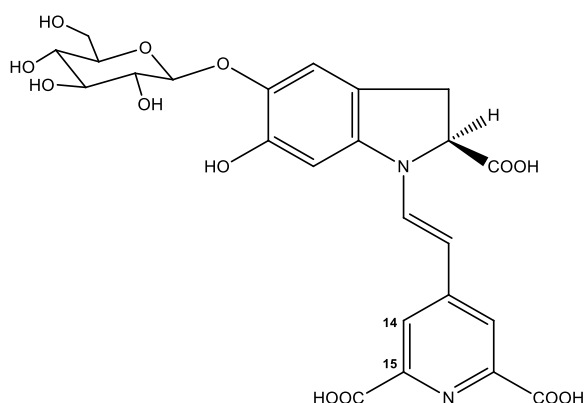
¹¹³ SHIVAPRIYA, M., *et al.* Stability of betalain pigments of red beet. *En: Red Beet Biotechnology*. Springer US, 2013. p. 60

¹¹⁴ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 24.

desplazamiento batocrómico, lo cual posiblemente se deba a una conformación más rígida¹¹⁵. Mientras que la esterificación con residuos acilo alifáticos fueron reportados por tener poco impacto sobre la absorción máxima de las betacianinas (2-3 nm) o no alterar el espectro. De modo similar, los epímeros C15 no modifican o cambian las propiedades del color de las betacianinas¹¹⁶.

A diferencia de todas las demás betacianinas existe un subgrupo que no presenta el centro quiral C15 dado que se caracterizan por la deshidrogenación en la posición 14,15. Se conocen como neobetacianinas y a pesar de estar agrupadas estructuralmente con las BC, tienen características espectrales similares a las betaxantinas ya que sus máximos de absorción exhiben desplazamientos hipsocrómicos a 450-490 nm^{117,118}. Esta desprotonación puede ocurrir tras la influencia de un tratamiento térmico o debido a la oxidación del aire, sin embargo también se encuentran como componentes genuinos de las plantas, como la neobetanina (figura 12) que se caracteriza por un color amarillo ($\lambda_{\text{máx}}$ alrededor de 470 nm)¹¹⁹.

Figura 12. Estructura de la neobetanina.



Fuente: Adaptado de WYBRANIEC y MIZRAHI (2005).

2.4.1.2. *Betaxantinas (BX)*. Son derivados de la condensación del ácido betalámico con diferentes aminoácidos o aminas¹²⁰. Las BX ocurren como agliconas y su estructura básica se muestra en la figura 13a donde el grupo R₁ es usualmente un hidrógeno; excepto para la indicaxantina y portulacaxantina donde los grupos R₁ y R₂ forman una prolina o hidroxiprolina. Las BX no incluyen a los grupos R₁ y R₂ en el sistema

¹¹⁵ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R42.

¹¹⁶ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 24.

¹¹⁷ WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Studies on nonenzymatic oxidation mechanisms in neobetainin, betainin, and decarboxylated betainins. *En: Journal of agricultural and food chemistry*, 2013. vol. 61, no. 26, p. 6465-6476.

¹¹⁸ 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*, 2005. vol. 53, no. 17, p. 6704-6712.

¹¹⁹ HERBACH, K.M.; STINTZING, F.C. y CARLE, R. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *En: Journal of Food Science*. Agosto, 2004b. vol. 69, no. 6, p. C491-C498.

¹²⁰ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R41.

resonante por tanto sus absorbancias máximas son menores que en las betacianinas (457-485 nm)¹²¹. Las modificaciones estructurales producen cambios hipso- o batocrómicos. En general, los conjugados de aminas siempre muestran un máximo de absorción más bajo que sus respectivos homólogos de aminoácidos y la indicaxantina junto con portulacaxantina I muestran el máximo de absorción más alto reportado hasta ahora. Las BX son ópticamente activas debido a su central quiral C11 (figura 13b). La epimerización del C11 puede deberse a la ocurrencia genuina en las plantas, aunque este cambio conformacional (de 2*S*,11*S* a 2*S*,11*R*) también se ha reportado en condiciones *in vitro*¹²². Las betaxantinas más comunes son la vulgaxantina I (glutamina-betaxantina) e indicaxantina (prolina-betaxantina), que son las BX principales de remolacha roja (*Beta vulgaris* L.) y la tuna amarilla (*Opuntia* spp.), respectivamente¹²³.

Figura 13. Estructuras de las betaxantinas más comunes.



Fuente: Adaptado de Khan (2015).

En la tabla 2 se muestra una clasificación general de las betalainas. En resumen, las betacianinas se dividen en cuatro grupos: betaninas, amarantinas, gomprelinas y 2-decarboxibetaninas. Por su parte, las betaxantinas se dividen en conjugados derivados de aminoácidos y aminas^{124,125}.

¹²¹ KHAN y GIRIDHAR. Op. cit., p. 267-295.

¹²² STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 24.

¹²³ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R41.

¹²⁴ PAVOKOVIC, Dubravko; KRSNIK-RASOL, Marijana. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. *En: Food technology and biotechnology*, 2011. vol. 49, no. 2, p. 146.

¹²⁵ GENGATHARAN, Ashwini; DYKES, Gary A.; CHOO, Wee Sim. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, vol. 64, no. 2, p. 645-649.

Tabla 2. Clasificación general de las betalaínas.

<i>Betacianinas</i>	<i>Betaxantinas</i>
<p><i>Grupo betanina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Filocactina ● 2'apiosyl-filocactina ● 2'-(5''-O-E-Feruloilapiosil)-betanina ● Hilocerenina <p><i>Grupo Amarantina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Amarantina <p><i>Grupo Gomprelina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Gromprelina clase I, II, III ● Betanidina 6-O-(6-O-hidroxicinamoil)-soforosido (derivados) <p><i>Grupo 2-descarboxi-betanina</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● 2-descarboxi-betanidina ● 2-descarboxi-betanina ● 6-O-malonil-2-descarboxi-betanina 	<p><i>Grupo de conjugados derivados de aminoácidos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● Portulacaxantina II ● Portulacaxantina III ● Triptofano-betaxantina ● Tirosina-betaxantina <p><i>Grupo de conjugados derivados de aminas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> ● 3-metoxitiramina-betaxantina

Fuente: Pavokovic y Krsnik-Rasol (2011), y Gengatharan, Dykes y Choo (2015).

2.4.2 Biosíntesis

A diferencia de la producción de flavonoides y carotenoides que ha sido ampliamente estudiada y metabólicamente diseñada en una variedad de especies, la biosíntesis de betalaínas aún no se ha caracterizado por completo. En contraste con las antocianinas/flavonoides derivados de la fenilalanina, las betalaínas se derivan desde la tirosina siguiendo una ruta biosintética que, aparentemente, involucra unas pocas reacciones que son catalizadas por diferentes enzimas¹²⁶ como se muestra en la figura 14. La etapa inicial es la hidroxilación de la L-tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) atribuida a la actividad de la tirosinasa, aunque su rol exacto (si lo hay) en esta biosíntesis aún no se ha resuelto. A continuación la escisión del anillo cíclico de L-DOPA por DOPA-4,5-dioxigenasa forma un intermedio inestable *seco*-DOPA, que se reorganiza espontáneamente a ácido betalámico. La formación de betaxantinas ocurre a partir de la condensación de ácido betalámico con aminas/aminoácidos, en un paso espontáneo¹²⁷.

Por su parte, la biosíntesis de betacianinas implica la condensación de ácido betalámico con *ciclo*-DOPA. El *ciclo*-DOPA se forma a partir de L-DOPA a través de una reacción de oxidación que también ha sido atribuida a la actividad de la tirosinasa, donde la conversión procede a través de un intermediario inestable O-DOPA-quinona que se cicla espontáneamente para formar *ciclo*-DOPA¹²⁸. Recientemente, se ha mostrado que

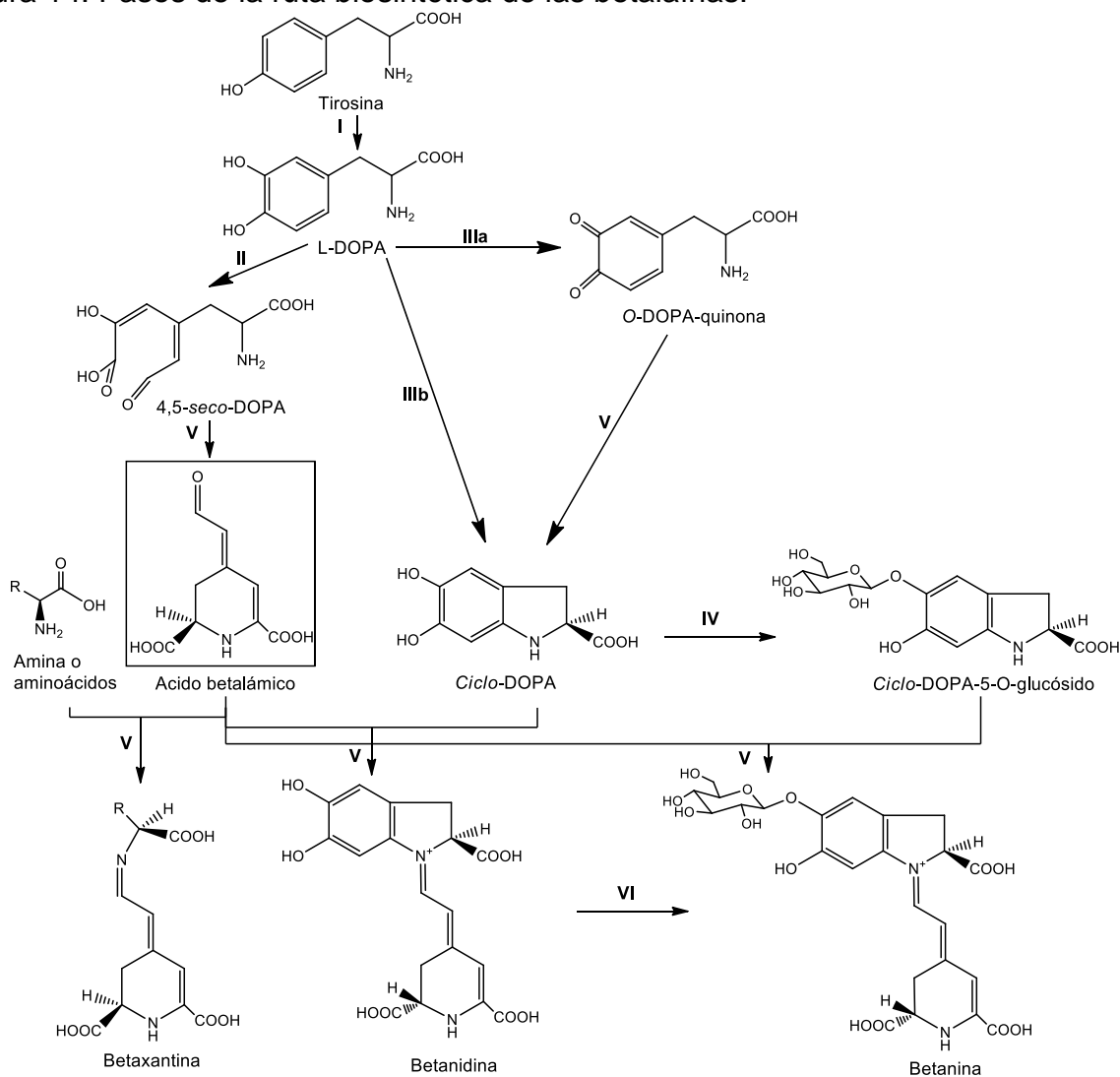
¹²⁶ CHUNG, Hsiao-Hang, *et al.* Characterisation of betalain biosynthesis in Parakeelya flowers identifies the key biosynthetic gene DOD as belonging to an expanded LigB gene family that is conserved in betalain-producing species. *En: Frontiers in plant science*, 2015, vol. 6. p. 2.

¹²⁷ HARRIS, N., *et al.* Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *En: BMC plant biology*, 2012. vol. 12, no. 1, p. 2.

¹²⁸ *Ibíd.* p. 2.

esta ciclación también es posible por medio de la citocromo P450 (CYP76AD1)¹²⁹. Las betacianinas son generalmente O-glicosiladas (en el C5 y C6) y con frecuencia luego son aciladas. La glicosilación puede producirse en la etapa del *ciclo*-DOPA o en la de la betanidina¹³⁰. Además, Kobayashi *et al*¹³¹ proponen una ruta biosintética para las betacianinas 2-descarboxiladas basada en la combinación de ácido betalámico con 2-descarboxi-ciclo-DOPA seguido de glicosilación y acilación.

Figura 14. Pasos de la ruta biosintética de las betalaínas.



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

¹²⁹ ESATBEYOGLU, Op. cit., p. 36

¹³⁰ SAKUTA, Masaaki. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. *En*: Plant biotechnology reports, 2014, vol. 8, no. 1, p. 41. O 42

¹³¹ KOBAYASHI, Naoko, *et al*. Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *En*: Phytochemistry, 2001, vol. 56, no. 5, p. 429-436.

2.4.3 Distribución de las betalaínas en la Naturaleza.

Las fuentes de betalaínas están restringidas a las plantas superiores del orden Caryophyllales¹³², antiguamente llamado Centrospermae¹³³, excepto en las familias Caryophyllaceae y Molluginaceae productoras de antocianinas¹³⁴. Las antocianinas y betalaínas nunca han sido reportadas en la misma planta, parecen ser mutuamente excluyentes en el reino vegetal¹³⁵. No obstante, Harris *et al*¹³⁶ reportan que la producción de betalaínas puede ser inducida en especies de plantas productoras de antocianinas por la presencia de DOPA-dioxigenasa y L-DOPA. Otras fuentes de betalaínas se han encontrado en ciertos géneros de hongos superiores, tales como *Amanita*, *Hygrocybe*, y *Hygrosporus*¹³⁷.

Las betalaínas se pueden encontrar en diferentes partes de la planta (raíces, frutos y flores) y se acumulan en las vacuolas celulares, principalmente en los tejidos epidérmicos y subepidérmicos; y en algunas ocasiones en los tallos de las plantas¹³⁸. Entre los diversos productos alimenticios que contienen betalaínas se encuentran: las raíces de remolacha roja y amarilla (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), las hojas de espinaca india (*Basella rubra* L), los tallos de color de algunas especies de acelga (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla*), los granos y hojas de amaranto (*Amaranthus* ssp.), los frutos de cactus de los géneros *Opuntia* y *Hylocereus* correspondientes a tuna y pitahaya¹³⁹, y más recientemente se han determinado en tubérculos de *Ullucus tuberosus*¹⁴⁰. En la figura 15 se presentan algunas fotografías de estas especies donde las coloraciones observadas se deben a mezclas de ambos tipos de betalaína, aunque en las tonalidades rojizas y amarillas predomina la presencia de BC y BX, respectivamente¹⁴¹.

¹³² DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 253.

¹³³ BEHNKE y MABRY. Op. cit., p. 11.

¹³⁴ ESATBEYOGLU, Op. cit., p. 36

¹³⁵ AZEREDO. Op. cit., p. 2366.

¹³⁶ HARRIS. Op. cit. p. 1-12.

¹³⁷ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 195.

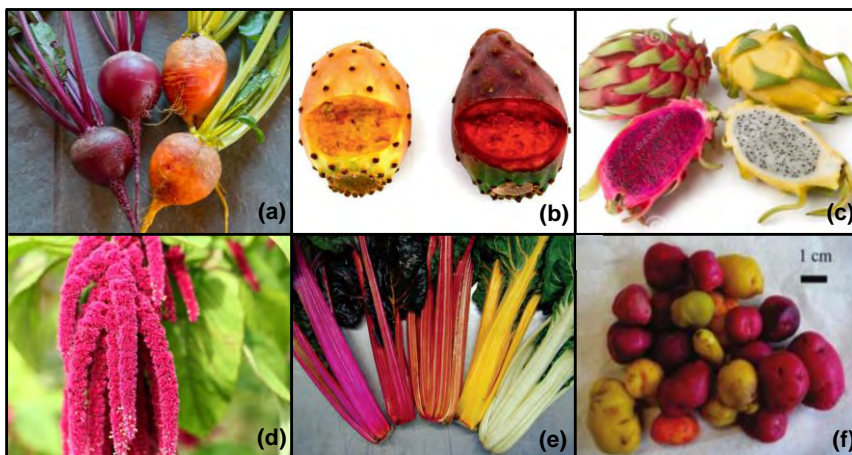
¹³⁸ *Ibíd.*, p. 195.

¹³⁹ AZEREDO. Op. cit., 2365–2376

¹⁴⁰ ESATBEYOGLU, Op. cit., p. 39

¹⁴¹ NEELWARNE, Bhagyalakshmi y HALAGUR, Sowbhagya B. Red Beet: An Overview. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 5.

Figura 15. Algunas especies vegetales con contenido de betalaínas

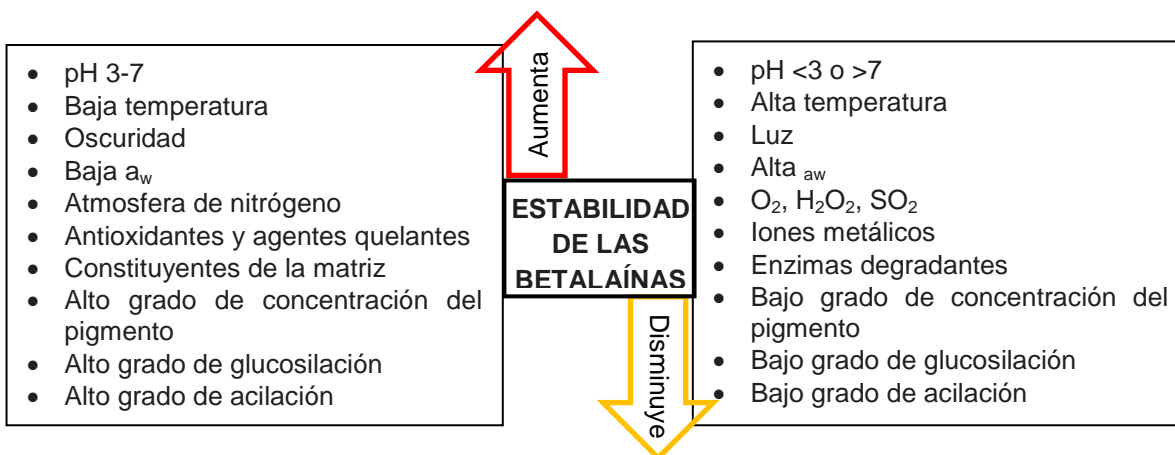


*(a) Remolacha roja y amarilla, (b) tuna roja y amarilla, (c) pitahaya roja y amarilla, (d) Flor de Amaranto, (e) tallos de acelga rojos y amarillos, (f) ullucos redondos rojos y amarillos. Fuente: Imágenes tomadas de GANDÍA-HERRERO (2013), KUGLER (2004), SVENSON (2008).

2.4.4 Estabilidad

Las betalaínas son susceptibles a diversos factores fisicoquímicos que se resumen en la figura 16. La degradación de estos pigmentos está influenciada por factores endógenos, tales como enzimas de las plantas como polifenoloxidasas, peroxidasa, y β -glucosidasa y por las condiciones que prevalecen en el medio de extracción, principalmente la temperatura, el oxígeno y el pH¹⁴².

Figura 16. Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas.

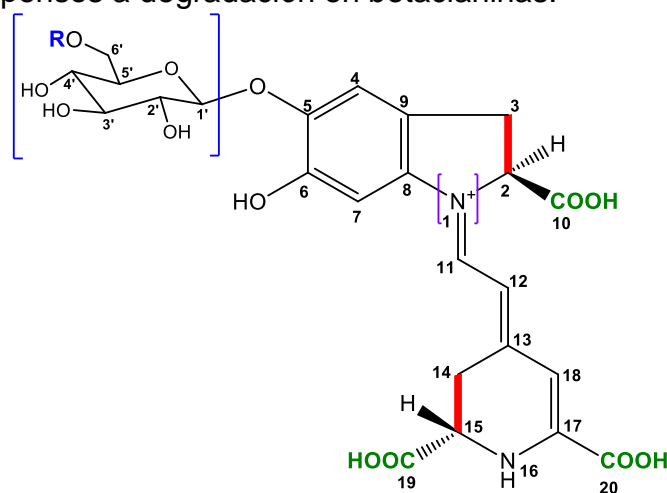


Fuente: Adaptado de HERBACH (2006) y STINZING (2008).

¹⁴² STINZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications. En: SOCACIU, Carmen (Ed.), Food Colorants. Chemical and Functional Properties. Boca, Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 2008. p. 286.

Los posibles cambios estructurales de las betalainas durante la degradación son la escisión del enlace aldimina, isomerización, descarboxilación, desglicosilación y deshidrogenación^{143,144}. En betacianinas, los carbonos C19, C20 y el grupo carboxilo unido al C2 son los sitios más propensos a descarboxilación, mientras que la deshidrogenación incluye el enlace entre C2/C3 y C14/C15¹⁴⁵ como se muestra en la figura 17.

Figura 17. Sitios propensos a degradación en betacianinas.



*Deglicosilación (corchetes azules), descarboxilación (verde), deshidrogenación (rojo) y ataque nucleofílico (corchetes morados). Fuente: Adaptado de Khan (2016).

2.4.4.1 *Efectos de algunos factores en la estabilidad de las betalainas.* Las betalainas son más estables y conservan su poder colorante en un amplio intervalo de pH entre 3 y 7¹⁴⁶. Se ha encontrado que la retención del color es óptima en el pH de la respectiva fuente vegetal, por ejemplo, las betalainas de la remolacha roja presentan su máxima estabilidad a pH 5,5-6,0, que corresponde al rango de pH característico de esta raíz^{147,148}. Cuando los valores de pH están por debajo de 3 ocurre una pérdida de color, aunque los mecanismos exactos aún no han sido elucidados¹⁴⁹. En medios alcalinos, el enlace aldimina de las betalainas se escinde a sus precursores biosintéticos, es decir, ácido betalámico y ciclo-DOPA (betacianinas) o compuestos amino (betaxantinas); los cuales también se pueden degradar, conllevando a una mayor pérdida de color^{150,151}.

¹⁴³ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R42.

¹⁴⁴ KHAN, Mohammad I. Stabilization of betalains: A review. En: Food chemistry, 2016. vol. 197, p. 1281-1282.

¹⁴⁵ STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit., p. 514-515.

¹⁴⁶ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 24.

¹⁴⁷ PÁTKAI, G.; BARTA, J. Decomposition of betacyanins and betaxanthins by heat and pH changes. En: Food/Nahrung, 1996, vol. 40, no. 5, p. 267-270.

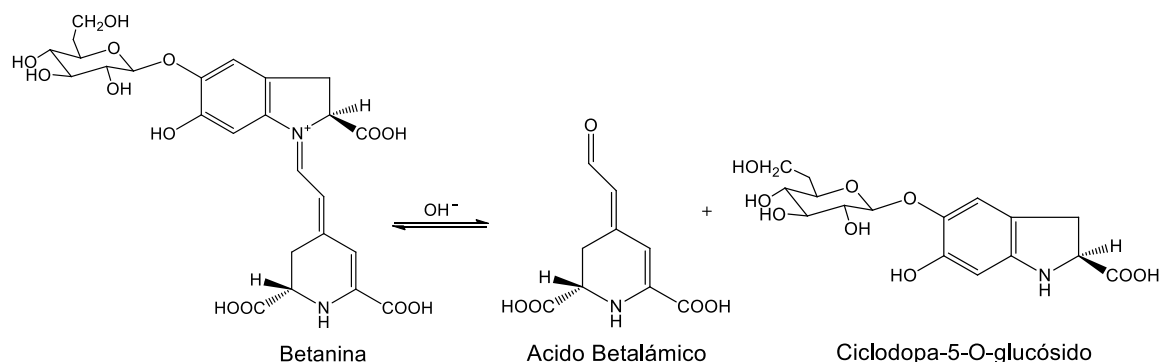
¹⁴⁸ SAVOLAINEN, Karin y KUUSI, Taina. The stability properties of golden beet and red beet pigments: influence of pH, temperature, and some stabilizers. En: Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1978. vol. 166, no. 1, p. 19-22.

¹⁴⁹ JACKMAN, R. L y SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. En: Natural food colorants. Estados Unidos: Springer, 1996. p. 245.

¹⁵⁰ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 24.

La reacción de degradación de la betanina se muestra en la figura 18. Como una regla general, las betacianinas son consideradas más resistentes a medios ácidos, mientras que betaxantinas son más estables a pH neutro. Estas características pueden cambiar de acuerdo a sus respectivas estructuras químicas¹⁵².

Figura 18. Reacción de degradación de la betanina en medio básico.



Fuente: Adaptado de Herbach (2004).

La actividad de agua (a_w) perjudica la estabilidad de las betalainas pues se observa la escisión del enlace aldimina, al igual que en soluciones alcalinas. Además, un mayor contenido de agua incrementará tanto la movilidad de los componentes de los alimentos como la solubilidad del oxígeno, y a su vez aumenta la desestabilización¹⁵³. El oxígeno afecta severamente las betalainas; la reacción entre betalainas y oxígeno molecular parece ser una de las principales causas de la pérdida de la capacidad colorante del pigmento¹⁵⁴. Las betalainas también se degradan cuando se exponen a la luz, especialmente en presencia de oxígeno¹⁵⁵. También se debe considerar que la exposición a la luz aumentará la temperatura, lo que agrava la pérdida de color. El efecto de la luz sólo es medible por debajo de 25°C; por encima es dominado por el daño térmico¹⁵⁶. La temperatura puede ser el factor más crítico en la estabilidad de las betalainas. La velocidad de degradación está fuertemente influenciada por el pH y la actividad de agua. Estudios recientes sugieren que las betalainas son considerablemente degradadas a temperaturas entre 50-80°C, formándose productos deshidrogenados, descarboxilados o una combinación de estos que tornan amarillo al

¹⁵¹ HERBACH, Kirsten M.; STINTZING, Florian C. 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, Septiembre, 2004a, vol. 219, no. 4, p. 377-385.

¹⁵² STINTZING y CARLE, 2008. Op. cit., p. 287.

¹⁵³ MÉGARD, D., Stability of red beet pigments for use as food colorant: a review, En: Foods & food ingredients journal of Japan, 1993. vol. 158, p. 130

¹⁵⁴ AZEREDO. Op. cit., p. 2369

¹⁵⁵ HERBACH, Kirsten M., *et al.* Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 2006. vol. 39, no. 6, p. 667-677.

¹⁵⁶ ATTOE, E.L. y VON ELBE, J.H. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. En: *Journal of Food Science*, 1981. vol. 46, no. 6, p. 1934-1937.

extracto¹⁵⁷. La deshidrogenación de BC en C14/C15 forma los neo-compuestos correspondientes, ocasionando un cambio de color de rojo a amarillo¹⁵⁸. También se publicó que la exposición de betanina a temperaturas elevadas causa isomerización y descarboxilación, formando el estereoisómero C15 (isobetanina) y 15-descarboxibetanina, respectivamente¹⁵⁹.

2.4.4 Las betalaínas como agentes colorantes para sustituir el uso de los colorantes sintéticos

En la industria alimenticia, los principales factores que se evalúan al juzgar la calidad de un producto son el color, el sabor y la textura; pero el color puede ser considerado el más importante de ellos, ya que si un determinado alimento no es atractivo los consumidores no disfrutarán del sabor y la textura de este¹⁶⁰; razón por la cual, los agentes colorantes son aditivos frecuentemente empleados, que pueden ser de origen natural o sintético y que se utilizan para:

- Realzar o incrementar el color natural que presenta el alimento cuando su intensidad es menor a la que habitualmente se asocia a dicho alimento
- Compensar las pérdidas de color de los alimentos que se pueden producir por exposición a factores ambientales (luz, aire, temperatura, humedad, etc) o por consecuencia del almacenamiento y así satisfacer las expectativas del consumidor¹⁶¹.

Los colorantes sintéticos han sido más utilizados en comparación con aquellos de origen natural, ya que los primeros son menos costosos, tienen superior poder de coloración, mayor uniformidad y estabilidad cuando son expuestos a condiciones extremas de luz, pH o temperatura¹⁶²; sin embargo, algunos de estos presentan efectos adversos en la salud debido a que son capaces de aumentar la hiperactividad en los niños¹⁶³, causar dermatitis, e incluso, llegar a ser carcinógenos¹⁶⁴. Esto ha llevado a reducir progresivamente el número de colorantes utilizables, por ejemplo, la FDA¹⁶⁵ (Agencia de Alimentos y Medicamentos) ya ha excluido de la lista de aditivos aprobados para alimentos a los colorantes de tonalidades rojas: E-123 (Amaranto), E-124

¹⁵⁷ MANCHALI, Shivapriya, *et al.* Stability of Betalain Pigments of Red Beet. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 60-63.

¹⁵⁸ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R41

¹⁵⁹ SCHWARTZ, S. J.; HILDENBRAND, B. E.; ELBE, J. H. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods to quantify betacyanins. En: Journal of Food Science, 1981, vol. 46, no. 1, p. 296-297.

¹⁶⁰ DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 35.

¹⁶¹ GIL, A. Tratado de Nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Tomo II. 2 ed. Madrid: Médica Panamericana, 2010. p. 442.

¹⁶² VACLAVIK, V. y CHRISTIAN, E. Evaluation of Food Quality. En: Essentials of food science. 3 ed. Texas: Springer, 2008. p. 4, 454.

¹⁶³ STEVENS, *et al.* Op. cit., p. 268-281.

¹⁶⁴ SHARMA, MCKONE y MARKOW. Op. cit., p. 25.

¹⁶⁵ FDA. Food Additive Status List [en línea]. Estados Unidos: Department of Health and Human Services U.S. Actualizado 16 de diciembre de 2014 [citado 12 de enero 2016]. Disponible en < <http://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditiveinventories/ucm106626.htm>>

(Ponceau 4R) y E-127 (Eritrosina) y amarillas: E-102 (Tartracina) y E-110 (Amarillo ocaso FCF)^{166,167,168}.

De entre los diferentes tipos de pigmentos naturales que podrían ser una alternativa al uso de colorantes sintéticos tóxicos, las betalaínas destacan por su estabilidad en un amplio rango de pH (entre 3 y 7), mayor solubilidad en agua, diversidad de tonalidades (principalmente rojas y amarillas) y alta capacidad tintórea¹⁶⁹. Las anteriores características hacen adecuado el uso de betalaína en productos alimenticios que se encuentren en condiciones bajas de acidez o neutros, tales como: yogures, bebidas, helados, caramelos duros, aderezos para ensaladas, mezclas para pasteles, productos cárnicos terminados y sustitutos de la carne, postres de gelatina, mezclas de bebidas en polvo, etc¹⁷⁰. Además, el estudio de Gandía-Herrero *et al*¹⁷¹ ha demostrado que mezclando diferentes proporciones de betaxantina (miraxantina V) y betacianina (betanidina) es posible obtener extractos de diversos y llamativos colores entre el amarillo y el violeta, incluyendo tonalidades rojizas. La fluorescencia de las betaxantinas también es una propiedad interesante para la aplicación de estas como colorantes¹⁷².

Para que las betalaínas puedan adquirir importancia comercial deben ser capaces de igualar o superar la estabilidad que presentan los colorantes sintéticos; por tanto, se recomienda que estas sean sometidas a procedimientos de estabilización. La encapsulación es una técnica de estabilización prometedora ya que utiliza materiales de recubrimiento o agentes encapsulantes como polisacáridos (pectina, β -ciclodextrina, maltodextrina, entre otros) para proteger y mantener estable a las betalaínas^{173,174}. Recientemente se ha empleado el mucilago extraído de cladodios (rama del cactus) como encapsulante de las betalaínas extraídas de la tuna (fruta del cactus)¹⁷⁵.

De entre las plantas que acumulan betalaínas, solamente el extracto de la remolacha roja es mundialmente utilizado como colorante rojo alimenticio E-162 y como un colorante natural en cosméticos y medicamentos^{176,177}. Aunque su desventaja es que

¹⁶⁶ CARMONA, I. De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. Reporte No. 5. Alimentos procesados. Agrimundo. p. 1-5

¹⁶⁷ IBÁÑEZ, F., TORRE, P. y IRIGOYEN, A. Aditivos alimentarios. Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Pública de Navarra, 2003. p. 1-10.

¹⁶⁸ PANDEY, A.; SOCCOL, C. y LARROCHE, C. Production of Pigments. Current developments in solid-state fermentation. India: Springer. 2008, p. 337.

¹⁶⁹ STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit., p. 516.

¹⁷⁰ NEELWARNE y HALAGUR. Op. cit., p. 22.

¹⁷¹ GANDÍA-HERRERO, Fernando, *et al*. Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2013. vol. 61, no. 18, p. 4294-4302.

¹⁷² GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F. y ESCRIBANO, J. Fluorescent pigments: new perspectives in betalain research and applications. En: Food research international, 2005. vol. 38, no. 8, p. 879-884.

¹⁷³ KHAN. Op. cit., p. 267-295.

¹⁷⁴ GANDÍA-HERRERO, Fernando, *et al*. Stabilization of the bioactive pigment of Opuntia fruits through maltodextrin encapsulation. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2010. vol. 58, no. 19, p. 10646-10652.

¹⁷⁵ OTÁLORA, María Carolina, *et al*. Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (Opuntia ficus-indica) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. En: Food chemistry, 2015, vol. 187, p. 174-181.

¹⁷⁶ KAPADIA y SUBBA RAO. Op. cit., p. 125.

¹⁷⁷ AZEREDO. Op. cit., p. 2365.

tiene un sabor particular (“terroso”), debido a la presencia de geosmina y algunas pirazinas, que limita su aplicación, por ejemplo al agregarla en alimentos lácteos^{178,179}. También se han explorado flores de Amaranteaceas y los frutos de algunas especies de Cactáceas (tunas y pitahayas) que de acuerdo a algunos autores tienen mejores propiedades organolépticas.

Estudios recientes han explorado las betalaínas más allá de su aplicación como colorantes. Estas también pueden ser utilizadas como pigmentos captadores de luz en celdas solares sensibilizadas por colorante¹⁸⁰. Incluso, se ha evaluado su aplicación en biofotónica y medicina¹⁸¹. Otra característica importante de las betalaínas es que estas han demostrado tener varias propiedades farmacológicas¹⁸², tales como actividad antioxidante¹⁸³, anti-cáncer¹⁸⁴, anti-lipidémica¹⁸⁵, antimicrobiana¹⁸⁶ y anti-inflamatoria¹⁸⁷.

2.4.5 Las betalaínas como antioxidantes

La principal característica de un antioxidante es su capacidad para capturar los radicales libres¹⁸⁸. Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen como un efecto secundario del metabolismo oxidativo (respiración celular) en el cuerpo humano, esencial para la supervivencia de las células. Las ROS comprenden moléculas que contienen oxígeno, ya sea en forma de radicales libres o no, tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el superóxido (O₂^{•-}), el singlete de oxígeno (1/2O₂), y el radical hidroxilo (•OH). Los radicales libres también se producen en el organismo por razones exógenas, por ejemplo por contaminantes o toxinas como el humo del cigarrillo, el alcohol, radiaciones UV y pesticidas. Cuando se forma un exceso de radicales libres, las enzimas de protección o defensas antioxidantes de la célula (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa) pueden abrumarse, causando un desequilibrio entre la producción y la destrucción de ROS, dando lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo. En otras palabras, el estrés oxidativo es una

¹⁷⁸ LU, *et al.* Op. cit., p. 1026-1029.

¹⁷⁹ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit. p. 27-28.

¹⁸⁰ CALOGERO, Giuseppe, *et al.* Anthocyanins and betalains as light-harvesting pigments for dye-sensitized solar cells. *En: Solar energy*, 2012. vol. 86, no. 5, p. 1563-1575.

¹⁸¹ PAULIUC, Marinela; IOSUB, Ion; RAU, Ileana. Separation and purification of natural extracts obtained from beetroot (*Beta vulgaris*): Topic: Chemistry applied in medicine. *En: E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, 2015. IEEE, 2015. p. 1-3.

¹⁸² GENGATHARAN, DYKES y CHOO. Op. cit., p. 645-649.

¹⁸³ KANNER, Joseph; HAREL, Stela y GRANIT, Rina. Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, vol. 49, no. 11, p. 5178-5185.

¹⁸⁴ KAPADIA y SUBBA RAO. Op. cit., p. 125-154.

¹⁸⁵ CLEMENTE, A.; DESAI, P. V. Evaluation of the hematological, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Amaranthus tricolor* leaf extract in rat. *En: Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2011. vol. 10, no. 5, p. 595-602.

¹⁸⁶ HAYEK, Saeed A.; IBRAHIM, Salam A. Antimicrobial activity of xoconostle pears (*Opuntia matudae*) against *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium. *International journal of microbiology*, 2012. vol. 2012.

¹⁸⁷ CHO, Jae Youl, *et al.* Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. *En: Journal of pharmacy and pharmacology*, 2006. vol. 58, no. 1, p. 113-119.

¹⁸⁸ PRAKASH, Aruna; RIGELHOF, Fred y MILLER, Eugene. Medallion Laboratories Analytical Progress: Antioxidant Activity. *En: Medallion Labs publication*, 2001. vol. 19, p. 1-4.

consecuencia de un aumento de la generación de radicales libres y/o reducción de la actividad fisiológica de las defensas antioxidantes contra los primeros; por tanto, comienzan a oxidar otro tipo de moléculas presentes en la célula como: lípidos de membrana, proteínas celulares, ADN y enzimas, impidiendo la respiración celular, ocasionando efectos destructivos y letales en las células (por ejemplo, apoptosis) y a su vez, dando lugar a múltiples enfermedades degenerativas, como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, arteriosclerosis y envejecimiento prematuro^{189,190}.

Además de las defensas antioxidantes de la célula o antioxidantes endógenos mencionadas en el párrafo anterior, existen también los antioxidantes exógenos como la vitamina C y E y pigmentos sintetizados por las plantas: clorofilas, carotenoides, antocianinas (flavonoides) y betalaínas. Todos estos antioxidantes exógenos se encuentran en las frutas, verduras, legumbres, raíces y tubérculos. De ahí que su inclusión en la dieta alimenticia es importante porque pueden reducir el riesgo de las enfermedades degenerativas^{191,192}.

Las betalaínas, los alimentos que las contienen y los extractos ricos en este tipo de pigmentos pueden exhibir actividad antioxidante o capacidad de captar radicales libres^{193,194,195}. Varios estudios sugieren que existe una relación entre la estructura de las betalaínas y las propiedades de captación de radicales, que se incrementa cuando hay un mayor número de grupos hidroxilo e imino^{196,197,198}. Se demostró que las betaxantinas, que no tienen grupos hidroxilo fenólicos, exhiben solamente una moderada actividad¹⁹⁹. En comparación con las betaxantinas, las betacianinas (betanina) tienen mayor actividad de captación de radicales libres^{200,201}.

¹⁸⁹ ANTOLOVICH, Michael, *et al.* Methods for testing antioxidant activity. En: *Analyst*. 2002. vol. 127, p. 183.

¹⁹⁰ POLJSAK, ŠUPUT y MILISAV. *Op. cit.*, p. 1.

¹⁹¹ CAI, SUN y CORKE, 2003. *Op. cit.*, p. 2288–2294

¹⁹² POLJSAK, ŠUPUT y MILISAV. *Op. cit.*, p. 1.

¹⁹³ HILOU, Adama; MILLOGO-RASOLOUDIMBY, Jeanne y NACOULMA, Odile Germaine. Betacyanins are the most relevant antioxidant molecules of *Amaranthus spinosus* and *Boerhavia erecta*. En: *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013. vol. 7, no. 11. p. 645–652.

¹⁹⁴ GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A., SZYMUSIAK, H., MALINOWSKA, P., Betanin, the main pigment of red beet: molecular origin of its exceptionally high free radical-scavenging activity. En: *Food Addit. Contam.* 2006. Vol. 23, p. 1079–1087

¹⁹⁵ FERNÁNDEZ-LÓPEZ, José A., *et al.* Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. En: *Plant Foods for Human Nutrition*, 2010. vol. 65, no. 3, p. 253-259.

¹⁹⁶ CAI, SUN y CORKE, 2003. *Op. cit.*, p. 2288–2294.

¹⁹⁷ GANDÍA-HERRERO, *et al* (2013). *Op. cit.*, p. 4294–4302.

¹⁹⁸ GANDÍA-HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA-CARMONA, Francisco. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. En: *Planta*, 2010. vol. 232, no. 2, p. 449-460.

¹⁹⁹ GANDÍA-HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA-CARMONA, Francisco. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. En: *Journal of natural products*, 2009. vol. 72, no. 6, p. 1142-1146.

²⁰⁰ BUTERA, Daniela, *et al.* Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. En: *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002. vol. 50, no. 23, p. 6895-6901.

²⁰¹ ESCRIBANO, Josefa, *et al.* Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. En: *Phytochemical Analysis*, 1998, vol. 9, no. 3, p. 124-127.

Esta actividad puede observarse con los ensayos *in vitro* DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) y TEAC (Trolox capacidad antioxidante equivalente). Utilizando el método DPPH se ha encontrado que las BC y BX presentan una actividad antioxidante aproximadamente 3-4 veces mayor en comparación con el ácido ascórbico, la catequina, y la rutina²⁰². Por su parte, con el ensayo TEAC se demostró que a pH > 4 la betanina tiene una actividad antioxidante 2 veces mayor que algunas antocianinas (cianidina-3-O-glucósido)²⁰³. Es necesario considerar que estos ensayos carecen de especificidad²⁰⁴. Por ejemplo, algunos autores han atribuido la alta actividad antioxidante de los extractos crudos de betalaínas a sus altas concentraciones de flavonoides y otros compuestos fenólicos²⁰⁵. La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto, ya que estos interactúan entre sí pudiendo producirse *efectos sinérgicos* o inhibitorios²⁰⁶. Por lo tanto, los resultados *in vitro* de la actividad antioxidante de este tipo de compuestos fitoquímicos deben ser interpretados con precaución²⁰⁷. Aun así, recientemente se han sugerido los posibles beneficios para la salud por parte de los extractos con contenido betalaínico, como por ejemplo la prevención del daño al ADN²⁰⁸, la inducción de la síntesis de glutatión endógeno en eritrocitos humanos²⁰⁹ y la protección contra la hemólisis de eritrocitos²¹⁰.

2.5 ASPECTOS METODOLÓGICOS

2.5.1 Extracción de betalaínas por maceración

Antes de llevarse a cabo la extracción de betalaínas, el material vegetal (MV) debe ser lavado, pelado y cortado en pequeñas trozos (en algunas ocasiones puede ser liofilizado o pulverizado). Seguido a esto, el MV es, ya sea presionado para producir un jugo que contiene el pigmento o sometido a métodos de extracción, principalmente,

²⁰² CAI, SUN y CORKE, 2003. Op. cit., p. 2288–2294.

²⁰³ GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, SZYMUSIAK y MALINOWSKA. Op. cit., p. 1079-1087.

²⁰⁴ POMPELLA, Alfonso, *et al.* The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. En: Nutrition, 2014, vol. 30, no. 7, p. 791-793.

²⁰⁵ GEORGIEV, Vasil, *et al.* Betalain production in plant *in vitro* systems. En: Acta Physiologiae Plantarum, 2008, vol. 30, no. 5, p. 583.

²⁰⁶ KUSKOSKI, E. Marta, *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Ciência E Tecnologia de Alimentos, 2005. vol. 25, no. 4, p. 726–732.

²⁰⁷ FRAGA, Cesar G.; OTEIZA, Patricia I.; GALLEANO, Monica. *In vitro* measurements and interpretation of total antioxidant capacity. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014, vol. 1840, no. 2, p. 931-934.

²⁰⁸ ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA, Małgorzata, *et al.* The beetroot component betanin modulates ROS production, DNA damage and apoptosis in human polymorphonuclear neutrophils. En: Phytotherapy Research, 2012. vol. 26, no. 6, p. 845-852.

²⁰⁹ TESORIERE, Luisa, *et al.* Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. En: The American journal of clinical nutrition, 2004, vol. 80, no. 2, p. 391-395.

²¹⁰ TESORIERE, Luisa, *et al.* Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to *ex vivo* induced oxidative hemolysis in humans. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. vol. 53, no. 4, p. 1266-1270.

sólido-líquido^{211,212}. Uno de los métodos convencionales más ampliamente utilizados es la maceración, la cual consiste en que el MV previamente preparado permanezca en contacto con un solvente en un recipiente cerrado y con agitación frecuente para aumentar la velocidad de extracción de los pigmentos. Durante este procedimiento, el solvente se difunde dentro del MV, en seguida ocurre la solubilización de las betalaínas presentes y finalmente el solvente rico en betalaínas se difunde fuera del MV²¹³. Debido a su alta hidrosolubilidad, las betalaínas pueden ser extraídas con agua o con solventes acuosos (HCl al 0,1% y buffers de fosfato-citrato); aunque en la mayoría de los casos es necesario el uso de soluciones metanólicas o etanólicas (20-50%) para completar la extracción²¹⁴ y porque además mejora significativamente la posterior separación entre betalaínas y proteínas (que también son extraídas con el agua), reduciendo así la interferencia de estas últimas en el análisis²¹⁵. Aunque la maceración es un proceso que requiere tiempo, resulta ser un método de extracción útil para compuestos lábiles al calor, ya que se lleva a cabo a temperatura ambiente. Otro factor importante que previene la degradación de las betalaínas durante este procedimiento es la ausencia de luz; además se recomienda la adición de antioxidantes (ácido ascórbico) y agentes quelantes (EDTA, ácido cítrico)²¹⁶. Sin embargo, la adición de estos antioxidantes y quelantes pueden interferir en los estudios sobre capacidad antioxidante²¹⁷.

2.5.2 Purificación, separación e identificación de betalaínas

La extracción con solventes implica la co-extracción de compuestos como azúcares, proteínas, entre otros; por lo que se requieren procesos posteriores de purificación²¹⁸. Se ha reportado que el extracto puede ser sometido a fermentación aeróbica con el fin de reducir los azúcares libres^{219,220}. Otros compuestos como proteínas e hidrocoloides (mucílagos) pueden ser eliminados a través de precipitación etanólica²²¹.

Para la separación de betalaínas también se han utilizado métodos como la electroforesis y técnicas cromatográficas (TLC, CC y HPLC). La electroforesis de zona

²¹¹ EDER. Op. cit., p. 863.

²¹² CARDOSO-UGARTE, G. A., *et al.* Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). En: LWT-Food Science and Technology, 2014, vol. 59, no. 1, p. 277.

²¹³ TIWARI, Brijesh K. y CULLENS, Patrick J. Extraction of Red Beet Pigments. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 375

²¹⁴ DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 261.

²¹⁵ CAI, SUN y CORKE, 2001. Op. cit., p. 1971–1978.

²¹⁶ MANCHALI, *et al.* Op. cit., p. 60.

²¹⁷ PIRES GONÇALVES, Leticia Christina, *et al.* A comparative study of the purification of betanin. En: Food Chemistry, 2012. vol. 131, no. 1, p. 234.

²¹⁸ BRAGA, M.E.M., *et al.* Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products. En: ROSTAGNO, Mauricio A. y PRADO, Juliana M. (Eds.). Natural Product Extraction: Principles and Applications. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2013. p. 231.

²¹⁹ AZEREDO. Op. cit., p. 2367.

²²⁰ CASTELLAR, M. R., *et al.* Fermentation of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits for betalains concentration. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2008, vol. 56, no. 11, p. 4253-4257.

²²¹ STINTZING, F.C., SCHIEBER, A. y CARLE, R. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002b. vol. 50, no. 8, p. 2303.

capilar (CZE) ha permitido la separación de la betanina e isobetanina y sus correspondientes agliconas²²². Por su parte, la cromatografía en capa delgada (TLC) ha permitido detectar la presencia de betaxantinas y betacianinas gracias a que los pigmentos amarillos y rojos pueden observarse sin necesidad de reveladores²²³. Sin embargo, estas técnicas han presentado algunos inconvenientes, por ejemplo: en la CZE, los tiempos de análisis son prolongados, y en la TLC, los valores R_f (factor de retención) son bajos debido a la polaridad de la betalaínas, lo que implica separaciones inadecuadas^{224,225}.

Por su parte, la cromatografía en columna (CC) ha utilizado varios tipos de resinas o soportes no sólo para la purificación sino también para la separación. Por ejemplo, la Amberlita XAD-7 puede eliminar proteínas, mucílagos, pectinas y solutos de bajo peso molecular; y la Sephadex G-25 puede fraccionar las mezclas de polisacáridos, polipéptidos, proteínas globulares y ácidos nucleicos; a su vez que permiten fraccionar las betalaínas²²⁶. En otro estudio realizado por Stintzing *et al*²²⁷ utilizaron Amberlita XAD-16 HP y cartuchos de C₁₈ para la semi-purificación y concentración de los extractos betalaínicos, incluyendo la separación de betaxantinas y betacianinas utilizando las características de retención dependientes del pH.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es ampliamente utilizada en el estudio de betalaínas porque al estar acoplada a DAD (detector de arreglo de diodos), MS (espectrometría de masas) y/o NMR (resonancia magnética nuclear) la separación e identificación pueden llevarse a cabo simultáneamente. Generalmente se utilizan soportes de fase reversa (columnas C₁₈ o C₈) y con tamaños de partícula entre 3 y 10 µm. La separación de los pigmentos, a escala analítica y semi-preparativa, se favorece utilizando solventes que consisten en mezclas de agua-metanol o agua-acetonitrilo acidificadas con ácido acético, fórmico o fosfórico^{228,229}. La presencia de BX y BC se monitorea principalmente alrededor de 480 y 540 nm, respectivamente. Los espectros de absorción en el rango visible y UV-Vis proporcionan información estructural básica del tipo de betalaína y sus posibles sustituciones (ver *características espectrales*, sección 2.4.1). En general, en HPLC fase reversa, las BX eluyen más rápido que las BC. En la identificación de BC, usualmente se detectan dos formas isoméricas: betacianinas (2S/15S) e isobetacianinas (2S/15R) (también llamada isoforma), que se

²²² STUPPNER, Hermann; EGGER, Richard. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris*. *En*: Journal of Chromatography A, 1996. vol. 735, no. 1, p. 409-413.

²²³ DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ y PAREDES-LÓPEZ. *Op. cit.*, p. 262.

²²⁴ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. *Op. cit.*, p. 200.

²²⁵ TREJO-TAPIA, Gabriela, *et al*. Effect of screening and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture. *En*: Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, vol. 9, no. 1, p. 32-36.

²²⁶ 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, 2013. vol. 61, no. 49, p. 11995-12004.

²²⁷ STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. *Op. cit.*, p. 2303.

²²⁸ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. *Op. cit.*, p. 200-203.

²²⁹ OBÓN, Concepción y RIVERA, Diego. Plant Pigments and their manipulation. *En*: Economic Botany, 2006. vol. 60, no. 1, p. 92-92.

distinguen por presentar t_R diferentes. El t_R de la isobetanina es mayor al de la betanina, ya que la primera tiene una mayor interacción con la fase estacionaria no-polar, en concordancia con el momento dipolar calculado para estas sustancias en fase gaseosa y en agua²³⁰. En general, los compuestos con configuración 15R interactúan con mayor fuerza con la fase estacionaria, por tanto presentan mayores t_R que aquellos con configuración 15S²³¹. Las neobetacianinas y neobetacianinas descarboxiladas muestran t_R superiores debido a la formación de compuestos menos polares que las correspondientes BC, se distinguen claramente por la falta del segundo pico R-isómero y se detectan a longitudes de onda menores^{232,233}.

Detalles sobre la estructura molecular de los pigmentos se pueden obtener utilizando métodos analíticos sofisticados como la espectrometría de masas (MS) y NMR multidimensional²³⁴. Para las betalaínas, la MS de ionización electrospray (ESI) en modo positivo funciona adecuadamente. Los espectros de masas proporcionan información sobre el compuesto principal y los posibles iones fragmentos o residuos químicos calculados a través de la diferencia de masa son útiles en la interpretación de los datos de NMR²³⁵. La evidencia estructural inequívoca sólo puede ser hallada por mediciones de NMR. Sin embargo, la identificación tentativa de las betalaínas conocidas puede ser deducida por su comportamiento cromatográfico y comprobada mediante el análisis comparativo, de sus tiempos de retención (t_R) y espectros de absorción y masas, con estándares o con la literatura científica disponible; sin que sea necesario recurrir a técnicas más complejas como el NMR que requieren un aislamiento complicado de cada betalaína presente en el extracto^{236,237,238}.

Mientras que la identificación de pigmento a menudo se basa en las propiedades espectrales y el comportamiento cromatográfico de moléculas individualmente eluidas, las cuantificaciones se basan principalmente en las mediciones de absorbancia. La espectroscopia de absorbancia (UV-Vis) constituye la forma más sencilla de identificar y cuantificar los principales pigmentos presentes en una mezcla²³⁹. Debido a que el entorno del pigmento (por ejemplo, disolvente, temperatura, ligación a proteínas, etc) puede influir considerablemente en la posición del máximo de absorción y la forma del espectro, la medición precisa de la concentración de pigmento requiere que este se disuelva en un disolvente para los cuales el coeficiente de absorbancia específico (o molar) haya sido determinados²⁴⁰.

²³⁰ PIRES GONÇALVES. Op. cit., p. 236.

²³¹ 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*, 2009. vol. 1216. p. 6893.

²³² WYBRANIEC, *et al.*, 2013. Op. cit., p. 6465-6476.

²³³ WYBRANIEC y MIZRAHI, 2005. Op. cit., 6704-6712.

²³⁴ SCHOEFS, Benoît. Determination of pigments in vegetables. *En: Journal of Chromatography A*, 2004. vol. 1054, p. 217-226

²³⁵ KHAN y GIRIDHAR. Op. cit., p. 269.

²³⁶ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 200-203.

²³⁷ STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit., p. 517.

²³⁸ OBÓN y RIVERA. Op. cit., p. 328-329.

²³⁹ SCHOEFS. Op. cit., p. 217-226

²⁴⁰ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 204.

Adicional a todo lo anterior, existe una prueba química sencilla comúnmente utilizada para diferenciar betalainas de antocianinas que consiste en adicionar al extracto una base fuerte (KOH o NaOH). Esta prueba resulta positiva para betalainas si el extracto se torna amarillo; en cambio si se torna azul-verdoso son las antocianinas las que están presentes²⁴¹.

2.5.3 Cuantificación del contenido fenólico

Los compuestos polifenólicos son constituyentes importantes de los alimentos debido a su actividad antioxidante capaz de quelar iones metálicos, inactivar cadenas de radicales libres de lípidos y prevenir la conversión de hidroperóxido en reactivos oxiradicales que afectan el buen funcionamiento de los organismos vivos²⁴². Por tanto su cuantificación se ha ido desarrollando desde 1927, cuando Folin y Ciocalteu propusieron un método espectrofotométrico, que se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por un reactivo de molibdeno y tungsteno en medio básico. Este método fue modificado en 1965 por Singleton y Rossi, quienes lo mejoraron con el uso de un reactivo heteropolianión molibdotungstofosfórico ($3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ y $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 14\text{WO}_3 - 5\text{MoO}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$), conocido como el reactivo de Folin-Ciocalteu, que es capaz de oxidar a los fenoles con mayor especificidad. En medio básico, la transferencia de electrones reduce estos complejos fosfomolibdico-fosfotungsténico a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23})²⁴³. La intensidad de la coloración azul ($\lambda_{\text{máx}} = 765\text{ nm}$) es proporcional a la concentración de fenoles²⁴⁴, que se cuantifican con base a una recta de calibración, para la cual se recomienda utilizar soluciones patrón de ácido gálico²⁴⁵.

Aunque el método F-C es simple, preciso y sensible, es criticado ya que carece de selectividad y puede verse afectado por otras moléculas reductoras de naturaleza no fenólica que interfieren en las determinaciones y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas; entre ellas destacan las proteínas, algunos aminoácidos y nucleótidos, aminas aromáticas, azúcares (fructosa y sacarosa), y el ácido ascórbico^{246,247}. Además, la falta de estandarización de los métodos, que no sólo emplean ácido gálico (estándar recomendado), sino otros ácidos como el tánico, clorogénico, cafeico y ferúlico, da lugar a diferentes unidades de expresión de resultados dificultando la comparación entre

²⁴¹ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 202-204.

²⁴² DE OLIVEIRA, A.C., *et al.* Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *En*: Food Chemistry. 2009. vol. 115, no. 2, p. 469-475. p. 471.

²⁴³ SEEJA, N., *et al.* Investigation of total phenolic contents, antioxidant activities and analyses of active compounds in some sweet peppers (*Capsicum annum* L.). *En*: NU Science Journal, 2014. vol. 11, no. 1. p. 40.

²⁴⁴ ROVER, M.R. y BROWN, R.C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *En*: Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 2013. v. 104, p. 367.

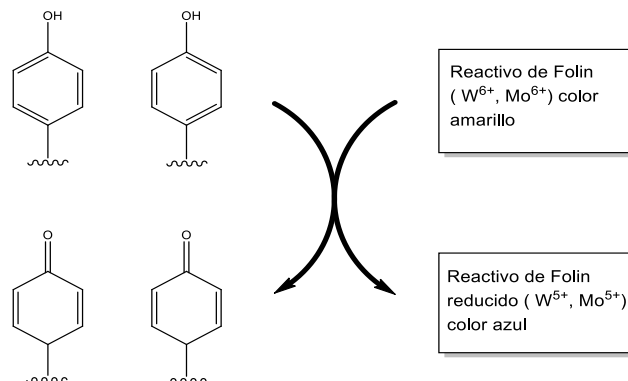
²⁴⁵ PRIOR, R.L., WU, X. y SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *En*: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. vol. 53, p. 4297

²⁴⁶ PRIOR, WU y SCHAICH. Op. cit., p. 4297

²⁴⁷ ROVER y BROWN. Op. cit., p. 367.

investigaciones²⁴⁸. Sin embargo, este método sigue siendo ampliamente utilizado en el análisis de las propiedades antioxidantes de los alimentos, dada la correlación generalmente evidenciada entre el contenido total de fenoles y la capacidad antioxidante²⁴⁹.

Figura 19. Esquema de la reacción de fenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu.



Fuente: Adaptado de García (2015).

2.5.4 Actividad antioxidante

Una característica importante de las betalainas y que generalmente es evaluada en sustancias con potencial para su uso en la industria de alimentos es la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas para evaluar la actividad antioxidante total *in vitro* de un alimento, mezcla o compuesto consiste en establecer su actividad frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* dan tan sólo una idea aproximada de lo que sucede en situaciones complejas *in vivo*. Sin embargo, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos²⁵⁰ son utilizados para determinar la capacidad antioxidante *in vitro*; entre ellos, los más aplicados son TEAC y DPPH.

2.5.4.1 Método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox). Este método fue desarrollado originalmente por Miller y Rice-Evans (1993) para la medición de la capacidad antioxidante del plasma humano en infantes. Re y otros (1999) modificaron el ensayo para la generación directa de ABTS^{•+} (ácido 2,2 – azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) sin intermediarios radicales y lo aplicaron a los

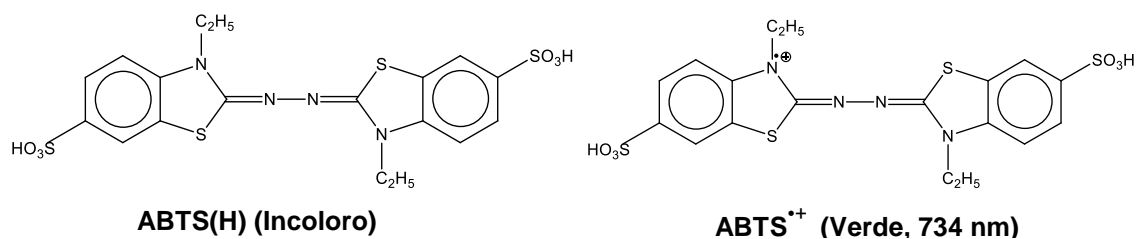
²⁴⁸ KARADAG, Ayse; OZCELIK, Beraat; SANER, Samim. Review of methods to determine antioxidant capacities. *En: Food Analytical Methods*, 2009. vol. 2, no. 1, p. 47.

²⁴⁹ CRAFT, *et al.* Phenol-based Antioxidants and the In vitro Methods Used for Their Assessment. *En: Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012. vol. 11, no. 2. p. 161.

²⁵⁰ KUSKOSKI, *et al.* Op. cit., p. 726–732.

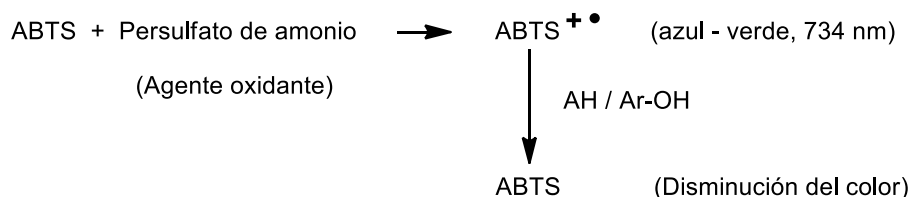
antioxidantes hidrófilos y lipófilos. Se fundamenta en la capacidad de eliminación que tiene un antioxidante frente al catión radical de larga duración $ABTS^{+\bullet}$ ²⁵¹. El catión radical $ABTS^{+\bullet}$ se forma por la oxidación del ABTS al someterlo a reacción con persulfato de potasio u otros oxidantes, y se caracteriza por tener una coloración azul-verdosa con varios máximos de absorción a las siguientes longitudes de onda: 415, 645, 734 y 815 nm. La mayoría de investigaciones seleccionan las longitudes de onda de 415 y 734 nm para determinar espectrofotométricamente la disminución de absorbancia del radical en presencia de los compuestos de análisis, a un tiempo establecido (4-6 min). Esta decoloración se compara con la decoloración originada por un patrón derivado de la vitamina E conocido como Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) mediante una curva de calibración; de manera que los resultados de los compuestos analizados se expresan en relación a Trolox; razón por la cual se conoce también como el ensayo TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox)^{252,253}. En la figura 20 se muestran las estructuras del ABTS y su radical, y la figura 21 indica un esquema general del método.

Figura 20. Estructura del ABTS ácido 2.2 – azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico y su radical.



Fuente: Adaptado de Prior (2005).

Figura 21. Esquema general de la reacción con ABTS.



Fuente: Adaptado de Prior (2005).

Wybraniec *et al*²⁵⁴ propuso el primer mecanismo de reacción entre la betanina y el radical ABTS. Según esta reacción la betanina es oxidada por el $ABTS^{+\bullet}$ en dos pasos como se muestra en la Figura 22. Primero, la betanina forma el radical semiquinona y posteriormente se forma el intermediario quinona que se reorganiza al producto de oxidación más estable (2-descarboxi-2,3-dehidrobetanina).

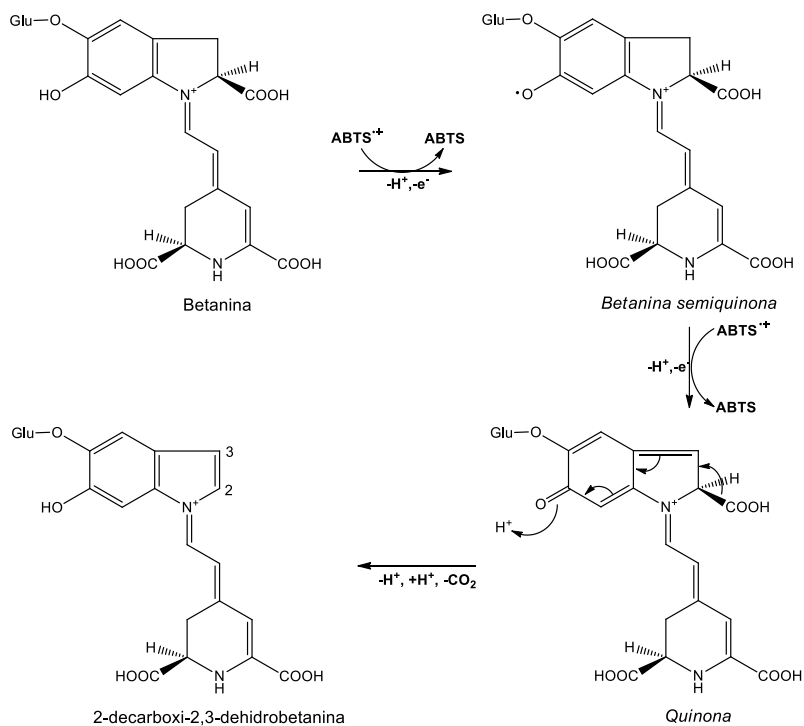
²⁵¹ CRAFT. Op. cit., p. 161.

²⁵² CRAFT. Op. cit., p. 161.

²⁵³ PRIOR, WU y SCHAICH. Op. cit., p. 4295.

²⁵⁴ WYBRANIEC, *et al.*, 2013. Op. cit., p. 6465-6476.

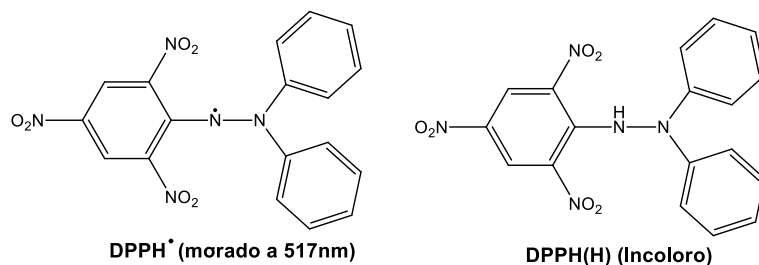
Figura 22. Oxidación de la betanina por acción del radical ABTS.



Fuente: Wybraniec (2013).

2.5.4.2 *Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)*. Este método, ampliamente utilizado, fue desarrollado en 1995 por Brand-Willian y se basa en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes frente al radical DPPH[•]. A diferencia del ABTS^{•+}, el DPPH[•] no tiene que ser generado, está disponible comercialmente y es uno de los pocos radicales orgánicos de nitrógeno estable, su coloración es morada y su $\lambda_{\text{máx}}$ corresponde a 515 nm. La capacidad antioxidante se evalúa mediante la medición espectrofotométrica de la pérdida de color del DPPH[•] a 515 nm después de la reacción con los compuestos a analizar. Las estructuras del DPPH morado y decolorado se muestran en la figura 23²⁵⁵.

Figura 23. Estructura del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y su radical.



Fuente: Schaich (2015).

²⁵⁵ PRIOR, WU y SCHAICH. Op. cit., p. 4295.

Los ensayos ABTS y DPPH son operacionalmente simples, lo que probablemente explica su uso extendido en la determinación de la actividad antioxidante. Sin embargo, estos radicales no se encuentran en los seres vivos y por lo tanto representa una fuente de radicales "no fisiológicos". A pesar de esta desventaja estos métodos siguen siendo utilizados porque proporcionan una estimación de la actividad antioxidante y permiten establecer un orden de clasificación de los antioxidantes²⁵⁶.

²⁵⁶ PRIOR, WU y SCHAICH. Op. cit., p. 4295.

3. ANTECEDENTES

Las betalaínas están adquiriendo popularidad para el uso como colorantes en la industria alimentaria. Diversos autores han reportado que además de su valor estético (color), tienen efectos positivos para la salud humana debido a sus propiedades farmacológicas, a diferencia de los colorantes sintéticos que pueden causar efectos adversos en la salud. El creciente interés de los consumidores en los aspectos estéticos, nutricionales y de seguridad de los alimentos ha aumentado la demanda de las betalaínas para ser utilizadas como colorantes alternativos en los productos alimenticios. El estudio de las betalaínas es relativamente reciente en comparación con otros pigmentos naturales tales como antocianinas, carotenoides o clorofilas que se han investigado en mayor proporción. De hecho, hasta el momento se han reportado solamente 75 estructuras de betalaínas (entre betacianinas, BC y betaxantinas, BX), que son pocas cuando se considera que se han hallado más de 550 antocianinas^{257,258,259}.

La especie vegetal más conocida en cuanto a su contenido betalaínico es la remolacha roja, de la cual se extrae el “rojo de remolacha” o E-162 utilizado como colorante alimenticio industrial²⁶⁰. Varios autores^{261,262,263} han investigado los pigmentos de la remolacha roja (*Beta vulgaris*) encontrando que contiene tanto pigmentos rojo-púrpura como amarillos y concluyendo la betacianina mayoritaria de esta raíz es la betanina y la betaxantina principal es la vulgaxantina I. La betanina (betanidina-5-O- β -glucósido) de la remolacha roja fue la primera betacianina estructuralmente identificada^{264,265}. Adicionalmente en el estudio de Gasztonyi *et al*²⁶⁶ encontraron que la mayor relación BC/BX la tiene la variedad ‘Rubin’ con un valor de 2,08 considerandose como el más adecuado para la producción colorante alimenticio. En esta misma investigación encontraron que el nivel de betacianina en 5 variedades de remolacha roja varía de 440 a 500 mg de betalaína/kg y los pigmentos amarillos varían de 320 a 420 mg de vulgaxantina I/kg.

²⁵⁷ GENGATHARAN, DYKES y CHOO. Op. cit., p. 645-649.

²⁵⁸ ABDEL-WAHAB y EL-DEEN MORAM. Op. cit., p. 0748233711433935.

²⁵⁹ STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit., p. 514.

²⁶⁰ AZEREDO. Op. cit., p. 2365.

²⁶¹ NEMZER, Boris, *et al*. Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. En: Food chemistry, 2011. vol. 127, no. 1, p. 42-53.

²⁶² GASZTONYI, Magdolna Nagy, *et al*. Comparison of red beet (*Beta vulgaris* var conditiva) varieties on the basis of their pigment components. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, vol. 81, no. 9, p. 932-933.

²⁶³ STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. Op. cit., p. 2302-2307.

²⁶⁴ MABRY, T. J.; DREIDING, A. S. The betalains. En: Recent Advances in Phytochemistry. Appleton-Centry-Crofts, NY, 1968.

²⁶⁵ AZEREDO. Op. cit., p. 2365.

²⁶⁶ GASZTONYI. Op. cit., p. 932-933.

Kanner *et al*²⁶⁷ también determinó que la remolacha roja contiene altas cantidades de betanina, que van desde 300-600 mg/kg de peso fresco, con concentraciones más bajas de isobetanina, betanidina y betaxantinas.

Adicionalmente, se han explorado otras fuentes de betalaínas, principalmente, los frutos de cactáceas (tunas y pitayas) y algunas flores de Amaranteaceas²⁶⁸. La filocactina ha sido reportada como la BC mayoritaria en la flor del cactus de navidad de color rojo-púrpura (*Schlumbergera x buckleyi*) estudiada por Kobayashi *et al*²⁶⁹ y también es uno de los compuestos principales en las pitayas rojo-púrpura (*Hylocereus polyrhizus*) estudiadas por Stintzing *et al*²⁷⁰ y Wybraniec *et al*²⁷¹. Mientras que la amarantina, fue la BC mayoritaria en el Amaranto (*Amaranthus tricolor*)²⁷². Los cultivos de tuna que van del amarillo al rojo contienen un total de betalaínas de hasta 90 mg/Kg de pulpa fresca²⁷³; mientras que los cultivares de pitaya rojos contienen concentraciones que oscilan entre 230 y 390 mg/Kg. Por su parte, Mello *et al*²⁷⁴ reportan 101,04 mg de betanina/100 g en la pitaya (*Hylocereus undatus*). Además, se informó del contenido total de betacianinas de *Amaranthus* varía de 461 a 1990 mg/Kg de peso fresco.

Cai *et al*²⁷⁵ encontraron que la actividad antioxidante en todas las betalaínas y fracciones extraídas de plantas *Amaranthaceae* mediante el método DPPH está entre 3,4 y 8,4 μ M. Las betacianinas tipo gomprenina (promedio: 3,7 μ M) y betaxantinas (promedio: 4,2 μ M) demostraron la actividad antioxidante más potente, 3-4 veces más fuerte que el ácido ascórbico (13,9 μ M) y también más fuerte que la rutina (6,1 μ M) y catequina (7,2 μ M). Además encontraron que la actividad de eliminación de radicales libres de las betalaínas generalmente aumentó con el número de grupos hidroxilo/imino y, por otra parte, depende de la posición de los grupos hidroxilo y glicosilación de las agliconas en las moléculas de betalaínas.

También se han publicado algunos estudios sobre la composición química en acelga. Por ejemplo Kugler *et al*²⁷⁶ reportaron que la acelga contiene alrededor de 51,1 μ g betacianinas/g de peso fresco y 49,7 μ g de betaxantinas/g de peso fresco.

²⁶⁷ KANNER, HAREL y. GRANIT. 2001. Op. cit., p. 5178–5185.

²⁶⁸ AZEREDO. Op. cit., 2367.

²⁶⁹ KOBAYASHI, Naoko, *et al*. Betalains from Christmas cactus. En: *Phytochemistry*, 2000, vol. 54, no. 4, p. 419-426.

²⁷⁰ STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. En: *Food Chemistry*, 2002a. vol. 77, no. 1, p. 101-106.

²⁷¹ WYBRANIEC, Slawomir, *et al*. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. En: *Phytochemistry*, 2001. vol. 58, no. 8, p. 1209-1212.

²⁷² BISWAS, Mousumi; DEY, Satyahari; SEN, Ramkrishna. Betalains from *Amaranthus tricolor* L. En: *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013. vol. 1, no. 5.

²⁷³ BUTERA, Daniela, *et al*. Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. En: *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002. vol. 50, no. 23, p. 6895-6901.

²⁷⁴ CAI, Yizhong, *et al*. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998. vol. 46, no. 6, p. 2063-2070.

²⁷⁵ CAI, SUN y CORKE, 2003. Op. cit., p. 2288-2294.

²⁷⁶ KUGLER, Florian; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by high-performance liquid

Otras matrices vegetales también contienen betalaínas y han sido estudiadas con menor intensidad como es el caso del ulluco (*Ullucus tuberosus*), un tubérculo Andino, motivo de esta investigación. Las referencias respecto a los estudios de betalaínas en el *U. tuberosus* son recientes y escasas.

En el año 2006, Campos *et al*²⁷⁷, realizaron un estudio para identificar los metabolitos secundarios en 4 tubérculos (papa, oca, mashua y ulluco) del Perú y determinar su capacidad antioxidante usando el radical ABTS. Investigaron 15 variedades de ulluco y encontraron por primera vez que estos contienen betalaínas, calcularon que las betaxantinas pueden variar de 22-96 µg por gramo de peso fresco y solamente se evidencio contenido de betacianinas en el ulluco de coloración rojiza (64 µg/g). También encontraron que estas variedades de *U. tuberosus* tienen un contenido fenólico desde 0,41 a 0,70 mg equiv. de ácido clorogénico/g peso fresco y una capacidad antioxidante hidrofílica que va desde 483 a 1524 µg TE (equiv. trolox)/g de peso fresco. Los autores sugirieron que esta capacidad puede deberse principalmente a la cantidad de polifenoles previamente reportados para el ulluco (incluyendo rutina, narcisina and kaempferol 3-O-(2'',6''-di-O- α -L-rhamnopyranosil)- β -D-glucopiranosido²⁷⁸) y no al contenido de BX.

Dos años más tarde, en 2008, Svenson *et al*²⁷⁹ utilizaron por primera vez LC–DAD–ESI–MS–MS² para investigar diferentes variedades de *U. tuberosus* (rojo, amarillo y con manchas rojas) que fueron introducidos en Nueva Zelanda. Lograron identificar 32 estructuras de betalaínas y se encontró que tanto los tubérculos amarillos como los rojos eran ricos en betaxantinas amarillas, y las más prominentes entre las 20 identificadas eran histidina-betaxantina, arginina-betaxantina y glutamina-betaxantina. Las restantes 12 estructuras se identificaron en los tubérculos de color rojo como betacianinas, aproximadamente el 50% de su contenido es betanina/isobetanina. Los niveles de betacianina y betaxantina estuvieron por encima de los 70 y 50 µg/g de peso fresco en tubérculos rojos y amarillos, respectivamente; las betacianinas estaban por debajo de los niveles cuantificables en los tubérculos amarillos y la interferencia de las betacianinas en las medidas de betaxantinas fue discutida. Este fue el primer informe que describió las betacianinas y betaxantinas paternas en una planta de la familia Basellaceae.

El grupo Color y Calidad de Alimentos (Universidad de Sevilla, España) en colaboración con el grupo de Investigación GIPB, efectuó un trabajo preliminar sobre la estabilidad del color del extracto de la cáscara de este tipo de tubérculo²⁸⁰. Se encontró que este

chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, vol. 52, no. 10, p. 2975-2981.

²⁷⁷ CAMPOS, *et al*. Op. cit., p. 1481–1488.

²⁷⁸ DINI, *et al*. Op. cit., p. 1053-1058.

²⁷⁹ SVENSON, *et al*. Op. cit., p. 7731.

²⁸⁰ CEJUDO-BASTANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson; MOSQUERA, Natalia y HEREDIA, Francisco J. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. En: Food Research International, 2014. vol. 64, p. 465-471.

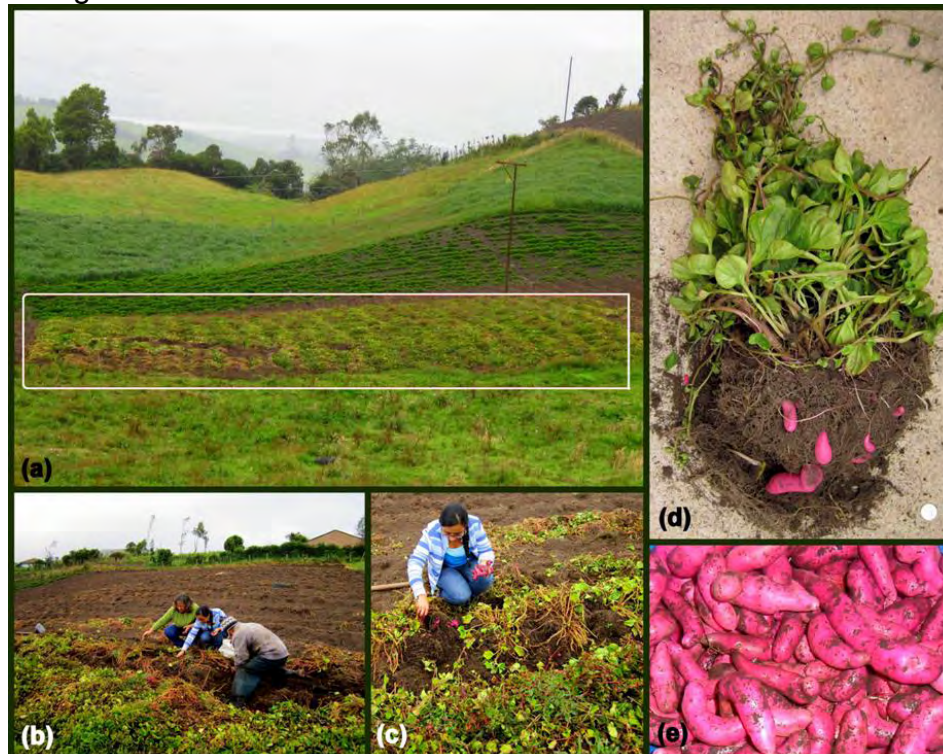
extracto es adecuado para ser añadido como colorante natural en un amplio rango de pH, especialmente pH ácidos, por lo que su aplicación es prometedora para desplazar a los colorantes sintéticos.

4. METODOLOGÍA

4.1 RECOLECCIÓN DEL TUBÉRCULO

El Ulluco de color magenta se recolectó en la vereda Cruz de Amarillo del corregimiento de Catambuco (figura 24a), localizada a 10 Km al sur de la ciudad de San Juan de Pasto (capital del departamento de Nariño), en la coordenada geográfica 1°7'23" Lat. N y 77°18'53.05" Long. W., a 3215 msnm y con temperatura promedio de 11 °C²⁸¹. El criterio de selección del tubérculo se basó en un muestreo aleatorio simple considerando factores como madurez para el consumo, uniformidad del color, ausencia de aparente daño físico y características similares de forma y tamaño. En las figuras 24b y c se evidencia el muestreo realizado. Un ejemplar de la planta de ulluco (figura 24d) se clasificó taxonómicamente en el herbario de la Universidad de Nariño. Los tubérculos recolectados se observan en la figura 24e.

Figura 24. Fotografías del muestreo del ulluco.



*En (a) se ha enmarcado en un recuadro blanco el sembrado de ulluco donde se realizó el muestreo. En (b) y (c) se evidencia la recolección de los tubérculos. En (d) y (e) se encuentra el ejemplar de la planta de ulluco y algunos de los tubérculos recolectados sin lavar, respectivamente. Fuente: Esta investigación.

²⁸¹ CULTURA Y TURISMO. Catambuco: datos generales [en línea]. [Pasto]: Subsecretaría de Sistemas de Información, 2015. Publicado 29 noviembre de 2001. Disponible en <http://www.culturapasto.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=135:catambuco&catid=27:corregimientos&Itemid=23>

4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL TUBÉRCULO

Los parámetros que se describen a continuación se llevaron a cabo por triplicado.

4.2.1 Determinación de porcentaje de humedad

Se siguió un método por secado en estufa que consistió en someter al ulluco, previamente pesado (M_1) y cortado en finas rodajas, a 60°C por 48 horas y luego a 105°C durante 12 horas más. Posteriormente, la muestra se colocó en el desecador por 20 minutos y se registró su masa. Este proceso se repitió hasta que se obtuvo un valor de masa constante, la cual corresponde a la masa seca (M_2). Esta metodología gravimétrica²⁸² permitió encontrar el porcentaje de humedad (%H) con la ecuación 1.

$$\%H = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

4.2.2 Determinación de pH

Se basó en la metodología aplicada por Ortega²⁸³ donde la medida de pH se realizó a una muestra de ulluco debidamente homogeneizada con agua destilada en relación 1:1, utilizando un pHmetro METROHM modelo 691 (ver Anexo A).

4.2.3 Determinación de sólidos solubles totales (SST).

Con base en la metodología de Salazar²⁸⁴ se midieron los sólidos solubles totales del jugo obtenido a partir de la maceración de 3 tubérculos. Debido a la turbidez del jugo, fue necesaria su filtración antes de colocar dos gotas sobre el prisma de un refractómetro marca ATAGO. Se tomó la lectura en °Brix.

4.2.4 Determinación de firmeza

Este proceso se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Ortega²⁸⁵. En primer lugar, fue necesario realizar un corte plano y liso sobre la superficie del tubérculo con una cuchilla (pelafrutas). Luego, con ayuda de un penetrómetro (FT 327, QA supplies) provisto con un punzón de 10 mm, se aplicó la compresión necesaria hasta atravesar el tubérculo y se tomó la lectura de manera directa en unidades de Kgf (ver Anexo B).

²⁸² AREDO, V. *et al.* Deshidratación osmótica de ulluco (*Ullucus tuberosus*) con y sin recubrimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y sacarosa. *En: Agroindustrial Science*, 2013. vol. 2, p. 127.

²⁸³ ORTEGA, D., NÚÑEZ, M. y PORTILLA, M. Empacado en atmósfera modificada en la conservación del ulluco. *En: Alimentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2011. 1. Vol. 9, No. 2, p. 148.

²⁸⁴ SALAZAR, M., ZAMBRANO, J. y VALECILLOS, H. Evaluación del rendimiento y características de calidad de trece clones avanzados de papa (*Solanum tuberosum* L.). *En: Agricultura Andina*, 2008. Vol. 14, p. 108.

²⁸⁵ ORTEGA, NÚÑEZ y PORTILLA. *Op. cit.*, p.148.

4.3 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se seleccionaron aproximadamente 4,4 kg de los mejores ejemplares de ulluco como los mostrados en la figura 25a. Estos se lavaron, secaron y posteriormente, se pelaron manualmente separando la zona cortical blanca-amarillenta de la porción superficial magenta, donde se encuentran los pigmentos de interés (figura 25b). De la muestra se obtuvieron 1,2 Kg de cáscara, la cual se dividió en trozos más finos de entre 0,5 y 1 cm² (figura 25c) con el propósito de lograr un tamaño adecuado del material vegetal de partida para el procedimiento de extracción.

Figura 25. Aspecto del ulluco recolectado.



(a) Ulluco “Chincheño” limpio y seco, **(b)** Corte transversal del ulluco mostrando la localización de los pigmentos color magenta (tipo betalaina) en la zona cortical, **(c)** Cáscara dividida en pequeños trozos. Fuente: Esta investigación.

4.4 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS

4.4.1 Obtención del extracto crudo (EC)

Se utilizó una versión modificada del procedimiento de maceración empleado por Svenson²⁸⁶: 1,15 Kg de peso fresco de la cáscara se sometieron a agitación continua (220 rpm) con metanol al 60%, por cada gramo de material vegetal se adicionaron 2 mL del solvente. La maceración se llevó a cabo durante 6 horas, a temperatura ambiente y protegida de la luz. Después de transcurrido este tiempo, la suspensión resultante se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos; luego, el sobrenadante obtenido se concentró a 45°C en un rotaevaporador hasta que el volumen inicial de solvente se redujo a la mitad. Posteriormente, el agua se eliminó por medio de secado en plancha a 45°C, resultando un sólido que se denominó extracto crudo (EC). Este procedimiento se puede observar en la figura 26.

²⁸⁶ SVENSON, *et al.* Op. cit., p. 7731.

Figura 26. Pasos para la obtención del extracto crudo (EC).



Fuente: Esta investigación.

4.4.1.1 *Determinación de la presencia de betalaínas en la muestra.* Al extracto crudo (EC) se le agregaron unas gotas de KOH 2M y se observó el cambio en su coloración. Adicionalmente, se midió el espectro de absorción de una solución del EC y se determinaron los máximos de absorción.

4.4.2 Obtención del extracto purificado (EP)

Para simplificar el extracto crudo, se realizó la separación de mucílagos y proteínas siguiendo la metodología de Stintzing *et al*²⁸⁷ con algunas modificaciones, así: el extracto crudo obtenido anteriormente se disolvió en agua en proporción 1:10 (gramo de muestra/mililitro de agua) y luego, por cada mililitro de EC se adicionaron 2 mL de etanol al 96%. Al cabo de 20-30 minutos se observó una suspensión que se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante traslucido se rotaevaporó a 45°C y posteriormente se sometió a secado obteniendo un sólido de color rojizo brillante como el de la figura 27, al cual se le denominó extracto purificado (EP).

Figura 27. Apariencia del sólido correspondiente al extracto purificado (EP).



Fuente: Esta investigación

²⁸⁷ STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. Op. cit., p. 2303.

4.4.3 Cuantificación del contenido betalaínico

La cuantificación espectroscópica de los pigmentos tipo betalaína se realizó de acuerdo al método de Svenson *et al*²⁸⁸ con algunas modificaciones: Alícuotas de 200 µL del extracto crudo (EC) fueron diluidas con 1800 µL de agua desionizada y luego, en un espectrofotómetro Pharo-300, se determinaron las absorbancias máximas a 538 nm para betacianinas y a 480 nm para betaxantinas, que permitieron estimar la concentración de pigmentos [B] en microgramos por gramo de material vegetal, mediante la ecuación 2. Las medidas se realizaron por triplicado.

$$[B] = \frac{(AD_f VM_w)}{(mL\varepsilon)} \times 1000 \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde: A = absorción en el máximo de absorción; D_f = factor de dilución (10 en este caso); V = volumen final de cada extracto (mL); M_w = peso molecular de la betalaína más abundante: betanina (550 g/mol) en el caso de las betacianinas o vulgaxantina I (339 g/mol) para las betaxantinas; m = masa de la cáscara de ulluco (g) que se utilizó para generar el extracto analizado; L = longitud de la cubeta (1 cm); ε = coeficiente de extinción, para la determinación de betacianina, fue utilizado el coeficiente de extinción para betanina (60000 L/mol.cm), mientras que un coeficiente de extinción media de 48000 L/mol.cm se utilizó para aproximar la cantidad de betaxantinas.

4.5 SEPARACIÓN DE BETAXANTINAS Y BETACIANINAS

Para la separación de betaxantinas y betacianinas se utilizó una columna cromatográfica de 15 x 1,1 cm, empacada con 25g de silica C₁₈ como fase estacionaria, la cual fue activada con 3 volúmenes de metanol y acondicionada con 3 volúmenes de agua acidificada. La elución de los compuestos requirió las 3 fases móviles que se registran en la tabla 3 y su elección fue determinada por medio de diferentes ensayos basados en el protocolo de Stintzing *et al*²⁸⁹.

Tabla 3. Solventes utilizados como fase móvil en la cromatografía de columna con silica C₁₈.

Fase móvil (FM)	Solvente
Inicial (FM-1)	Agua acidificada con ácido fórmico (pH=3)*.
Intermedia (FM-2)	Metanol acidificado [Metanol: agua acidificada (solución inicial), 95:5]
Final (FM-3)	Acetona acidificada [Acetona: agua acidificada (solución inicial), 60:40]

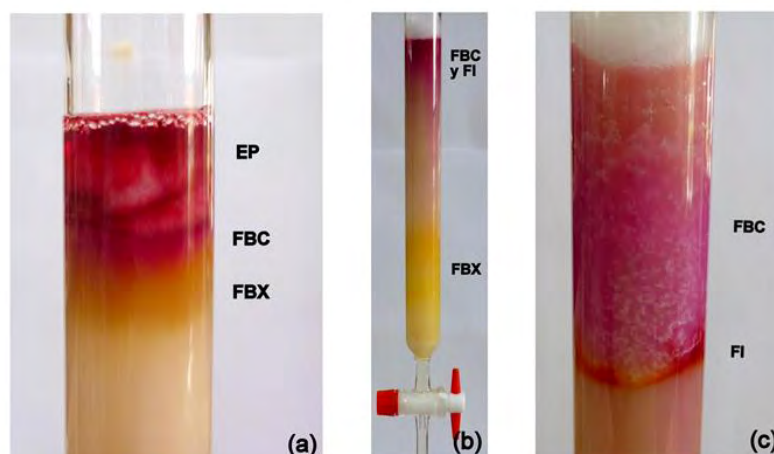
*Se agregó una gota de HCOOH 98% por cada 150 mL de H₂O.

²⁸⁸ SVENSON, *et al*. Op. cit., p. 7732.

²⁸⁹ STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. Op. cit., p. 2303.

Una vez la columna fue activada se procedió a aplicar o cargar el extracto purificado EP (previamente disuelto en una mínima cantidad del solvente inicial) en una proporción muestra/silica C_{18} de 1:100. Posteriormente con aproximadamente 3 volúmenes de la FM-1 eluyeron los compuestos de coloración amarilla, es decir la fracción rica en betaxantinas (FBX). A continuación, 1,5 volúmenes de la FM-2 permitieron obtener una mezcla de compuestos (amarillos y rojos) que conformaron la fracción intermedia (FI) que resultó de coloración anaranjada. Finalmente, aquellos compuestos de tonalidades magenta que constituyen la fracción rica en betacianinas (FBC) quedaron retenidos en la columna y fueron eluidos con aproximadamente 4 volúmenes de la FM-3. Los pasos del fraccionamiento y los efectos del cambio de solvente se pueden apreciar en la figura 28.

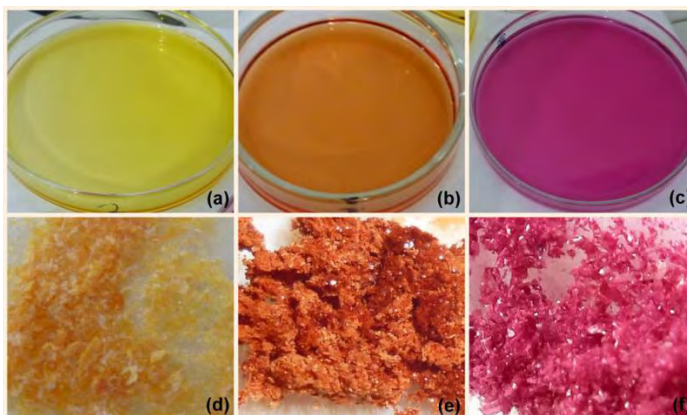
Figura 28. Pasos del fraccionamiento de betacianinas y betaxantinas.



*Cromatografía en columna con silica- C_{18} . En (a) se observa la entrada del extracto purificado (EP) en la columna. En (b) procede la elución de la fracción rica en betaxantinas (FBX) de coloración amarilla. En (c) se aprecia la separación entre la fracción intermedia (FI) de tonalidad anaranjada y la fracción rica en betacianinas (FBC) de coloración magenta. Fuente: Esta investigación.

Las tres fracciones recolectadas se concentraron a presión reducida a 45 °C y/o se llevaron a sequedad obteniéndose los sólidos que se denominaron FBX, FI y FBC (figura 29).

Figura 29. Fracciones obtenidas del procedimiento de cromatografía en columna.



*Las imágenes **(a)**, **(b)** y **(c)** corresponden a las fracciones: rica en betaxantinas (FBX), intermedia (FI) y rica en betacianinas (FBC) resultantes del procedimiento cromatográfico. Debajo de cada una, en las imágenes **(d)**, **(e)** y **(f)** se muestra el respectivo sólido obtenido después de la eliminación del solvente. Fuente: Esta investigación.

4.6 ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE BETALAÍNAS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

El análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia se realizó para el extracto purificado (EP) y las tres fracciones (FBX, FI y FBC) obtenidas.

4.6.1 Análisis de betalaínas por HPLC analítica

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo HPLC Waters Breeze acoplado a un detector de arreglo de diodos (PDA 2998) y con un sistema de bombas binario (Waters 1525). Se usó una columna en fase reversa Waters XTerra-MS C₁₈ (150 x 4,6mm d.i. x 3,5µm d.p.). Para el análisis se utilizó como solvente A: ácido fórmico al 2% y como solvente B: acetonitrilo puro.

Las muestras se disolvieron en la fase móvil A (en algunas ocasiones se hizo necesario la adición de ACN para mejorar la solubilización) y fueron filtradas mediante un jeringa dispuesta con un filtro de 0,45 µm antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. El volumen de inyección fue de 20 µL (válvula Rheodyne i 7525) y se empleó una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La corrida cromatográfica se realizó teniendo en cuenta el gradiente lineal descrito por Wybraniec *et al.*²⁹⁰: 0-7% de B (0-35 minutos); 7-20% de B (35-40 minutos) y 20-7% de B (40-45 minutos). La temperatura del horno se programó a 30°C y las principales longitudes de onda monitoreadas fueron 538 y 480 nm.

²⁹⁰ WYBRANIEC, *et al.*, 2009. Op. cit., p. 6892.

4.6.2 Caracterización de betalaínas mayoritarias por HPLC-MS

Las muestras se enviaron a los laboratorios de la Universidad Nacional - Sede Bogotá para que fueran analizadas por HPLC-MS en un cromatógrafo Shimadzu LC 2010 equipado con una columna Kinetex Phenomenex C₁₈ (150 x 2,1 mm d.i.; 2,6 µm d.p.). La fase móvil A fue ácido fórmico al 1% y para la fase móvil B se utilizó una mezcla de acetonitrilo, agua y ácido fórmico a una proporción de 80:19:1. El gradiente de elusión empleado fue el siguiente: 3-20% de B (0-35 min), 20-100 % de B (35-40 min) y 100-3% (40-45 min). El volumen de inyección fue de 5 µL y la velocidad de flujo fue de 0,4 mL/min.

Las condiciones de operación del cromatógrafo de masas incluyeron una interface electrospray (ESI) en modo positivo y negativo, un rango de masa de 50 – 1000 m/z. El voltaje y la temperatura del detector CDL fueron 1.8 kV y 250°C, respectivamente. La temperatura del Heat block fue de 250 °C y el flujo de gas nebulizador (N₂) de 1,0 L/min.

4.7 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENÓLICO

Para determinar el contenido fenólico de los dos extractos: crudo (EC, 4500 ppm) y purificado (EP, 7100 ppm); y de las tres fracciones: amarilla (FBX, 12800 ppm), intermedia (FI, 910 ppm) y púrpura (FBC, 260 ppm) se utilizó el protocolo descrito por Floegel et al²⁹¹; 200µL de la muestra analizar (apropiadamente disuelta en metanol al 50%) se mezclaron con 2,6 mL de agua desionizada, posteriormente, en el minuto 0 se añadieron y mezclaron 200µL del reactivo de Folin y después de 6 minutos se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ al 7% y se agitó apropiadamente, dando como resultado la coloración azul característica de este método (ver Anexo C). Esta mezcla de reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 90 minutos y su absorbancia fue medida contra un blanco a 750 nm en un espectrofotómetro Pharo-300. El blanco consistió en adicionar 200µL de metanol al 50% en lugar de la muestra.

De igual manera se realizó una curva de calibrado utilizando como patrón soluciones de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 10, 30, 60, 100 y 150 ppm. El contenido de fenoles totales se expresó como mg de ácido gálico (GA) /g de muestra. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

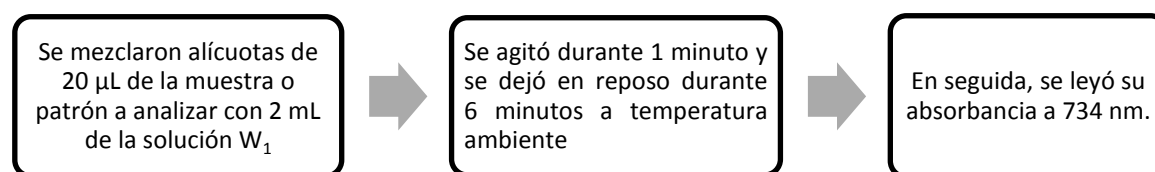
Para la medida de la capacidad antioxidante de extractos (EC y EP) y fracciones (FBX, FI y FBC) se utilizaron dos métodos espectrofotométricos: TEAC y DPPH. Las lecturas

²⁹¹ FLOEGEL, A., *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *En: Journal of Food Composition and Analysis*, 2011. vol. 24, no. 7, p. 1043–1048.

de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Pharo-300 y todos los análisis se realizaron por triplicado.

4.8.1 Método TEAC (actividad antioxidante equivalente a trolox)

Se estudió la capacidad de reducir al radical $ABTS^{\cdot+}$ siguiendo el protocolo reportado por Re *et al*²⁹² con algunas modificaciones. En primer lugar, se preparó una solución stock del catión radical $ABTS^{\cdot+}$ por reacción en medio acuoso del ABTS (7 mM) con persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, 2,5 mM) (las concentraciones de reactivos entre paréntesis corresponden a concentraciones finales). Esta mezcla se conservó en reposo durante 24 horas en la oscuridad. Una vez formado el radical $ABTS^{\cdot+}$ se tomó una alícuota y se diluyó con metanol grado HPLC hasta obtener un valor de absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a una longitud de onda de 734 nm (solución W_1). La coloración azul-verdosa que distingue a este radical se observa en Anexo D. Para la reacción se llevaron a cabo los siguientes pasos:



Siguiendo la metodología descrita, se construyó una curva de calibración con soluciones metanólicas de Trolox (patrón) de diferentes concentraciones (0, 250, 500, 1000, 2000, 2500 μM) con el fin de expresar los resultados en términos de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC). Además, se preparó un patrón de ácido ascórbico 1500 μM en metanol para verificar la funcionalidad del método. Finalmente se analizaron las mismas muestras (extractos y fracciones) que se utilizaron en el ensayo de folin (sección 4.7), las cuales fueron disueltas en metanol al 50%, por tanto, se realizó un blanco de reacción utilizando 20 μL de este solvente.

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

Siguiendo la metodología de Brand-Williams *et al*²⁹³ y Sánchez *et al*²⁹⁴ con algunas modificaciones, se estudió la capacidad antiradical de las muestras EC, EP, FBX, FI y FBC. Inicialmente se preparó una solución stock de DPPH en metanol (3170 μM) y a partir de ella se realizó una solución de trabajo (W_2) a una concentración de 64,9 μM . La solución W_2 , a su vez, permitió preparar disoluciones para construir una curva de calibrado de la absorbancia medida a 515 nm vs. concentración de DPPH. En el Anexo

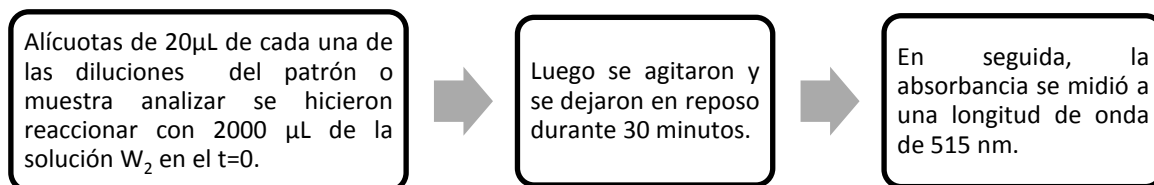
²⁹² RE, R, *et al*. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *En*: Free Radical Biology and Medicine. 1999. vol. 26, no. 9. p. 1231-1237.

²⁹³ BRAND-WILLIAMS, W., CUVÉLIER, M.E. y BERSET, C.B. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *En*: LWT-Food science and Technology, 1995, vol. 28, no. 1, p. 25-30.

²⁹⁴ SÁNCHEZ-MORENO, Concepción; LARRAURI, Jose A. y SAURA-CALIXTO, Fulgencio. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *En*: Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, vol. 76, no. 2, p. 270-276.

E se evidencia la coloración violeta del radical DPPH· a medida que este aumenta su concentración.

Para la reacción, en primer lugar se prepararon entre 5 y 8 diluciones a diferentes concentraciones del patrón o muestra a analizar, apropiadamente disueltas en metanol y metanol al 50%, respectivamente, y se llevó a cabo la siguiente metodología:



Con la curva de calibración, las absorbancias resultantes se expresan en términos de concentración de DPPH en el tiempo cero y en el tiempo $t=30$ min, representados como $[DPPH^*_{rem}]_{t=0}$ y $[DPPH^*_{rem}]_{t=30min}$, respectivamente, con los cuales se calcula el porcentaje de DPPH remanente (Ecuación 3). La concentración en el tiempo cero fue la obtenida al mezclar 20 μ L de metanol o de metanol al 50%, según corresponda, con 2000 μ L de la solución W_2 .

$$\%[DPPH^*_{rem}] = \frac{[DPPH^*_{rem}]_{t=30min}}{[DPPH^*_{rem}]_{t=0}} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

El $\%[DPPH^*_{rem}]$ es proporcional a la concentración de patrón o muestra (antioxidantes), y la capacidad antioxidante en este método se expresa como el EC_{50} , el cual indica la concentración de antioxidante que es capaz de disminuir la concentración inicial del DPPH· en un 50%. Para obtener este parámetro, los datos obtenidos de $\%[DPPH^*_{rem}]$ se graficaron con respecto a la concentración y por interpolación se obtuvo el EC_{50} .

La funcionalidad del método se evaluó con un estándar de ácido gálico en el rango de concentraciones que reporta Brand-Willians: 0,010; 0,017; 0,050; 0,100 g Ant/g DPPH. Por su parte, las concentraciones de las muestras (extractos y fracciones) se prepararon de acuerdo a ensayos preliminares, que permitieron establecer que los siguientes rangos de concentración, en g muestra/g DPPH: EC (0,75 -22,55), EP (1,21-36,35), FBX (2,21-33,21), FI (0,09-2,95), FBC (0,03-0,52), fueron adecuados para obtener el término EC_{50} en un $t=30$ min y bajo las condiciones anteriormente descritas. En el caso de las muestras fue necesario hacer una disolución para corregir la A a 515 nm proporcionada por la muestra.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CARACTERÍSTICAS INICIALES DEL ULLUCO

La planta recolectada en la vereda Cruz de Amarillo (corregimiento de Catambuco) se clasificó taxonómicamente, en el herbario de la Universidad de Nariño, como *Ullucus tuberosus* Caldas perteneciente a la familia Basellaceae y conocido con el nombre común de “ulluco chincheño”. Un ejemplar quedó registrado con el código No. 45648 (figura 30) y fue descrito como una planta herbácea de hasta 50 cm de longitud con tallos suculentos, decumbentes, angulares; hojas semi-reniformes o cordiformes y tubérculos que para esta variedad son de color rojo magenta.

Figura 30. Planta de ulluco radicada en el herbario de la Universidad de Nariño.



Fuente: Esta investigación.

Los tubérculos fueron recolectados aproximadamente a los 240 días después de la siembra cuando el follaje de las plantas presentaba una ligera coloración amarillenta, que de acuerdo a lo reportado por Clavijo *et al*²⁹⁵ es un indicativo de que el cultivo ha alcanzado el estado de madurez fisiológico adecuado para su cosecha. De hecho, el tamaño de estos y la firmeza de su cáscara son características propias de tubérculos maduros, indicando así que el ulluco se encontraba en un estado apto para el consumo.

Las características fisicoquímicas del tubérculo se registran en la tabla 4. El valor del porcentaje de humedad es cercano al 85% al que hace referencia Barrera²⁹⁶. Otros autores reportan diferentes resultados, por ejemplo Ayala²⁹⁷ encontró un valor de 83,7% y Aredo²⁹⁸ de 90,67%, de manera que la medida para el tubérculo investigado se

²⁹⁵ CLAVIJO, BARÓN y COMBARIZA. Op. cit., p. 37.

²⁹⁶ BARRERA. Op. cit., p. 4.

²⁹⁷ AYALA. Op. cit., p. 108.

²⁹⁸ AREDO. Op. cit., p. 128.

encuentra dentro de este rango. En cuanto a los datos obtenidos de pH y SST (°Bx) se puede decir que son similares a los encontrados por Aredo²⁹⁹ de 5,9 y 3,12, respectivamente. Respecto a la firmeza encontrada, esta resultó ser ligeramente mayor que el valor de 6,51 kgf hallado en el estudio de Ortega³⁰⁰. Estas diferencias pueden atribuirse a la variedad de tubérculo analizado y a la zona donde se haya cultivado.

Tabla 4. Características fisicoquímicas del ulluco.

<i>Características del tubérculo</i>	<i>Descripción</i>
Color	Superficie: Púrpura rojizo (61A)* Zona cortical: Blanco amarillento (4D)* Cilindro central: Blanco amarillento (4D)*
Forma	Semifalcados y retorcidos
Textura	Externa: Cáscara delgada y lisa con yemas u ojos muy superficiales. Interna: Mucilaginosa y/o viscosa
Tamaño	1-3 cm de diámetro
Porcentaje de Humedad	88,3 ± 0,8 %
pH	6,12 ± 0,00
Sólidos solubles totales (SST)	2 ± 0 °brix
Firmeza	6,8 ± 0,3 kgf

*Los números y letras entre paréntesis corresponden a los colores asignados de acuerdo la Tabla de Colores de la Real Sociedad de Horticultura (RHS Colour Chart).

5.2 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE BETALAÍNAS EN LA MUESTRA

Investigaciones previas^{301,302} en otras variedades de *U. tuberosus* publican que las betalaínas son las responsables del color de su cáscara. Por tanto, una primera aproximación para determinar la presencia de este tipo de pigmentos en la cáscara del ulluco fue realizar una prueba cualitativa comúnmente usada para diferenciar betalaínas de antocianinas, que consiste en determinar el cambio de color del extracto al adicionar una base fuerte (KOH o NaOH)³⁰³. Se observó que con esta prueba el extracto rojo magenta cambió a amarillo (figura 31), lo que demuestra la presencia de betalaínas pues en medio básico, la betanina (roja) sufre ruptura hidrolítica del enlace aldimina, generando ácido betalámico (amarillo brillante) y ciclo-Dopa-5-O-β-glucósido (incolore)³⁰⁴, reacción que se indica en la figura 18. A su vez, este resultado permitió descartar la presencia de antocianinas, ya que en esas condiciones el extracto se

²⁹⁹ AREDO. Op. cit., p. 128.

³⁰⁰ ORTEGA, NÚÑEZ y PORTILLA, M. Op. cit., p. 149.

³⁰¹ SVENSON, *et al.* Op. cit., p. 7731.

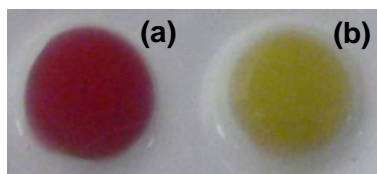
³⁰² CAMPOS, *et al.* Op. cit., p. 1481–1488.

³⁰³ SWARNA, J., *et al.* Characterisation and determination of in vitro antioxidant potential of betalains from *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. *En: Food chemistry*, 2013. vol. 141, no. 4, p. 4382-4390.

³⁰⁴ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R42.

tornaría de un color azul-verdoso³⁰⁵. Es importante resaltar que la literatura reporta que estas dos clases de pigmentos son mutuamente excluyentes y por tanto, si el metabolismo de la planta genera betalainas, entonces no producirá antocianinas y viceversa³⁰⁶.

Figura 31. Test cualitativo para confirmar la presencia de betalainas en el extracto de ulluco.



*(a) Coloración inicial del extracto de *U. tuberosus*, (b) Cambio de coloración después de la adición del KOH. Fuente: Esta investigación.

Otro aspecto importante para confirmar la presencia de betalainas es su espectro de absorción UV-Vis (figura 32a). Los pigmentos extraídos de la parte magenta del ulluco presentaron, en la región visible, absorbancias máximas cercanas a 538 y 480 nm, que son características de las betacianinas y betaxantinas respectivamente³⁰⁷. En la región ultravioleta, también se evidenció un máximo de absorción en 280 nm debido al residuo *ciclo*-DOPA, con un hombro cercano a 320 nm, que se debe a la presencia de betalainas aciladas, las cuales se caracterizan por presentar un segundo máximo de absorción en esa región UV (300 a 330 nm)³⁰⁸.

En este punto, se debe tener en cuenta que la porción superficial color rojo magenta no logró separarse totalmente de la zona cortical debido a que era un procedimiento manual dispendioso. Por tanto, para descartar la presencia de compuestos betalainicos en el cilindro central, se realizó un procedimiento de extracción de esta muestra y su espectro se puede observar en la figura 32b, donde no se identificó absorción en la región visible, pero sí un máximo en 280nm, que probablemente se deba a compuestos fenólicos u otro tipo de compuestos que se encuentran en la pulpa³⁰⁹. Todo lo anterior demuestra que el ulluco, utilizado en esta investigación, contiene pigmentos tipo betalaina únicamente en la porción superficial de color rojo magenta.

³⁰⁵ DELGADO-VARGAS y PAREDES-LÓPEZ. Op. cit., p. 202-204.

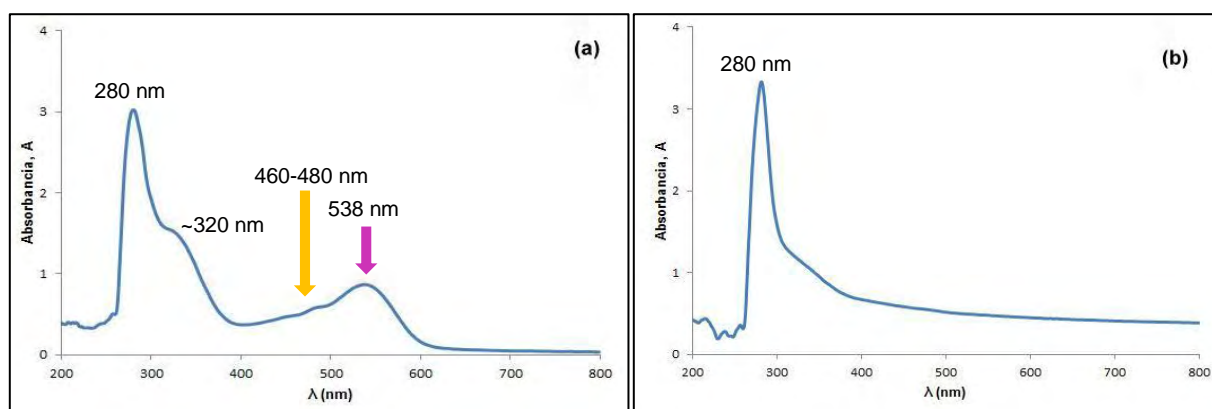
³⁰⁶ AZEREDO. Op. cit., p. 2366.

³⁰⁷ *Ibíd.*, p. 2365.

³⁰⁸ STINTZING y CARLE, 2004. Op. cit., p. 23.

³⁰⁹ SALAS DOMÍNGUEZ. Op. cit., p. 10

Figura 32. Espectros de absorción de la (a) porción superficial color magenta y la (b) zona cortical del ulluco.



Fuente: Esta investigación.

5.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS

Del proceso de extracción descrito en la sección 4.4.1, se determinó que la cáscara contiene 1,8% de extracto crudo (EC). En general, los métodos de extracción de los pigmentos no son selectivos ya que también son capaces de co-extraer una gran cantidad de compuestos polares³¹⁰. Debido a la composición del ulluco, se puede esperar la coextracción de proteínas, saponinas, carbohidratos y especialmente polímeros de carbohidratos de alto peso molecular conocidos como mucílagos^{311,312}, de consistencia gomosa y/o viscosa que posteriormente podrían dificultar las técnicas cromatográficas de separación e identificación de los compuestos de interés. En consecuencia, fue necesario aislarlos aplicando una metodología de purificación con etanol, solvente en el cual los mucílagos son insolubles. Al añadir etanol al EC, previamente disuelto en agua, se disminuye la polaridad del medio y por lo tanto también disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos de las moléculas de carbohidratos que conforman los mucílagos, provocando su precipitación y/o coagulación, de manera que posteriormente se pueden retirar por centrifugación³¹³. Luego de este procedimiento (descrito en 4.4.2) se obtuvo el extracto purificado (EP) que representa el 1,3% del peso inicial de cáscara.

³¹⁰ BRAGA, M.E.M., *et al.* Op. cit., p. 231.

³¹¹ SUQUILANDA. Op. cit., p. 34-35.

³¹² BUSCH, J.M., *et al.* Nutritional composition of ulluco (*Ullucus tuberosus*) tubers. En: Proceedings of the Nutrition Society, 2000, vol. 25, p. 60.

³¹³ CAPITANI, M. I. Caracterización y funcionalidad de subproductos de chíá (*Salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata-Facultad de Ciencias Exactas. 2013. p. 90.

5.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS TIPO BETACIANINAS Y BETAXANTINAS

El contenido de betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) del *U. tuberosus* se cuantificó mediante la metodología descrita anteriormente (sección 4.4.3), obteniéndose los valores registrados en la tabla 5. Estos valores son muy similares a los hallados en esta misma variedad de ulluco en un ensayo preliminar³¹⁴: 43 y 25 µg/g para el contenido de BC y BX, respectivamente; y también se encuentran dentro del rango reportado por Cejudo *et al*³¹⁵ que va de 30 a 100 µg/g. El contenido de BC correspondiente a 44,5 µg/g está dentro del rango de BC reportado para variedades de ullucos rojos investigados por Svenson *et al*³¹⁶ (37,9-71,1 µg/g) y por debajo del contenido de BC del tubérculo rojizo analizado por Campos *et al*³¹⁷ (64 µg/g). Las diferencias observadas en los valores de contenido betalaínico del ulluco de este estudio en comparación con las investigaciones previas pueden deberse a que las condiciones empleadas en los procedimientos de extracción no son exactamente iguales, por ejemplo: distintos tiempos de extracción, composición y cantidad de solvente empleado, entre otros que pueden variar los valores de contenido betalaínico final reportado.

Tabla 5. Contenido de betacianinas y betaxantinas para el extracto crudo por gramo de material vegetal fresco.

Muestra	Betacianinas (BC) ^a	Betaxantinas (BX) ^b	Betalaínas totales
EC*	44,5 ± 0,8	21,8 ± 0,6	66,3 ± 0,8

^a µg de betanina/g Material vegetal fresco, ^b µg de Indicaxantina/g de Material vegetal fresco, ^c betaninas + betaxantinas. Datos con ± DS de tres réplicas. Fuente: Esta investigación.

En comparación a otras fuentes de betalaínas, el ulluco presenta un contenido similar a los tallos rojo-púrpura de la acelga que según Kugler *et al*³¹⁸ corresponde a 50,6 µg/g. Mientras que al comparar con las fuentes más comunes como remolacha, tuna y pitaya su contenido es menor, ya que se han reportado valores desde los 90 hasta 500 µg/g^{319,320}. Sin embargo, la relación BC/BX del ulluco es de 2,04 que resulta ser muy similar al de remolacha de variedad 'Rubin' (2,08) considerada como la más adecuada para la producción de colorante alimenticio³²¹.

En la figura 33 se representa la cantidad de ambos tipos de pigmentos en términos de porcentaje. Se observa que hay una mayor proporción de BC (pigmentos de color

³¹⁴ MOSQUERA Q., N.A. y HURTADO G., N.H. Cuantificación y fraccionamiento mediante métodos cromatográficos de las betalaínas del ulluco (*Ullucus tuberosus*). En: Revista Colombiana de Química, 2014. P-PN-70.

³¹⁵ CEJUDO-BASTANTE, *et al*. Op. cit., p. 469.

³¹⁶ SVENSON, *et al*. Op. cit., p. 7730-7737.

³¹⁷ CAMPOS, *et al*. Op. cit., p. 1481-1488.

³¹⁸ KUGLER, STINTZING y CARLE (2004). Op. cit., p. 2980.

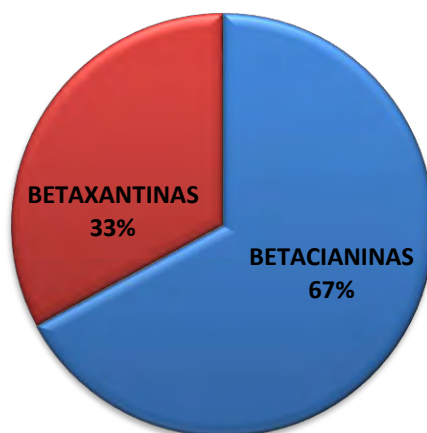
³¹⁹ BUTERA, *et al*. Op. cit., p. 6895-6901.

³²⁰ GASZTONYI, *et al*. Op. cit., p. 932-933.

³²¹ *Ibid.*, p. 932-933.

rojizo) que de BX (pigmentos de color amarillo), lo que está en concordancia con el color de la cáscara.

Figura 33. Porcentajes del contenido de betacianinas y betaxantinas en el *U. tuberosus*.

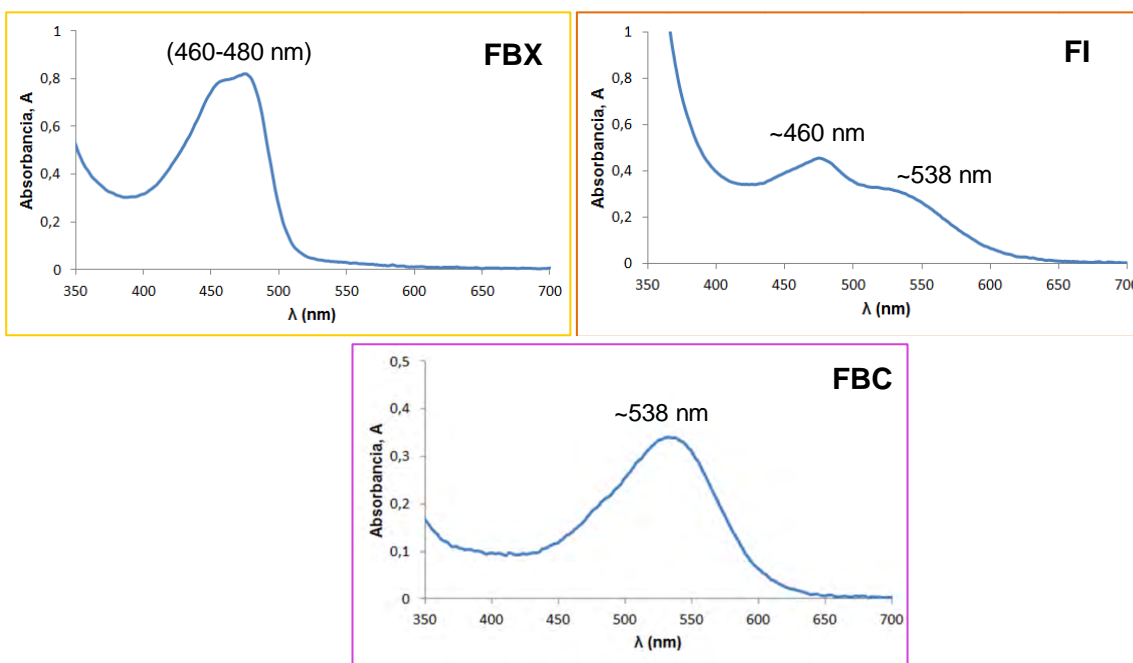


5.5. SEPARACIÓN DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS

La separación de la fracción magenta (betacianinas, BC) y la fracción amarilla (betaxantinas, BX) a partir del EP del ulluco se realizó conforme se describe en la sección 4.5. Esta separación se debe, principalmente, a las diferentes características de retención (dependientes del pH) de las betalaínas³²². En el proceso se observó que las BC se retienen en la sílica C₁₈ mientras que las BX eluyen rápidamente al utilizar como fase móvil agua acidificada (también eluyen otros compuestos altamente polares como los azúcares). Se comprueba así que la fracción de betaxantinas (FBX) de color amarillo es más polar que la fracción de betacianinas (FBC) de color magenta. Igualmente se recolectó una tercera fracción de color naranja (fracción intermedia, FI) correspondiente a la interfase entre la fracción amarilla y magenta. Esta FI mostró un espectro de absorción visible con $\lambda_{\text{máx}}$ características de las betacianinas y betaxantinas. La fracción retenida (color magenta, FBC) se eluyó utilizando un solvente menos polar (acetona acidificada al 60%). En la figura 34 se muestra el espectro de absorción de las tres fracciones (FBX, FI y FBC) y en la siguiente sección (5.6) se presentan los perfiles cromatográficos (HPLC) de estas tres fracciones aisladas de la cáscara de ulluco.

³²² STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. Op. cit., p. 2303.

Figura 34. Espectros de absorción de las tres fracciones: amarilla (FBX), naranja (FI) y magenta (FBC) obtenidas en el procedimiento de separación.



5.6 CARACTERIZACIÓN DE BETALAÍNAS MAYORITARIAS

5.6.1 Análisis general de betalaínas por HPLC analítica.

El análisis por HPLC-PDA del extracto purificado (EP) se realizó en modo fase reversa siguiendo la metodología descrita en la sección 4.6.1. La columna XTerra-C₁₈ utilizada, presenta una estructura donde uno de cada tres silanoles está sustituido por un grupo metilo y por tanto, actúa como adsorbente apolar³²³, de manera que los compuestos polares tendrán una menor fuerza de absorción y por consiguiente, el orden de elución será de mayor a menor polaridad. Dada su estructura química, las betaxantinas (BX) amarillas son más polares y por tanto eluyen más rápido³²⁴, es decir presentan tiempos de retención (t_R) menores que las betacianinas (BC) rojas. Estos pigmentos (amarillos y rojizos) son detectados selectivamente a dos longitudes de onda (480 y 538 nm) aunque las BC rojas también absorben en cierta proporción a 480 nm³²⁵. En otras palabras, la banda de absorción de las BC se extiende a 480 nm, sin que esto signifique la coelución con una BX.

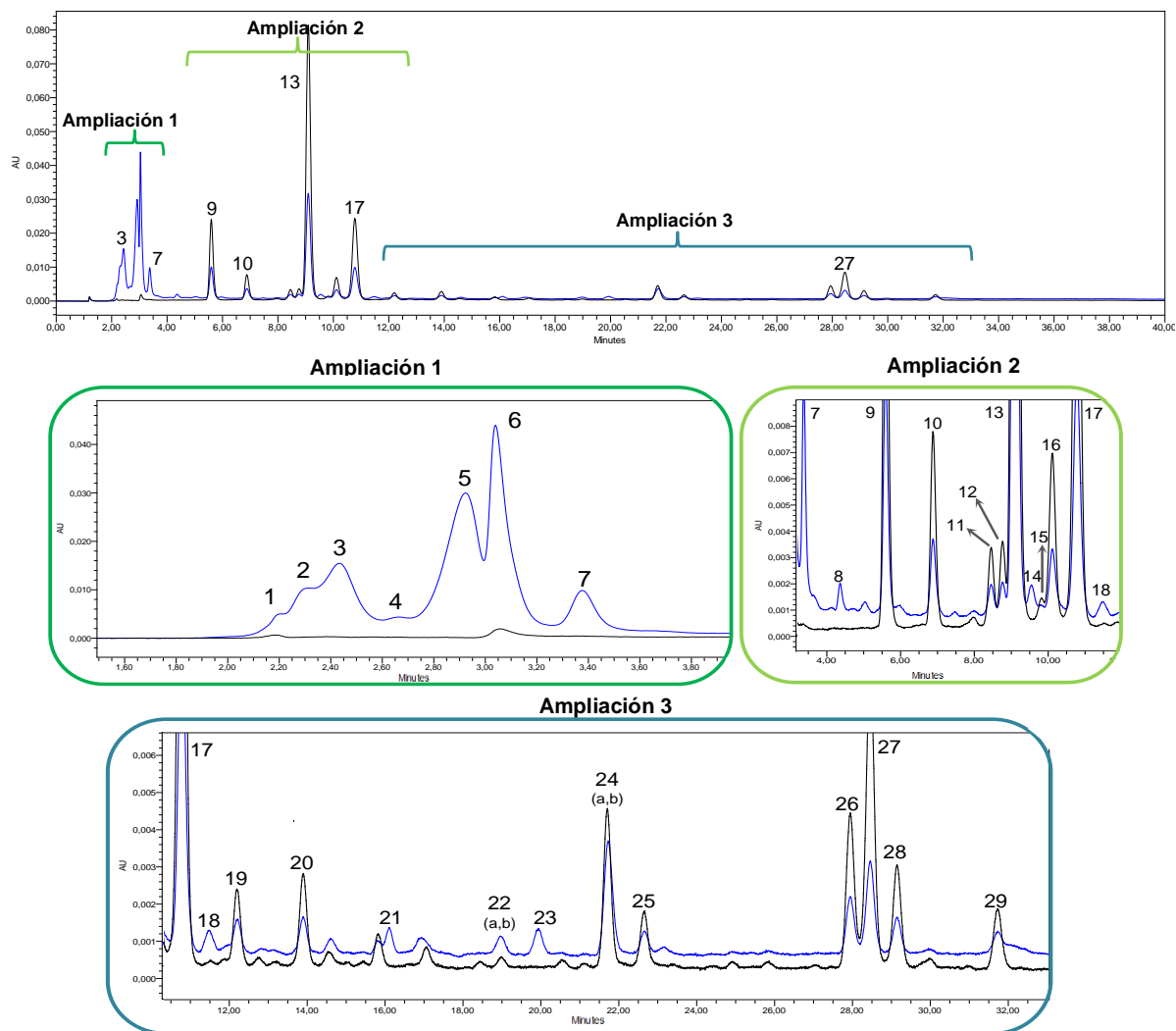
³²³ WATERS CORPORATION U.S.A. The most succesful Column in Over 30 Years of Stationary Phase Technology.

En: XTerra Columns. Disponible en <<http://waters.com/xterra>>

³²⁴ PIRES GONÇALVES. Op. cit., p. 236.

³²⁵ EDER. Op. cit., p. 860.

Figura 35. Perfiles cromatográficos a 480 (línea azul) y 538 nm (línea negra) del extracto purificado EP.

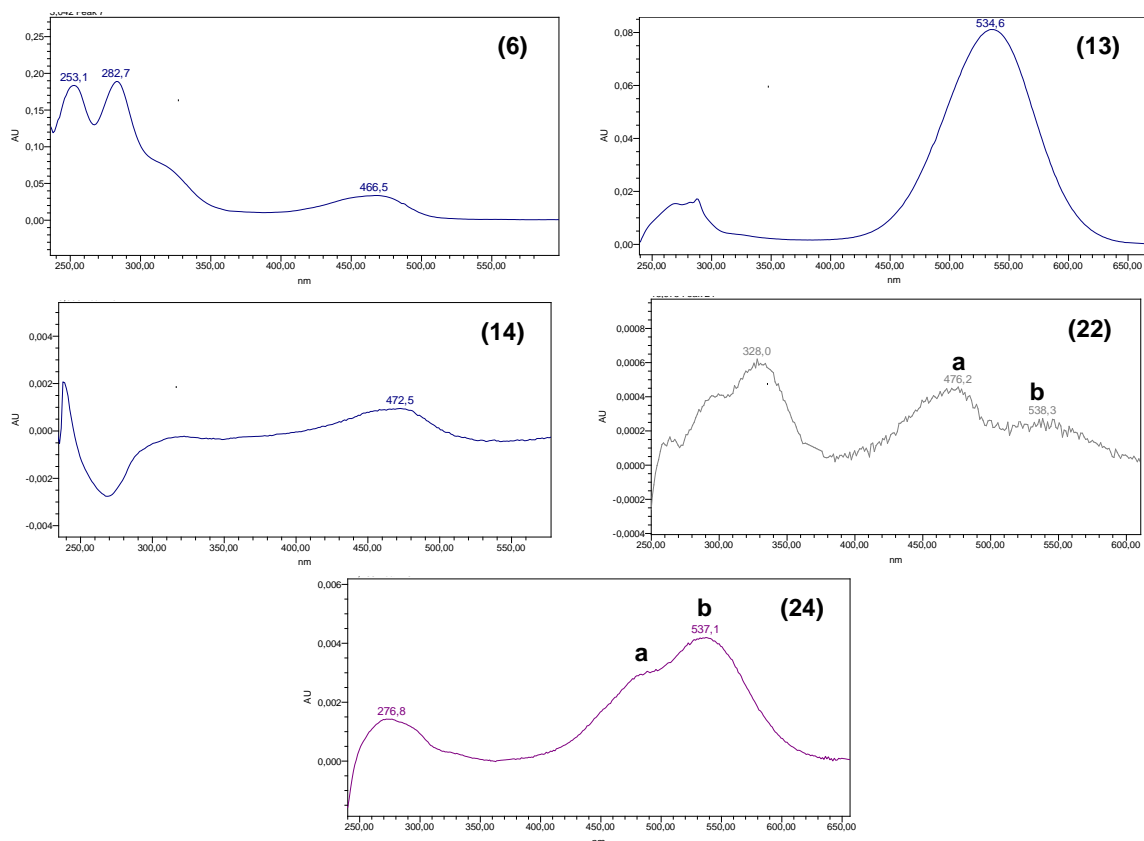


*Los picos **22** y **24** se han anotado con las letras **a** y **b** como indicativo de la coelución de dos compuestos cuyas $\lambda_{\text{máx}}$ están alrededor de 480 y 538nm, respectivamente. Fuente: Esta investigación.

En la figura 35 se han superpuesto los cromatogramas a 480 y 538 nm obtenidos para el extracto EP, donde los picos menos retenidos ($t_R = 0-5$ minutos) únicamente se evidenciaron en el perfil a 480 nm sugiriendo la presencia de betaxantinas, mientras que la mayoría de los compuestos más retenidos ($t_R > 5$ minutos) se detectaron en ambos perfiles aunque con una mayor altura en el de 538 nm sugiriendo la presencia de betacianinas. Sin embargo, las ampliaciones y los espectros de absorción en la región visible de cada pico revelaron que, aún después del minuto 5, hay varios compuestos minoritarios que absorben con mayor intensidad en el perfil a 480 nm; en algunos de ellos (picos **14**, **18**, **21** y **23**) no se observaron bandas de absorción a 538 nm, mientras que en el pico **22** sí. Teniendo en cuenta que las betaxantinas no presentan absorbancia a 538 nm, entonces se sugiere que en el pico **22** ($t_R = 18,9$ min)

han coeluido, probablemente, una BX y una BC de polaridad similar o con características de retención similares. Adicionalmente, se encontró que en el pico **24** no sólo hay una BC con $A_{\text{máx}}$ a 537,1 nm sino que también se sugiere la presencia de una BX superpuesta debido al hombro alrededor de 480 nm en su espectro. Los espectros de absorción de los picos **22** y **24**, pueden observarse en la figura 36; junto a los espectros de los compuestos más representativos en los perfiles a 480 y 538 nm, correspondientes a los picos **6** y **13**; así como también el del pico **14** como ejemplo de los compuestos que absorben a 480 nm pero a t_R mayores.

Figura 36. Espectros UV-Vis on-line de algunos picos cromatográficos del extracto purificado EP.



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

La información cromatográfica y espectral del EP permitió detectar al menos 32 compuestos con absorbancias máximas características de las betalainas (14 BX y 18 BC). Se observa que el compuesto mayoritario (mayor área, ver Anexo F) en el tubérculo de *U. tuberosus* es el **13**, que por su longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}} = 534,6$ nm) se puede inferir que sea una betacianina, lo cual se confirmó con la técnica de espectrometría de masas.

5.6.2. Identificación de betalaínas

Con el fin de profundizar en la identificación de las betalaínas del ulluco “chincheño” se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas ESI en modo positivo $[M + H]^+$ y negativo $[M - H]^-$. Las señales observadas en los perfiles cromatográficos (HPLC-MS) del extracto purificado EP son semejantes a los obtenidos por HPLC-PDA (figura 35), aunque con algunas diferencias en los t_R , que se deben a la variación de las condiciones de análisis (solventes, columna, flujo, etc). Los cromatogramas del extracto EP por HPLC-MS pueden observarse en el anexo G.

El análisis por HPLC-PDA y HPLC-MS no sólo se realizó para el extracto purificado (EP) sino también para las fracciones (FBC, FI y FBX). En la identificación de betalaínas, los tiempos retención son un factor importante al momento de la asignación, ya que estudios previos³²⁶ muestran que las betalaínas generalmente se presentan con sus isómeros, por lo tanto tienen la misma relación masa/carga (m/z) con tiempos de retención (t_R) diferentes.

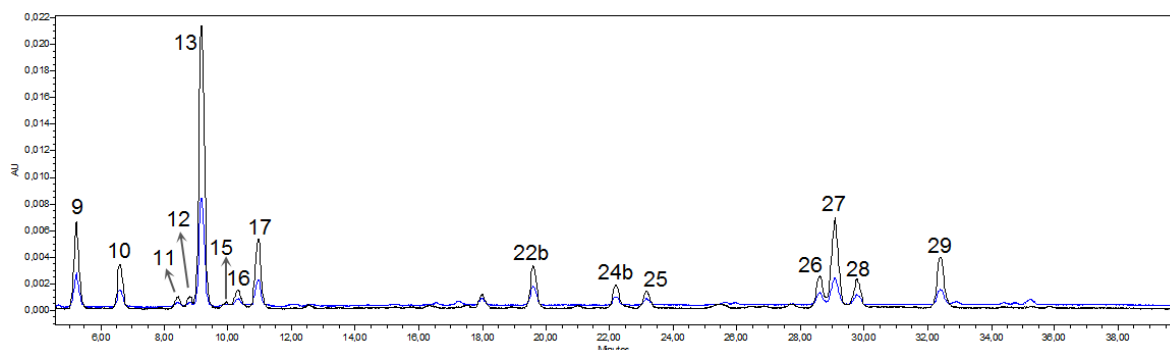
Así, la identificación parcial se llevó a cabo comparando los t_R y la información proporcionada por los espectros de absorción y masas de las diferentes muestras, con estudios realizados en otras variedades de ulluco y también en distintas matrices vegetales como la remolacha, pitaya, acelga, etc, que ya han sido publicados en la literatura científica. Adicionalmente, en esta investigación se analizó un extracto de remolacha ER (obtenido con el mismo método de extracción utilizado para el ulluco) por espectrometría de masas, cuyos cromatogramas (ver anexo H) presentaron t_R similares a los del EP ayudando así en la identificación de algunos compuestos. Este enfoque condujo a la identificación de aproximadamente 18 BC (incluyendo la neobetaina) y 8 BX en la variedad de ulluco estudiado.

- ❖ Identificación de los compuestos en la fracción rica en betacianinas (FBC) de coloración magenta.

La FBC es la fracción principal (obtenida a partir del EP) ya que en ella se encontró el pigmento mayoritario (**13**) del *U. tuberosus* además de numerosas señales cromatográficas con $A_{máx}$ alrededor de 538 nm (figura 37) que revelan la presencia de una gran variedad de pigmentos tipo betacianina (BC). Además, la ausencia de señales con $A_{máx}$ a 480 nm sugiere que no hay betaxantinas (BX), indicando así que el proceso de fraccionamiento descrito en la sección 4.5 fue adecuado. Se destaca que los compuestos tipo BC: **22a** y **24a** lograron separarse de sus coeluyentes tipo BX: **22b** y **24b**.

³²⁶ PIRES GONÇALVES. Op. cit., p. 236.

Figura 37. Perfiles cromatográficos a 538 (línea negra) y 480 nm (línea azul) de la fracción rica en betacianinas FBC de coloración magenta.



Fuente: Esta investigación.

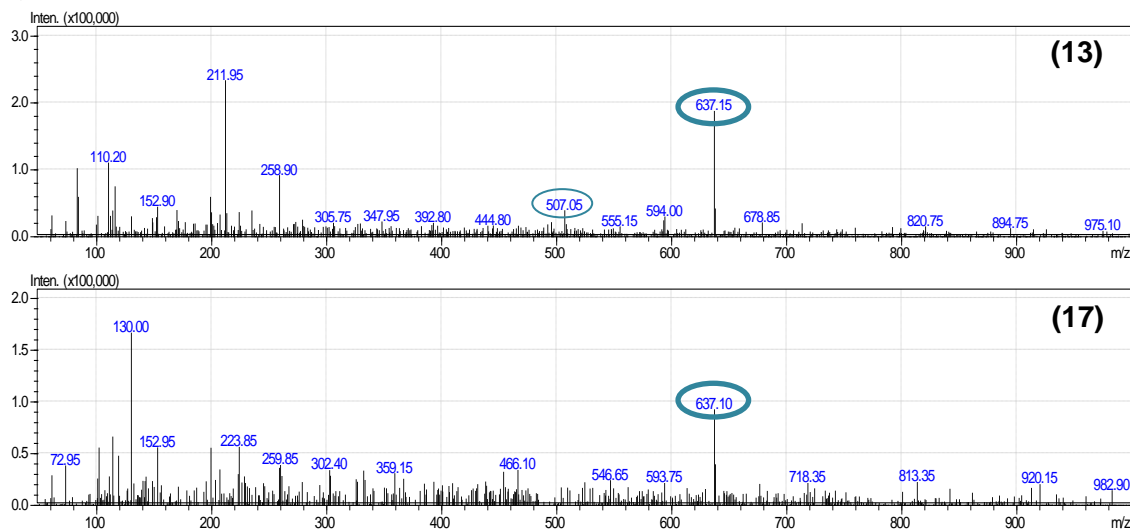
El compuesto mayoritario (pico **13**) presentó una $\lambda_{\text{máx}}$ de 534,6 nm y un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z de 637. Los mismos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ y m/z también se detectaron en los espectros del pico **17** (ver figuras 38 y 39), indicando que este par de compuestos son isómeros. Con base en publicaciones previas³²⁷ y teniendo en cuenta que **13** eluyó a un tiempo de retención menor ($t_R = 9,1$ min) que **17** ($t_R = 10,8$ min), estos fueron parcialmente identificados como filocactina [betanidina 5-O-(6'-O-malonil)- β -glucósido] e isofilocactina [isobetanidina 5-O-(6'-O-malonil)- β -glucósido] (figura 40), respectivamente. Estos isómeros se han reportado como compuestos mayoritarios en la pitaya rojo púrpura³²⁸ que presenta una coloración muy parecida a la del ulluco en estudio. En el espectro de masas también se observa un ion fragmento $[M+H-130]^+$ con m/z de 507 correspondiente a la pérdida de los grupos CO_2 y malonil $[M+H-\text{CO}_2-\text{C}_3\text{O}_3\text{H}_2]^+$ ³²⁹. Para poder observar con mayor claridad otros iones fragmento es necesario un análisis en modo tándem.

³²⁷ STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002a. Op. cit., p. 101-106.

³²⁸ *Ibid.*, p. 101-106.

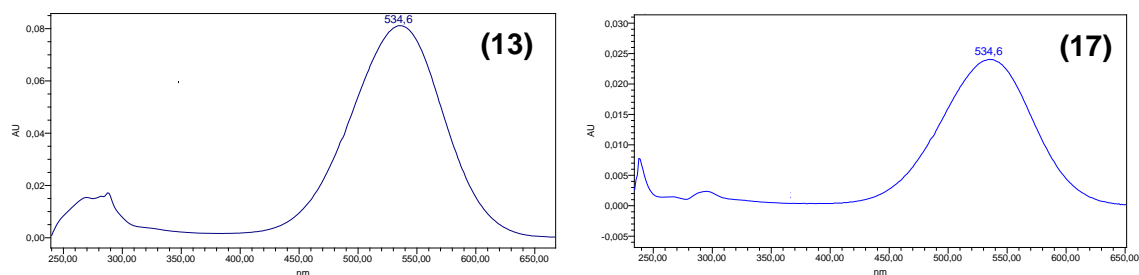
³²⁹ HERBACH, Kirsten M.; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phyllocactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *En: Rapid communications in mass spectrometry*, 2005. vol. 19, no. 18, p. 2603-2616.

Figura 38. Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos **13** y **17**.



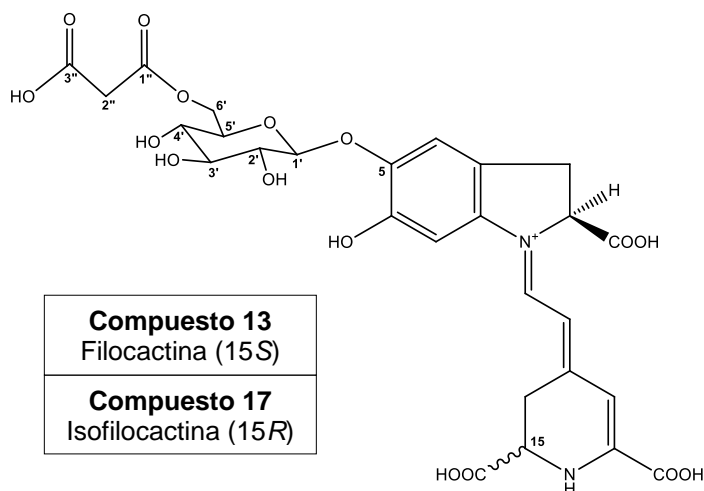
Fuente: Esta investigación.

Figura 39. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos **13** y **17**.



Fuente: Esta investigación.

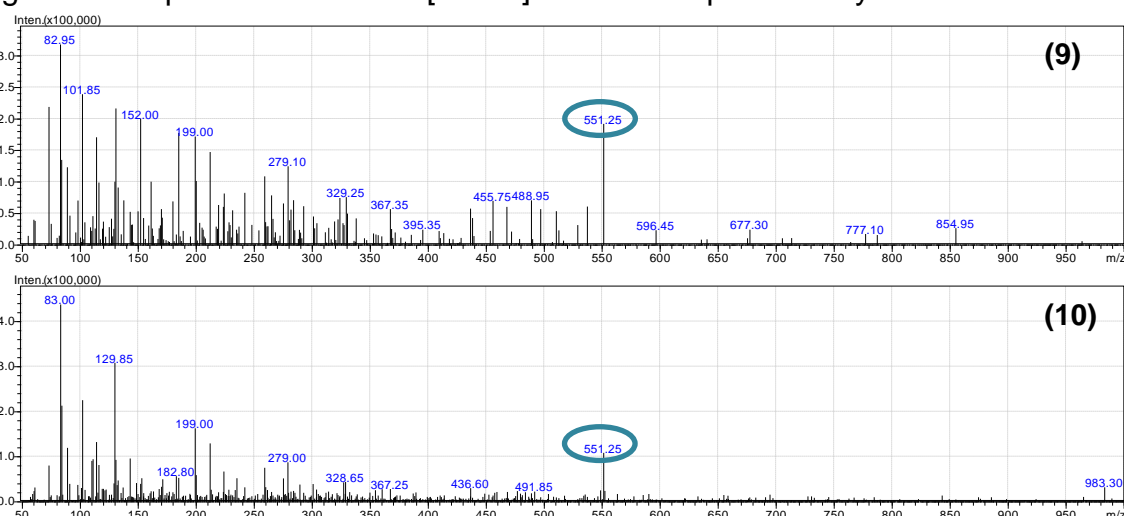
Figura 40. Estructura de filolactina/isofilactina propuestas para los compuestos **13** y **17**.



Fuente: Adaptado de Taira (2015).

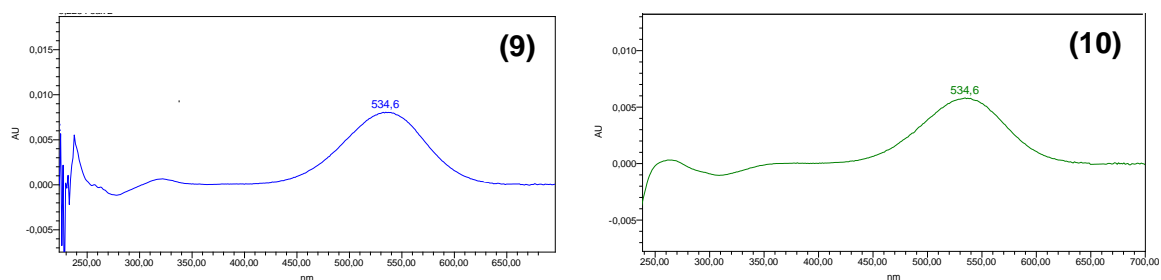
Los picos **9** y **10** también se distinguieron como isómeros ya que ambos presentaron el mismo valor tanto de la masa/carga ($m/z = 551$, figura 41) correspondiente al ion pseudomolecular $[M + H]^+$ como de la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}} = 534,6$ nm, figura 42). Para asignar las posibles estructuras de este par de isómeros no sólo se tuvo en cuenta la información anterior sino que también se realizó una comparación con el extracto de referencia (extracto de remolacha ER) (figura 43), el cual presentó una señal mayoritaria (**9R**) con una m/z de 551 y una $\lambda_{\text{máx}}$ de 536 nm que coincide con la información y el t_R del pico **9**, así mismo las señales **10R** y **10** presentaron similitud en sus características espectrales y de retención. Los espectros de masas de **9R** y **10R** se encuentran en el anexo H. Numerosas publicaciones han reportado que el compuesto mayoritario de la remolacha es la betanina ($m/z = 551$) que se presenta con su isómero y a t_R relativos que resultaron estar en concordancia con los obtenidos en este estudio, de esta manera se puede concluir que los picos **9** y **10** corresponden a la betanina (betanidina 5-*O*- β -glucósido) e isobetanina (isobetamidina 5-*O*- β -glucósido), respectivamente. Las estructuras se muestran en la figura 44.

Figura 41. Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos **9** y **10**.



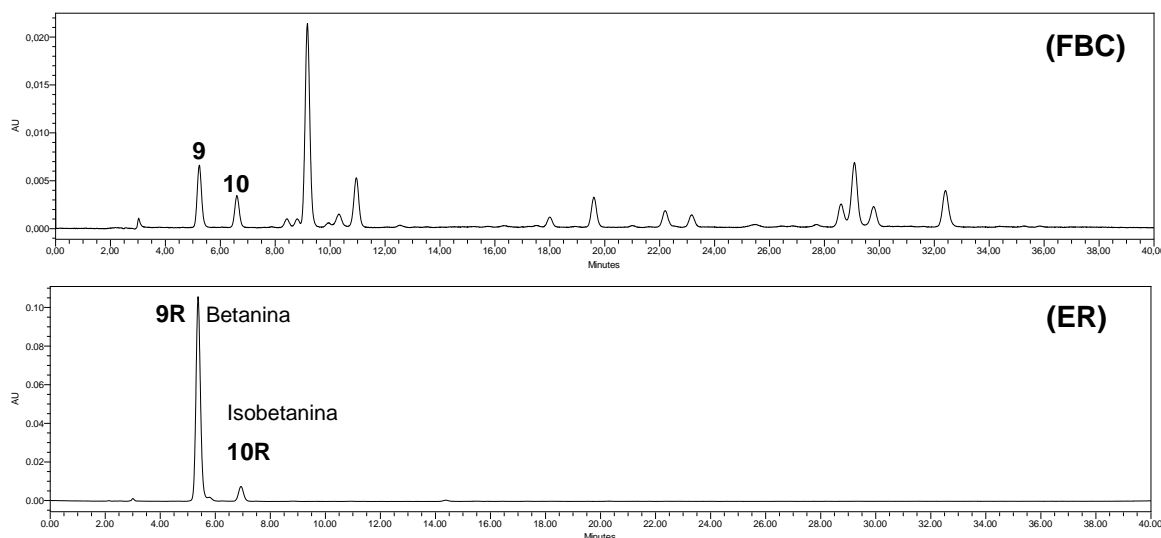
Fuente: Esta investigación.

Figura 42. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos **9** y **10**.



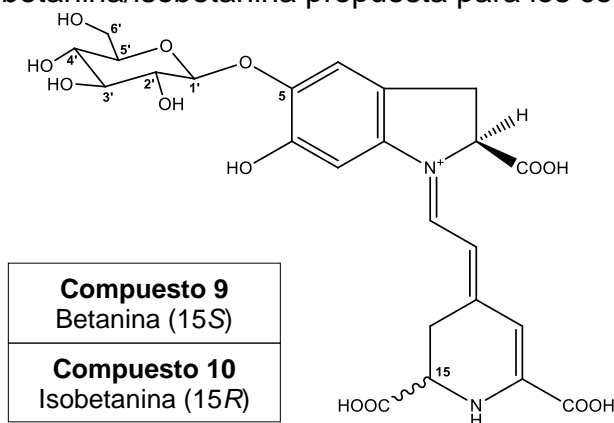
Fuente: Esta investigación.

Figura 43. Comparación del perfil cromatográfico a 538 nm de la fracción rica en betaxantinas (FBC) con el perfil a 538 del extracto de remolacha (ER).



Fuente: Esta investigación.

Figura 44. Estructura betanina/isobetanina propuesta para los compuestos 9 y 10.



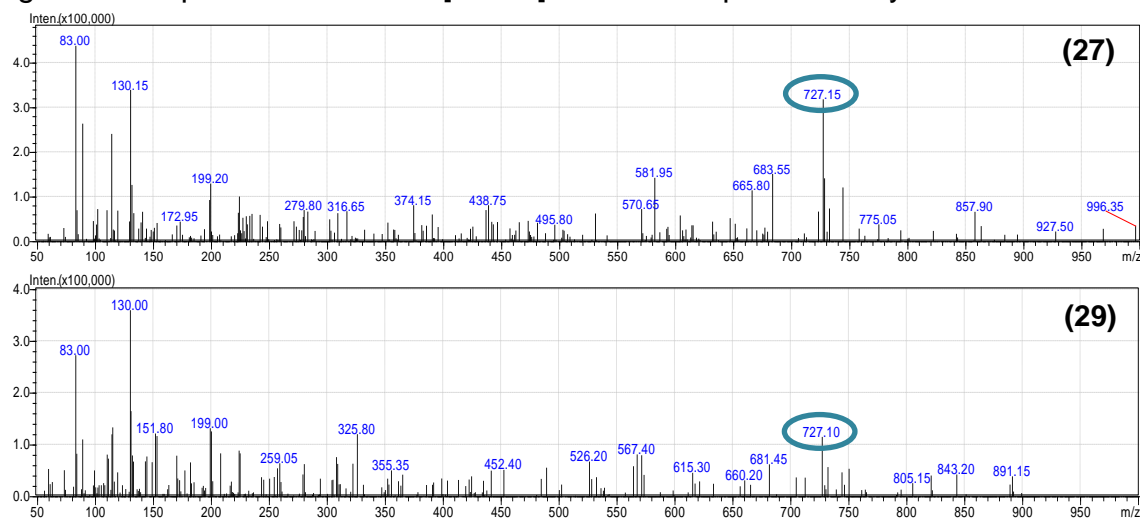
Fuente: Adaptado de Khan (2015).

Entre las betacianinas menos polares (mayores t_R) del extracto se encuentran los picos **26**, **27**, **28** y **29**. Los picos **27** y **29** presentaron un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z de 727 (figura 45) y una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 546,9 nm en la regi3n visible, adem3s de dos m3ximos de absorci3n en la regi3n UV (~320 y ~280 nm) (figura 46), que de acuerdo a Kugler *et al*³³⁰ corresponden a las caracter3sticas espectrales de la gomfrenina III e isogomfrenina III [betanidina/isobetanidina 6-O-(6'-O-feruloil)- β -gluc3sido] (figura 47). Este par de compuestos se distingui3 de otros is3meros con m/z 727, como la amarantina/isoamarantina [Betanidina/Isobetanidina 5-O- β -glucuronosilgluc3sido] y

³³⁰ KUGLER, Florian; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *En* : Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007. vol. 387. p. 637-648.

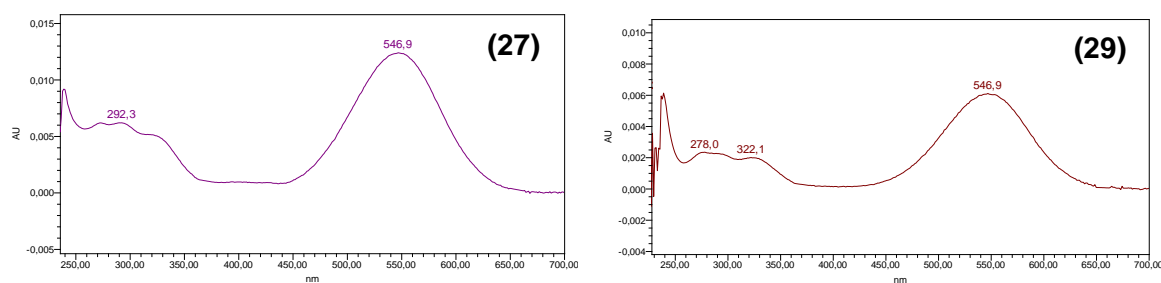
lamprantina II/isolamprantina II [betanidina/Isobetanidina 5-O-(6'-O-feruloil)- β -glucósido] por sus t_R y $\lambda_{m\acute{a}x}$ ³³¹. Las amarantinas son más polares y eluyen antes que la betanina; mientras que las lamprantinas II eluyen a t_R cercanos a los de las gompreninas III³³². Sin embargo, la diferencia en la posición de enlace del grupo feruloil- β -glucósil produce un efecto batocrómico en la $\lambda_{m\acute{a}x}$ de las gompreninas III³³³ que permite diferenciarlas de las lamprantinas II³³⁴.

Figura 45. Espectros de masas [M + H]⁺ de los compuestos 27 y 29.



Fuente: Esta investigación.

Figura 46. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 27 y 29.



Fuente: Esta investigación.

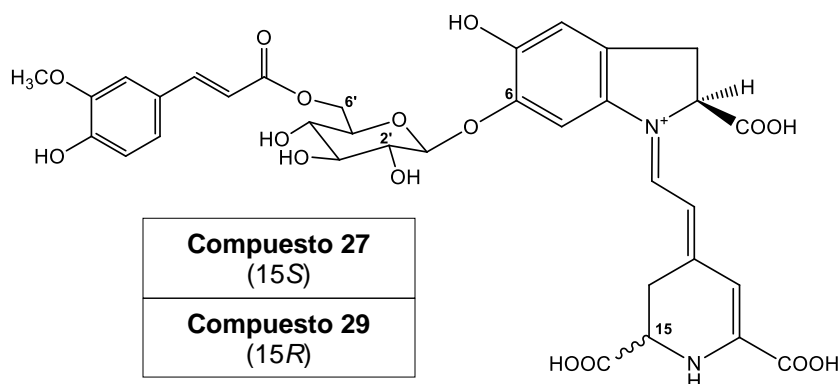
³³¹ KHAN y GIRIDHAR. Op. cit., p. 275, 278, 281.

³³² KUGLER, STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit., p. 641, 647.

³³³ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2006. Op. cit., p. R41-R42.

³³⁴ KHAN y GIRIDHAR. Op. cit., p. 275.

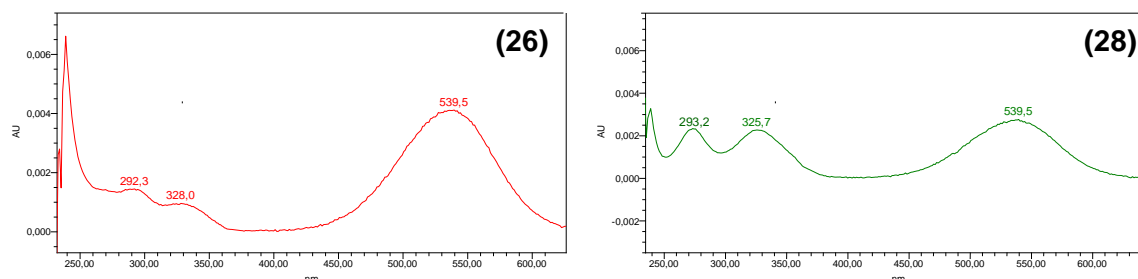
Figura 47. Estructura de Gomfrenina III/Isogomfrenina III propuestas para los compuestos **27** y **29**.



Fuente: Adaptado de Khan (2015).

Los iones pseudomoleculares de los espectros de masas de los picos **26** y **28** no lograron ser identificados. Sin embargo, la información UV-Vis (espectros de absorción de la figura 48) sugiere que se trate de dos isómeros ya que para ambos compuestos se encontró una absorbancia máxima en la región visible a 539,5 nm, además de dos máximos de absorción en la región UV (~292 y ~326 nm). La literatura científica reporta a la lamprantina II e isolamprantina II [betanidina/Isobetanidina 5-*O*-(6'-*O*-feruloil)- β -glucósido] como compuestos que se caracterizan por tener tres máximos de absorción en 288, 322 y 538 nm³³⁵, además de eluir a un t_R similar³³⁶, por lo que se sugiere estas estructuras (figura 49).

Figura 48. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos **26** y **28**.

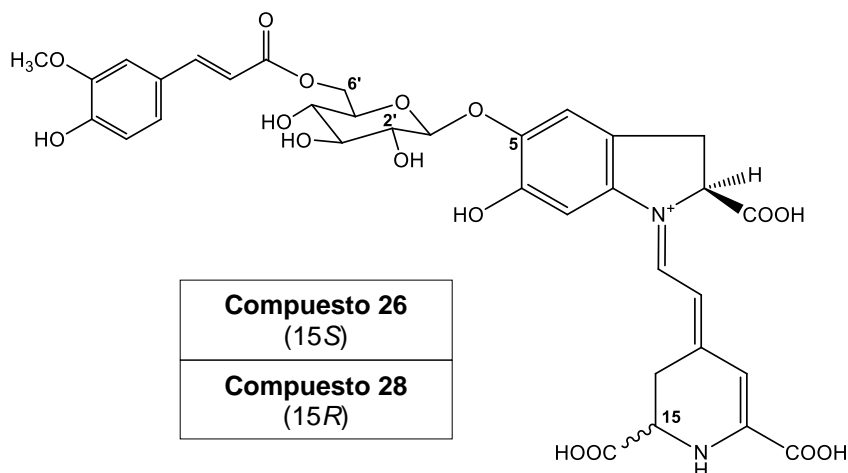


Fuente: Esta investigación.

³³⁵ KHAN y GIRIDHAR. Op. cit., p. 275, 278, 281.

³³⁶ KUGLER, STINTZING y CARLE, 2007. Op. cit. p. 641.

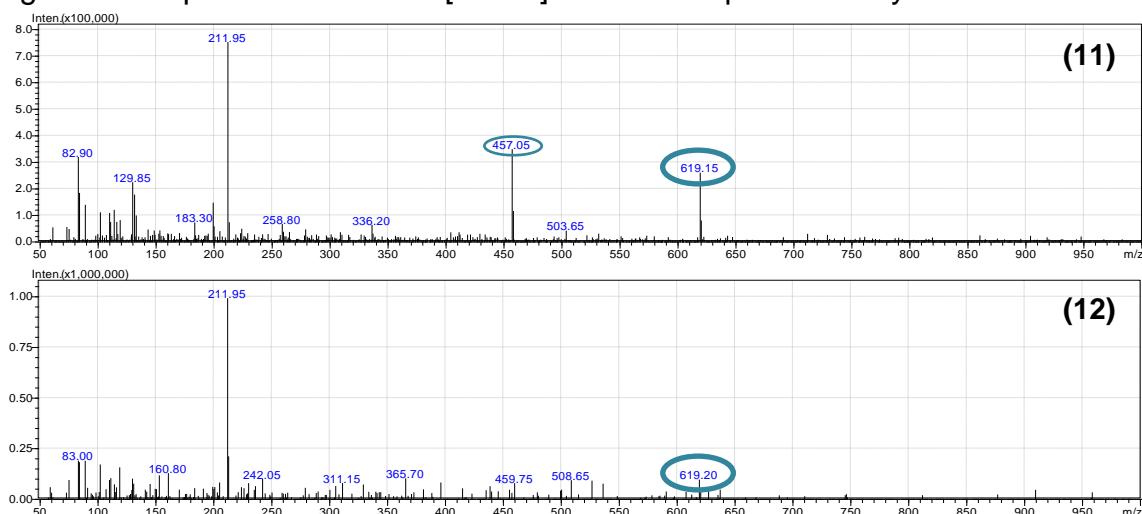
Figura 49. Estructura de la lamprantina II/isolamprantina II propuesta para el compuesto **26** y **28**.



Fuente: Adaptado de Khan (2015).

Entre los compuestos minoritarios de la FBC, se encuentran **11** y **12**, que eluyeron justo antes de la filocactina (pico **13**, compuesto mayoritario). Los espectros de masas de estas señales muestran un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z de 619 que de acuerdo a la literatura podría corresponder a un derivado de la filocactina e isofilocactina ($m/z = 637$) al perder una molécula de agua $[M+H-H_2O]^+$ ³³⁷. En las figuras 50 y 51 se muestran los respectivos espectros de masas y de absorción. En el espectro de masas de **11** se observa claramente el ion fragmento $[M+H-162]^+$ con m/z de 457, que sugiere la pérdida de unidad glucosilo³³⁸.

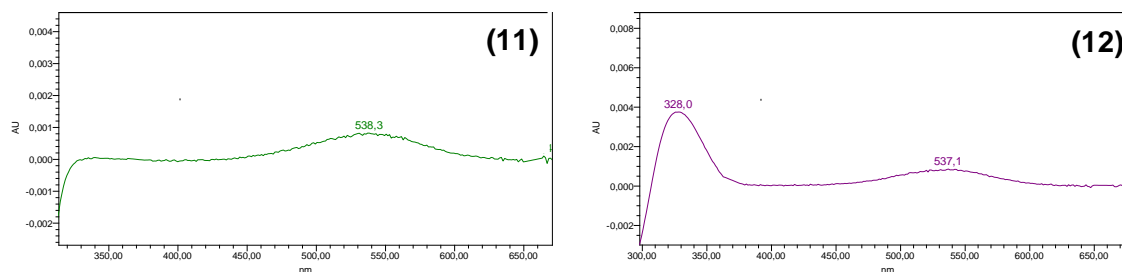
Figura 50. Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos **11** y **12**.



³³⁷ WYBRANIEC *et al.*, 2001. Op. cit., p. 1209-1212.

³³⁸ DEL CARPIO JIMÉNEZ, Carla; SERRANO. FLORES, Carlos y GIUSTI, Mónica. Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lecher. *En*: Revista Sociedad Química Perú. Vol. 75, no. 1, p. 83.

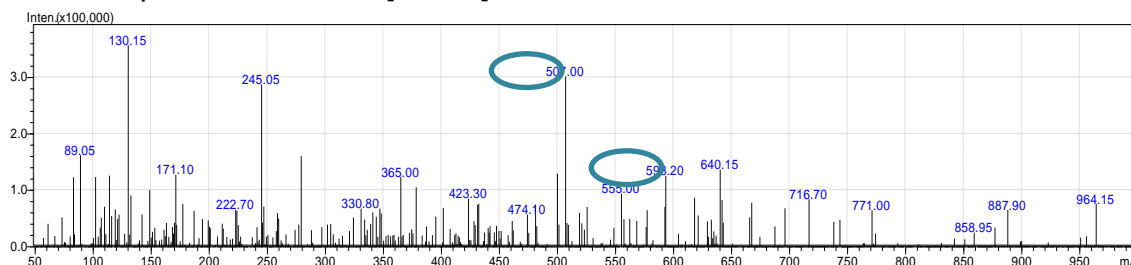
Figura 51. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos **11** y **12**.



Fuente: Esta investigación.

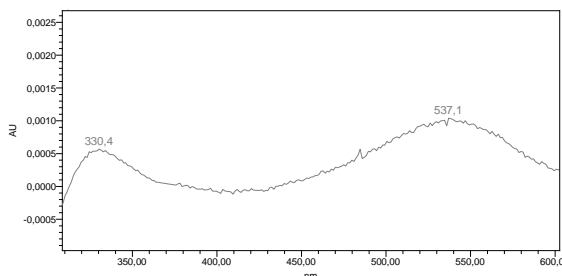
Otra de las señales minoritarias fue **15**. Su espectro UV-Vis (figura 53) presenta dos máximos de absorción a 537,1 y a 330,4 nm. Sin embargo, en el espectro de masas (figura 52) no se logró identificar el ion pseudomolecular claramente, pero los iones fragmentos con m/z de 507 y 593 sugieren la presencia de una betanina descarboxilada y filocactina descarboxilada, respectivamente, que han sido reportadas, a un mismo t_R , en una publicación de Herbach *et al*³³⁹. En otra investigación, llevada a cabo por Wybraniec *et al*³⁴⁰, lograron establecer el sitio de la descarboxilación: 2-decarboxi-betanina/isobetanina ($\lambda_{m\acute{a}x} = 533$ nm) y 17-decarboxi-filocactina ($\lambda_{m\acute{a}x} = 505$ nm).

Figura 52. Espectro de masas $[M + H]^+$ de la señal **15**.



Fuente: Esta investigación.

Figura 53. Espectro de absorción UV-Vis de la señal **15**.

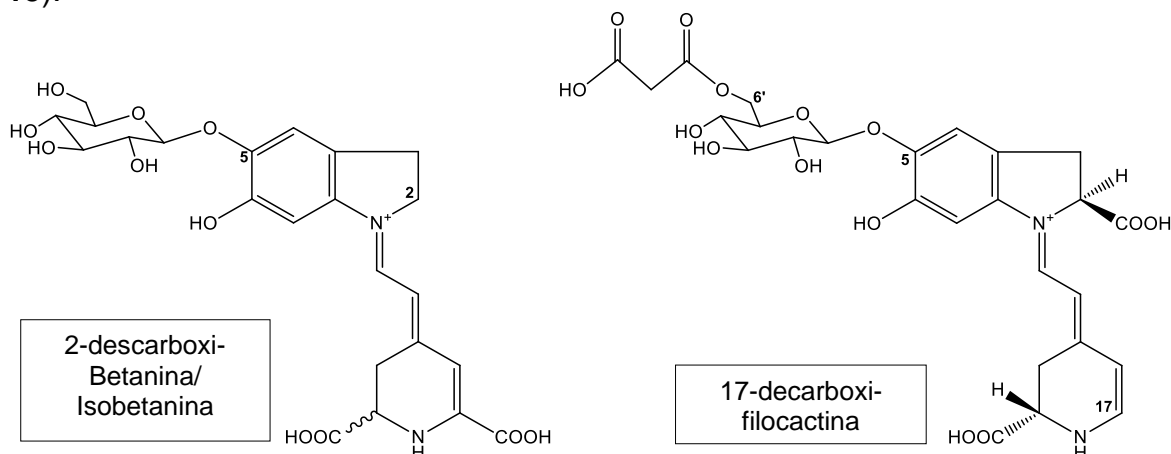


Fuente: Esta investigación.

³³⁹ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2005. Op. cit., p. 2613.

³⁴⁰ WYBRANIEC y MIZRAHI, 2005. Op. cit., p. 6709.

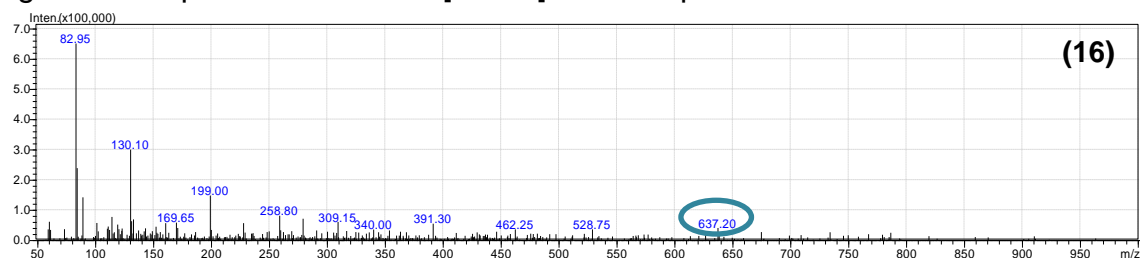
Figura 54. Estructuras propuestas para los compuestos encontrados en el $t_R = 9,8$ (pico 15).



Fuente: Adaptado de Khan (2015).

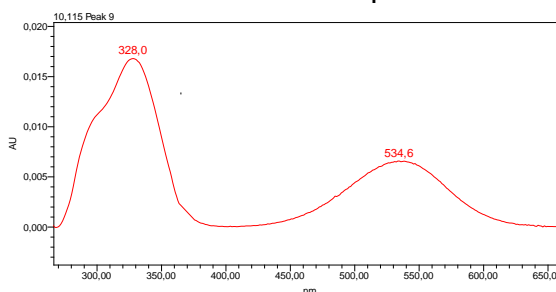
El pico **16** presentó un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z de 637 (figura 55), y una absorbancia de 534,6 nm (figura 56), que de acuerdo a su t_R fue asignado como un isómero de la filocactina, pero con el grupo malonil sustituido en la posición 4³⁴¹. La estructura de la 4'-O-malonil-betanina [betanidina 5-O-(4'-O-malonil- β -glucósido)] se presenta en la figura 57.

Figura 55. Espectros de masas $[M + H]^+$ del compuesto **16**.



Fuente: Esta investigación.

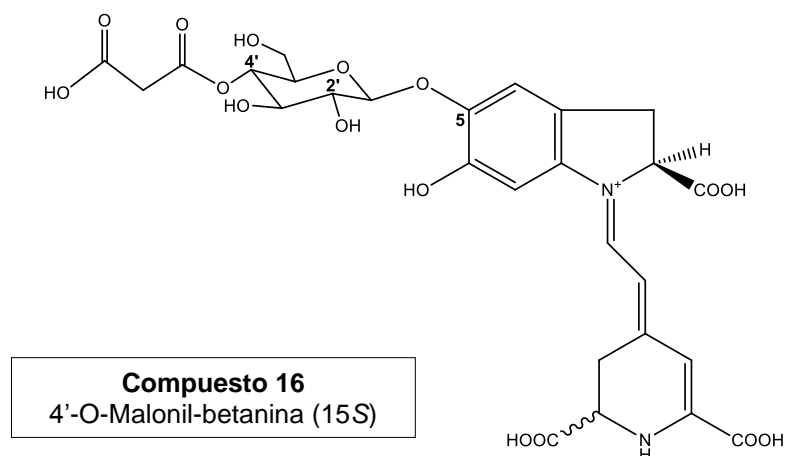
Figura 56. Espectros de absorción UV-Vis del compuesto **16**.



Fuente: Esta investigación.

³⁴¹ WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. *Phytochemistry*, 2007. vol. 68, no. 2, p. 251-259.

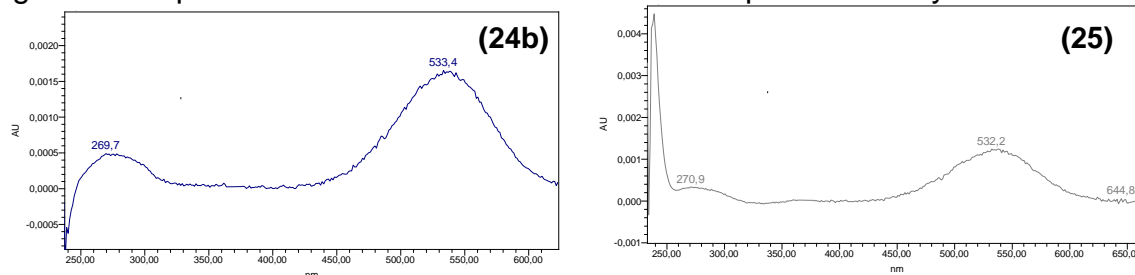
Figura 57. Estructura de 4'-O-Malonil-betanina propuesta para el compuesto **16**.



Fuente: Adaptado de Khan (2015).

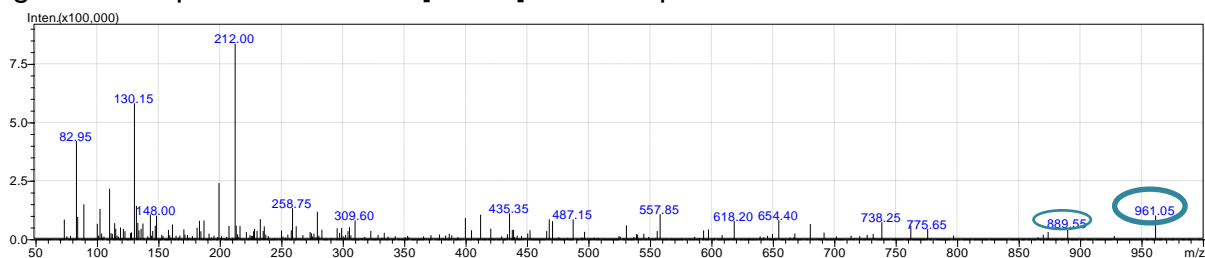
Los picos **24b** y **25** presentaron $A_{m\acute{a}x}$ tanto a ~ 533 nm como a ~ 270 nm (figura 58), y sólo se identificó un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z de 961 y un ion fragmento con m/z 889 en el espectro de masas del pico **24b** (figura 59). Kugler *et al*³⁴² y Svenson *et al*³⁴³ reportaron un compuesto de m/z 889 a un t_R cercano y menor a lamprantina II. Por tanto, podría tratarse de un derivado de betanidina-monoferuloil-5-O- β -diglucosido y su isómero. La estructura general se muestra en la figura 60.

Figura 58. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos **24b** y **25**.



Fuente: Esta investigación.

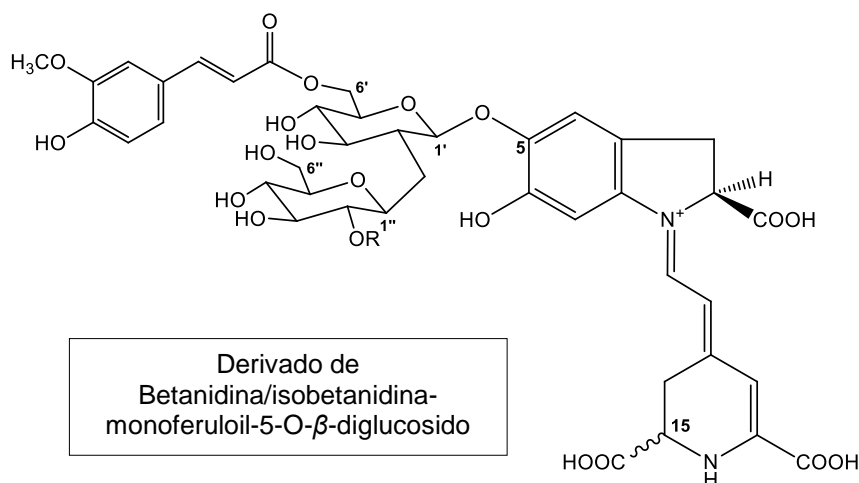
Figura 59. Espectro de masas $[M + H]^+$ del compuesto **24b**.



³⁴² KUGLER, STINTZING y CARLE. Op. cit., p. 2975-2981

³⁴³ SVENSON, *et al*. Op. cit., p. 7732.

Figura 60. Estructura propuesta para los compuestos **24b** y **25**.



Fuente: Adaptado de Khan (2015).

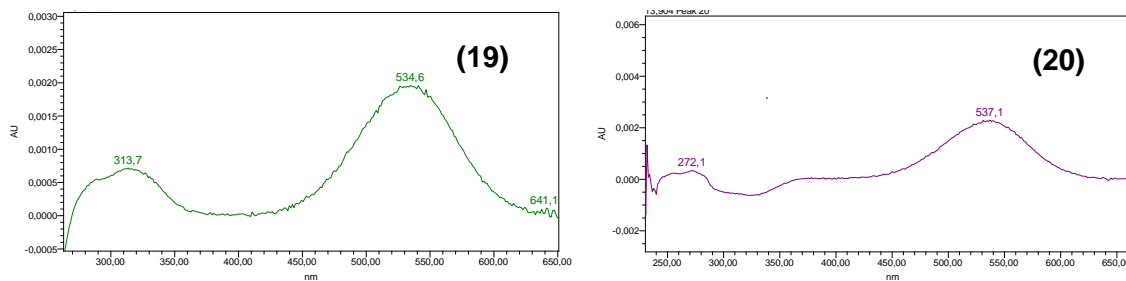
Los picos restantes, que indican presencia de BC, **19**, **20** y **22b** presentaron algunas diferencias entre lo observado en el EP y en la FBC. El pico **22b**, que había sido encontrado como trazas en el EP (figura 35), aparece con una intensidad mayor en la FBC. Mientras que otros picos, como **19** y **20** ya no se detectaron. Estos cambios podrían asumirse como una isomerización o degradación durante los procesos fraccionamiento y/o secado ya que la exposición al oxígeno y a la temperatura pueden afectar la estabilidad de las betacianinas³⁴⁴. A pesar de las diferencias observadas entre EP y FBC, los compuestos en cuestión son minoritarios, (intensidad de absorción 40 veces menor al compuesto mayoritario) y no afectan la identificación de los compuestos mayoritarios, que son el objetivo de esta investigación. Sin embargo, la asignación de estas señales se muestra a continuación.

El pico **19** presentó un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z 637 y una $\lambda_{\text{máx}}$ de 534,6 nm; además por su t_R (mayor a la filocactina) se asignó como 4'-O-malonil-isobetanina [isobetanidina 5-O-(4'-O-malonil- β -glucósido)]³⁴⁵, cuya estructura se puede observar en la figura 57. Para el pico 20 se logró distinguir un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z de 775 y un ion fragmento m/z 551 que sugiere un derivado de betanina con $\lambda_{\text{máx}}$ de 537,1 nm. Los espectros de absorción y masas de estos dos compuestos se muestran en la figuras 61 y 62.

³⁴⁴ HERBACH, STINTZING y CARLE, 2005. Op. cit., p. 2603-2616.

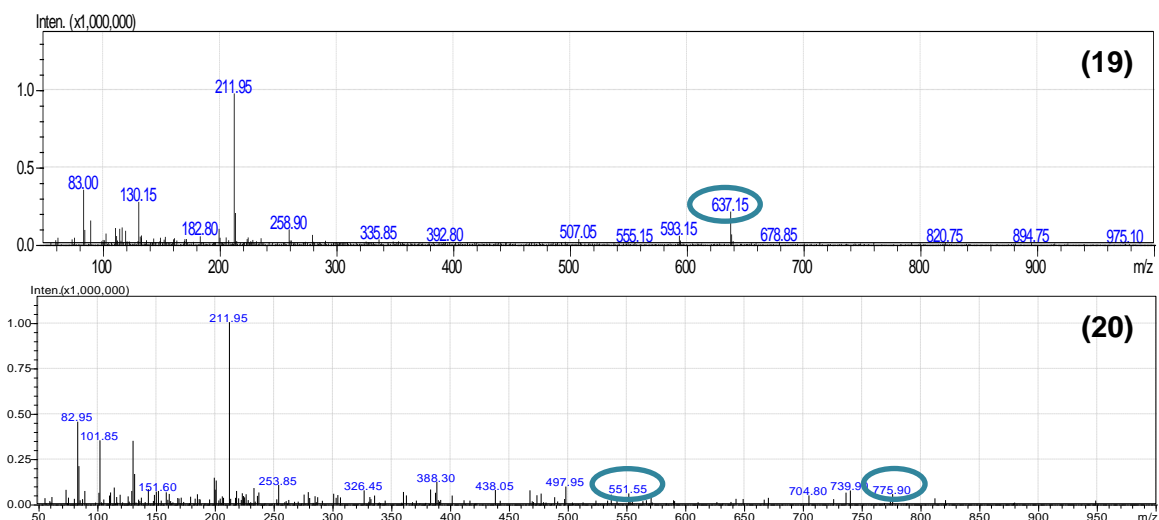
³⁴⁵ WYBRANIEC, *et al*, 2007. Op. cit., p. 251-259.

Figura 61. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos **19** y **20**.



Fuente: Esta investigación.

Figura 62. Espectros de masas de los compuestos **19** y **20**.

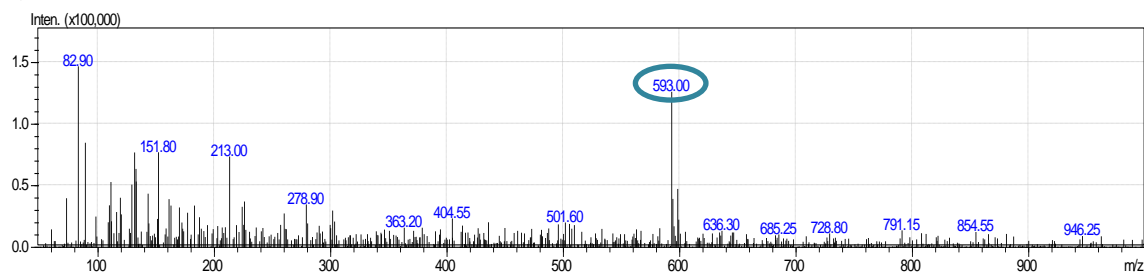


Fuente: Esta investigación.

El compuesto **22b**, que como se mencionó anteriormente, es el pico que aparece únicamente en la FBC, presenta un ion $[M + H]^+$ con m/z de 593 (figura 63) y una $\lambda_{\text{máx}}$ de 533,4 nm (figura 64). Estos valores coinciden con un compuesto que corresponde a la filocactina o isofilocactina descarboxilada en la posición 2³⁴⁶ (figura 65). Aunque este pico se evidenció en EP, su aparición fue muy baja, en cambio en FBC aumentó, esto indica que este es un compuesto de degradación que resulta luego de la exposición ambiental a la que se somete este extracto en procedimientos tales como fraccionamiento y secado.

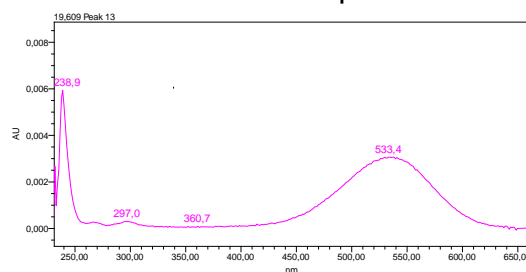
³⁴⁶ WYBRANIEC y MIZRAHI, 2005. Op. cit., p. 6709.

Figura 63. Espectro de masas $[M + H]^+$ del compuesto **22b**.



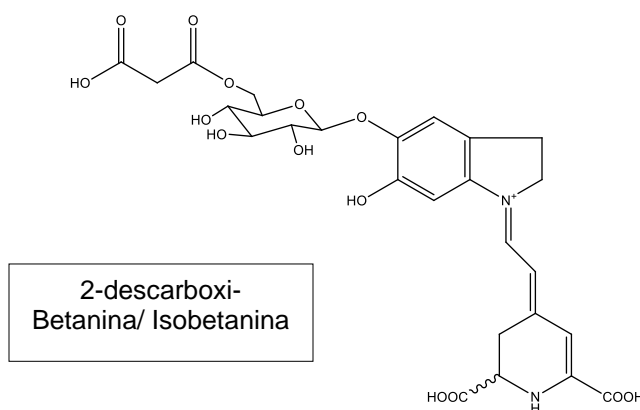
Fuente: Esta investigación.

Figura 64. Espectro de absorción UV-Vis del compuesto **22b**.



Fuente: Esta investigación.

Figura 65. Estructura de 2-decarboxi-filocactina/isofilocactina propuesta para el compuesto **22b**.



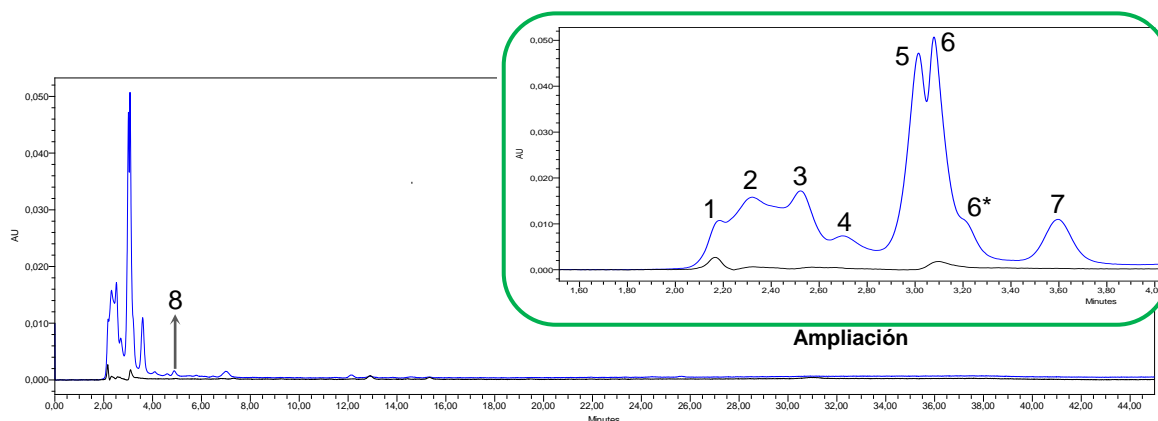
Fuente: Esta investigación.

- ❖ Identificación de los compuestos en la fracción rica en betaxantinas (FBX) de coloración amarilla.

En la fracción amarilla la gran mayoría de picos se detectaron en los primeros 5 minutos del perfil cromatográfico a 480nm (línea azul, figura 64), donde se distinguieron al menos 8 compuestos. A partir del minuto 5, se evidenciaron unos pocos picos; sin embargo, su baja intensidad y la ausencia de señales sobresalientes a 538 nm

indicaron que la fracción amarilla debe su coloración principalmente a los compuestos con absorbancias máximas en la región visible, entre 455,5 y 471,3 nm.

Figura 66. Perfiles cromatográficos a 480 nm (línea azul) y a 538 nm (línea negra) de la fracción amarilla FBX.



Fuente: Esta investigación.

Los picos que se observan en la ampliación de la figura 66 se encuentran solapados y coeluyeron con una gran cantidad de compuestos fenólicos incoloros que absorben alrededor de 280 nm (ver cromatograma a 280 nm, anexo I); de manera que los espectros de masas presentaron valores de m/z ambiguos que complican su identificación. Aun así, fue posible asignar parcialmente las betaxantinas mayoritarias (**5** y **6**) (ver anexo J) y algunos minoritarios como se explica a continuación.

Con base en la comparación de los t_R del extracto de remolacha ER (ver anexo K) se plantea que el compuesto de mayor área (**6**), con una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 466,5 nm (figura 67), corresponda a la vulgaxantina I (figura 68), ya que esta ha sido reportada como la betaxantina más abundante en la remolacha roja^{347,348,349}. Junto a la señal **6**, se evidenció un hombro (**6***) que indica el solapamiento de un compuesto no detectado en el EP que sugiere la formación de algún producto de degradación o isomerización, con una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 461,6 nm, como resultado del procedimiento de secado al que fue sometida la FBX (sección 4.5), ya que la temperatura y el oxígeno afectan la estabilidad de las betaxantinas³⁵⁰. Los mecanismos de degradación de betaxantinas no han sido elucidados hasta ahora³⁵¹, sin embargo, podría tratarse de una isomerización, descarboxilación o escisión³⁵² de cualquiera de las betaxantinas presentes en la FBX. Aunque cabe mencionar la posibilidad de que la vulgaxantina I (propuesta como el

³⁴⁷ NEMZER, *et al.* Op. cit., p. 50

³⁴⁸ GASZTONYI, *et al.* Op. cit., p. 932-933.

³⁴⁹ STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. Op. cit., p. 2302-2307.

³⁵⁰ WENDEL, M., *et al.* Photophysical properties of betaxanthins: Vulgaxanthin I in aqueous and alcoholic solutions. *En: Journal of Luminescence*, 2015, vol. 167, p. 289-295.

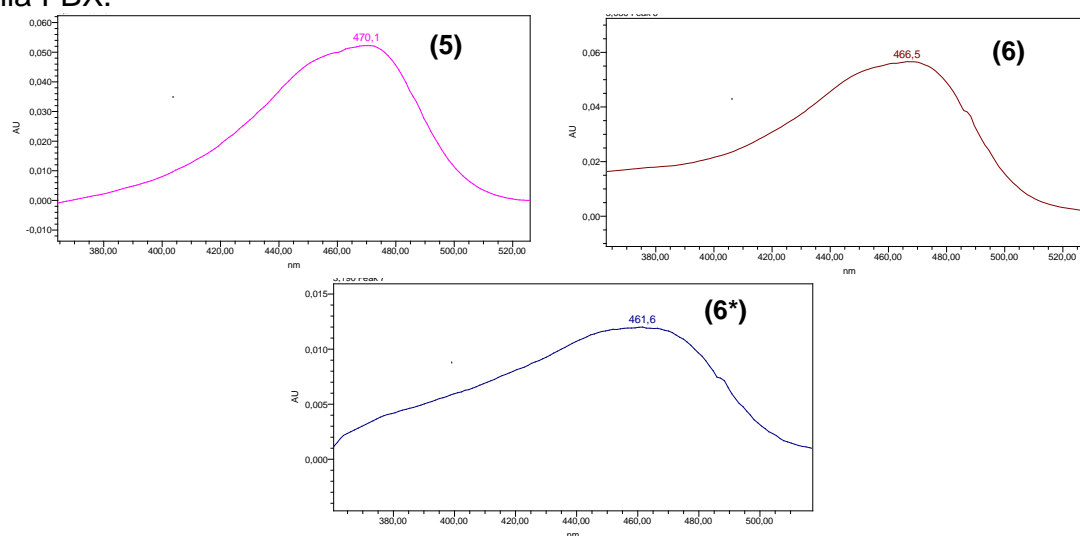
³⁵¹ CAI, Yizhong, *et al.* Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. vol. 49, no. 9, p. 4434.

³⁵² DEHBI. Op. cit., p 812.

compuesto **6**) sea la BX que se isomeriza debido a la cercanía de sus t_R . Si bien es cierto que el isómero de la vulgaxantina I nunca ha sido reportado, un estudio reciente sugiere que existe en solución como una mezcla de dos formas estereoisoméricas³⁵³

Por su parte, el pico **5** con una $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 470,1 nm (figura 67) podría corresponder a la arginina-betaxantina (figura 68) reportada por Svenson *et al*³⁵⁴, que al igual que en esta investigación se encontró solapada con la vulgaxantina I. Los autores reportaron niveles altos de ambas betaxantinas en ullucos amarillos, pero no en los rojos; sin embargo, encontraron una gran variabilidad en el contenido relativo de betaxantinas tanto en los tubérculos amarillos como rojos. Por lo anterior, es posible sugerir la presencia de dos betaxantinas que usualmente se han encontrado en variedades amarillas. Además la coloración no del todo roja sino magenta del ulluco lo sugieren ya que las diferencias en el estado de maduración o profundidad del suelo puede afectar la distribución de betaxantinas en los diferentes tubérculos³⁵⁵.

Figura 67. Espectros de absorción de los compuestos mayoritarios (**5** y **6**) en la fracción amarilla FBX.



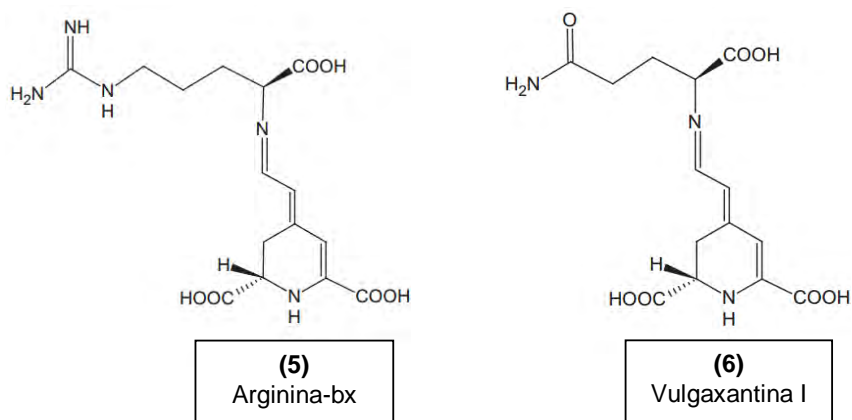
Fuente: Esta investigación.

³⁵³ WENDEL. Op. cit., p. 289.

³⁵⁴ SVENSON, *et al*. Op. cit. p. 7730-7737.

³⁵⁵ *Ibid.* p. 7730-7737.

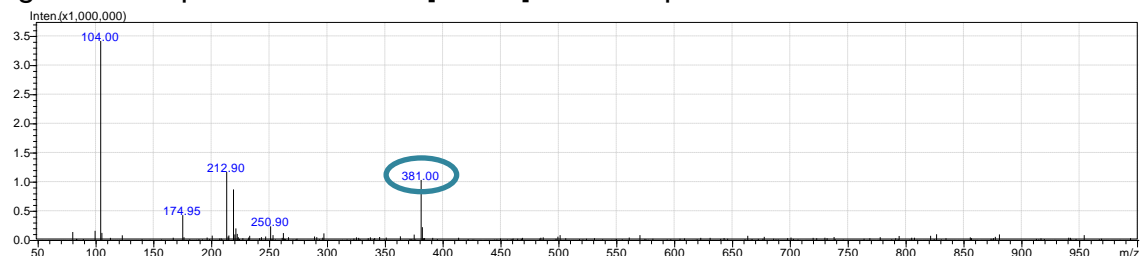
Figura 68. Estructura de la arginina-bx y vulgaxantina I propuestas para los compuestos principales (5 y 6) en la fracción amarilla FBX.



Fuente: Adaptado de Khan (2015).

Entre los compuestos minoritarios de la fracción amarilla, se lograron detectar los valores de m/z de los picos **1**, **7** y **8**. Para el compuesto **1** se encontró un ion pseudomolecular $[M + H]^+$ con m/z de 381 (figura 69) y una $\lambda_{\text{máx}}$ de 455,5 nm (no identificada). Stintzing *et al.*³⁵⁶ reportan una $\lambda_{\text{máx}}$ de 454 nm para una BX que también eluye antes que la vulgaxantina I, cuya estructura no ha sido identificada. Este pseudoion molecular ($m/z = 381$) también se encontró en un t_R similar en el extracto de referencia de remolacha ER analizado en esta investigación (ver anexo H).

Figura 69. Espectro de masas $[M + H]^+$ del compuesto **1**.



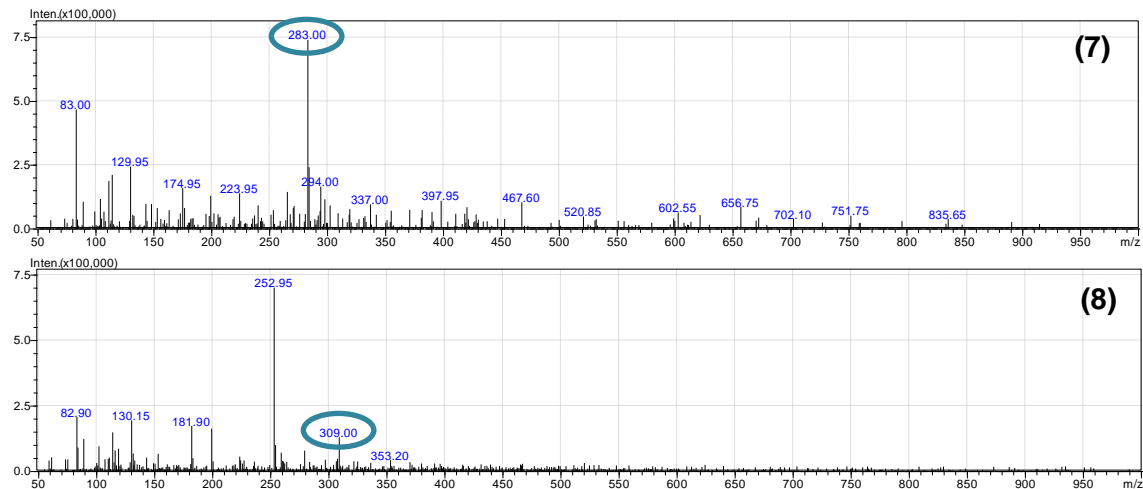
Fuente: Esta investigación.

El espectro de masas de las señales **7** y **8** muestran iones pseudomoleculares $[M + H]^+$ con m/z de 283 y 309 (figura 70); además de $\lambda_{\text{máx}}$ de 468,9 y 465,2 nm (figura 71), respectivamente, que fueron tentativamente asignados como la alanina-bx y prolina-bx (indicaxantina), las que han sido reportadas en ese mismo orden de elución en extractos de acelga³⁵⁷. Sus estructuras se muestran en las figura 72.

³⁵⁶ STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. Op. cit., p. 2305.

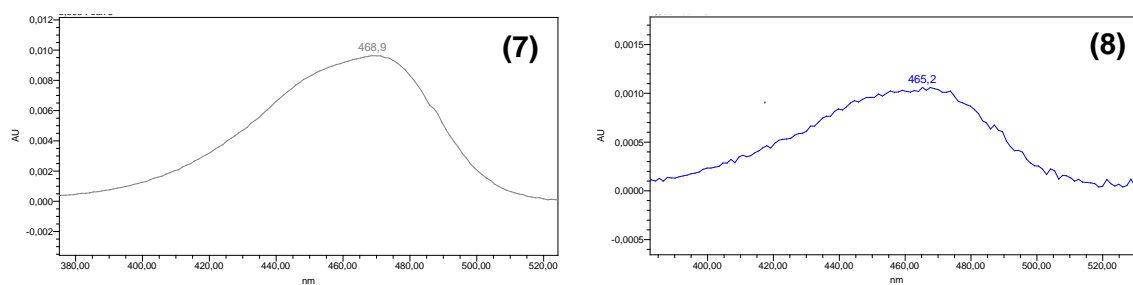
³⁵⁷ KUGLER, Florian, *et al.* Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae. *En: Zeitschrift für Naturforschung C*, 2007. vol. 62, no. 5-6, p. 311-318.

Figura 70. Espectros de masas $[M + H]^+$ de los compuestos **7** y **8**.



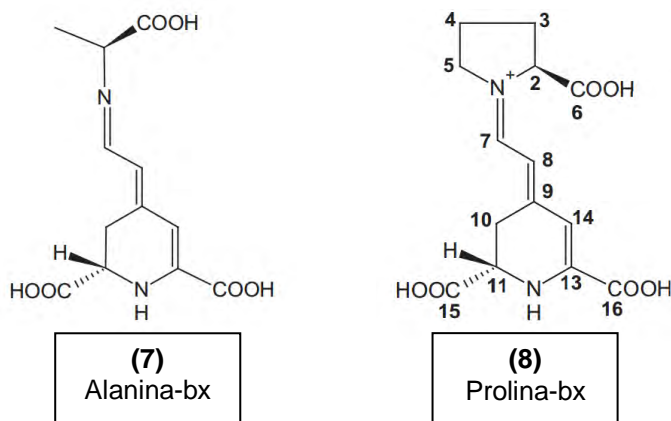
Fuente: Esta investigación.

Figura 71. Espectros de absorción de los compuestos **7** y **8**.



Fuente: Esta investigación.

Figura 72. Estructura de la alanina-bx y prolina-bx propuestas para los compuestos **7** y **8**.

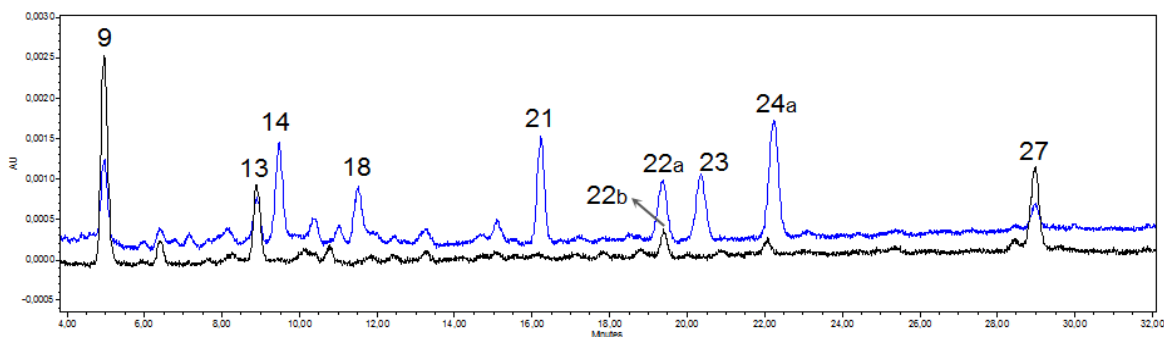


Fuente: Adaptado de Khan (2015).

❖ Identificación de los compuestos en la fracción intermedia (FI) de coloración anaranjada

En los análisis cromatográficos de la fracción intermedia FI las señales aparecen, a partir del minuto 4, tanto en el perfil a 538 nm como a 480 nm (figura 73); esto permite sugerir que la FI debe su coloración anaranjada a una mezcla de betacianinas rojas y betaxantinas amarillas; no obstante, estas últimas muestran una menor polaridad en comparación con las betaxantinas eluidas en la fracción FBX, que se refleja en sus mayores t_R . La literatura publica que este tipo de compuestos puede tratarse ya sea, de un grupo de betaxantinas de menor polaridad o de un tipo de betacianinas deshidrogenadas, conocidas como neobetacianinas, que experimentan un efecto hipsocrómico reflejado en el desplazamiento de $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 538 a 470 nm, mostrando así características de retención y espectrales similares a las betaxantinas menos polares^{358,359}.

Figura 73. Perfiles cromatográficos a 538 (línea negra) y 480 nm (línea azul) de la fracción intermedia FI.



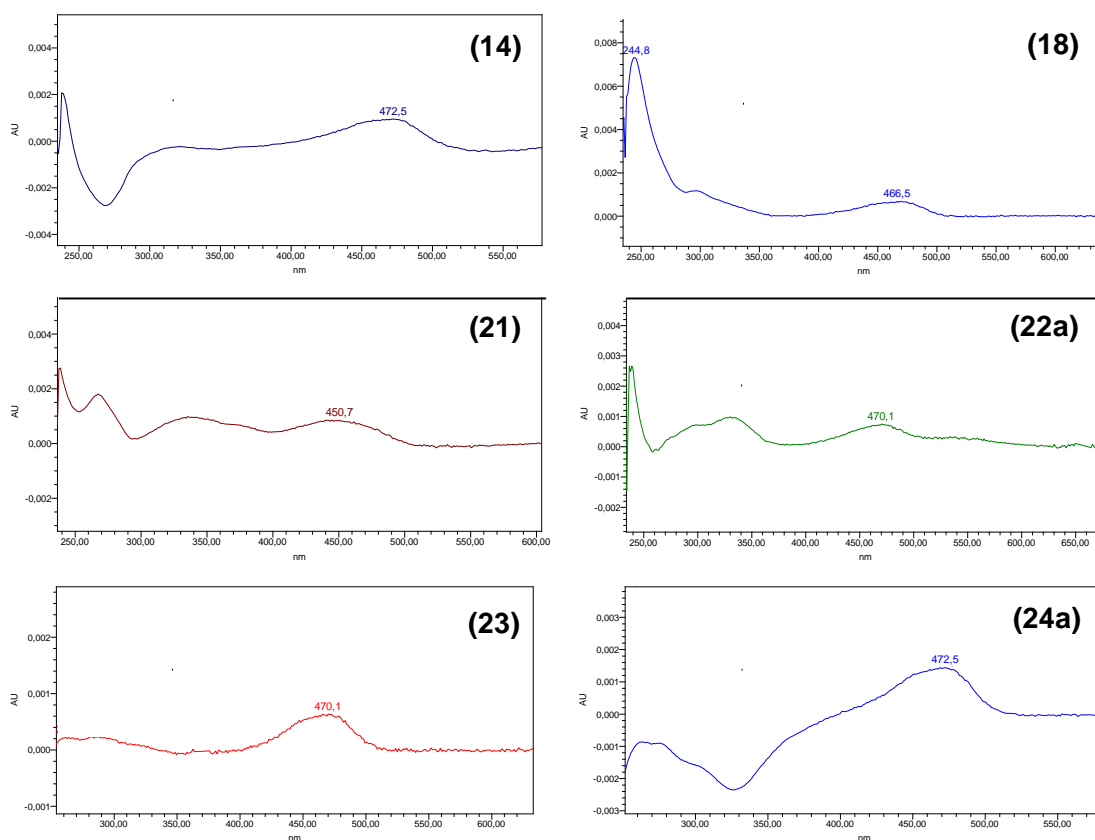
Fuente: Esta investigación.

La mayoría de los picos (**14**, **18**, **21**, **22a**, **22b**, **23** y **24a**) que se observan en la figura 71 presentaron $\lambda_{m\acute{a}x}$ en la región visible en un rango de 450,1 a 473,8 nm, como se muestra en los espectros de absorción de la figura 74.

³⁵⁸ WYBRANIEC, *et al.*, 2013. Op. cit., p. 6465-6476.

³⁵⁹ WYBRANIEC y MIZRAHI, 2005. Op. cit., p. 6704-6712.

Figura 74. Espectros de absorción de los compuestos en el perfil a 480 nm de la fracción intermedia FI.

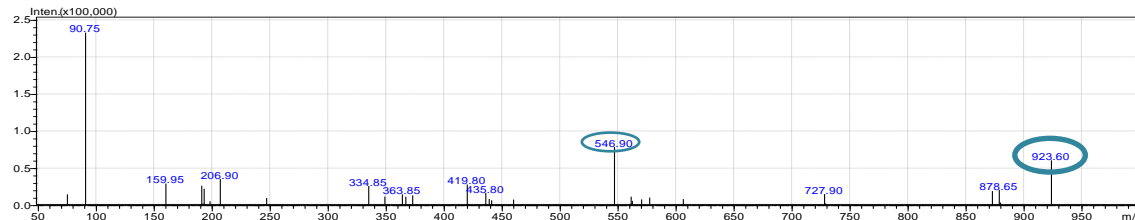


Fuente: Esta investigación.

El perfil cromatográfico de FI (figura 73) muestra que esta fracción está enriquecida principalmente por las betaxantinas de menor polaridad observadas en el extracto EP (figura 33). Debido a su baja concentración fue difícil encontrar iones moleculares; sin embargo, se encontró que el pico **18** presenta un ion pseudo molecular $[M - H]^-$ con $m/z = 923$ (no identificado) y un ion fragmento con $m/z = 547$ (figura 73), además de 3 máximos de absorción ($\lambda_{\text{máx}} = 244,8; 300 \text{ y } 466,5 \text{ nm}$), que de acuerdo a la literatura corresponde la neobetantina (figura 74), para la cual reportan tres máximos de absorción similares (267, 306 y 470 nm) y un peso molecular de 548. Esta asignación se puede corroborar teniendo en cuenta que el espectro de masas para esta señal, en el extracto de referencia (ER), presentó un ion pseudomolecular $[M - H]^+$ con $m/z = 549$ (ver figura 77 y anexo H). La neobetantina se ha identificado como producto de degradación por calentamiento o como una glucona de origen natural en varias plantas, incluyendo *B. vulgaris*, *O. ficus-indica*, *P. grandiflora*, *Zygocactus truncatus*, *Phytolacca bogotensis* y *warmingiana Rhipsalis*³⁶⁰.

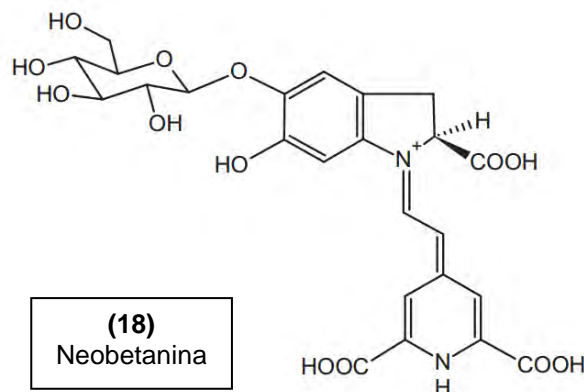
³⁶⁰ KHAN y GIRIDHAR. Op. cit., p. 278.

Figura 75. Espectro de masas $[M - H]^-$ del compuesto **18**.



Fuente: Esta investigación.

Figura 76. Estructura de la neobetantina propuesta para el compuesto **18**.



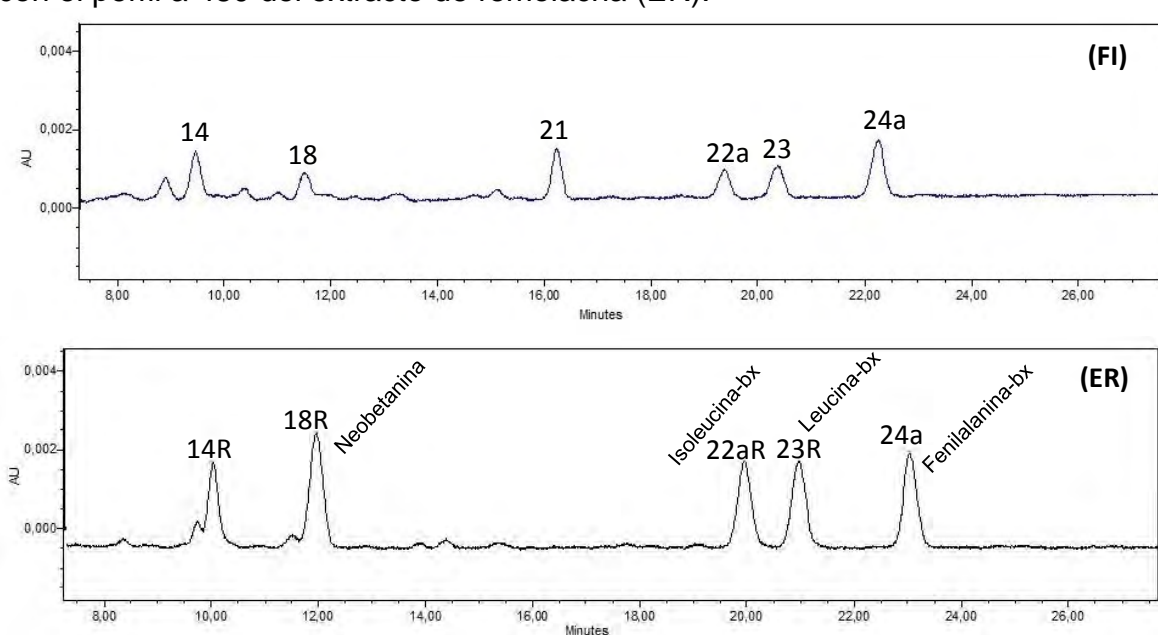
Fuente: Adaptado de Khan (2015).

Como se explicó en el párrafo anterior, debido a la baja concentración, los valores m/z de los demás picos a 480 nm no pudieron ser establecidos. Sin embargo, al realizar una comparación el perfil a 480 nm de la FI con el del extracto de remolacha ER (figura 77) se logró identificar por similitud de los t_R que los picos **14**, **18**, **22**, **23** y **24** también se encuentran en la remolacha. De entre ellos, fue posible asignar las estructuras parciales para los picos **22a**, **23** y **24a** como isoleucina-bx, leucina-bx (vulgaxantina IV) y fenilalanina-bx (figura 76), que han sido encontradas en un orden de elución similar en la remolacha y en el ulluco investigados por Kugler *et al*³⁶¹ y Svenson *et al*³⁶², respectivamente.

³⁶¹ KUGLER, *et al.* Op. cit., p. 311-318.

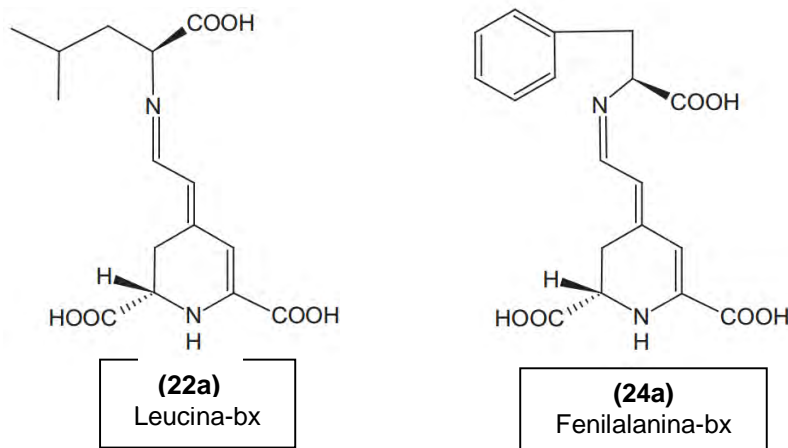
³⁶² SVENSON, *et al.* Op. cit., p. 7734.

Figura 77. Comparación del perfil cromatográfico a 480 nm de la fracción intermedia (FI) con el perfil a 480 del extracto de remolacha (ER).



Fuente: Esta investigación.

Figura 78. Estructura de la Leucina-bx y y fenilalanina-bx propuestas para los compuestos **22a** y **24a**.

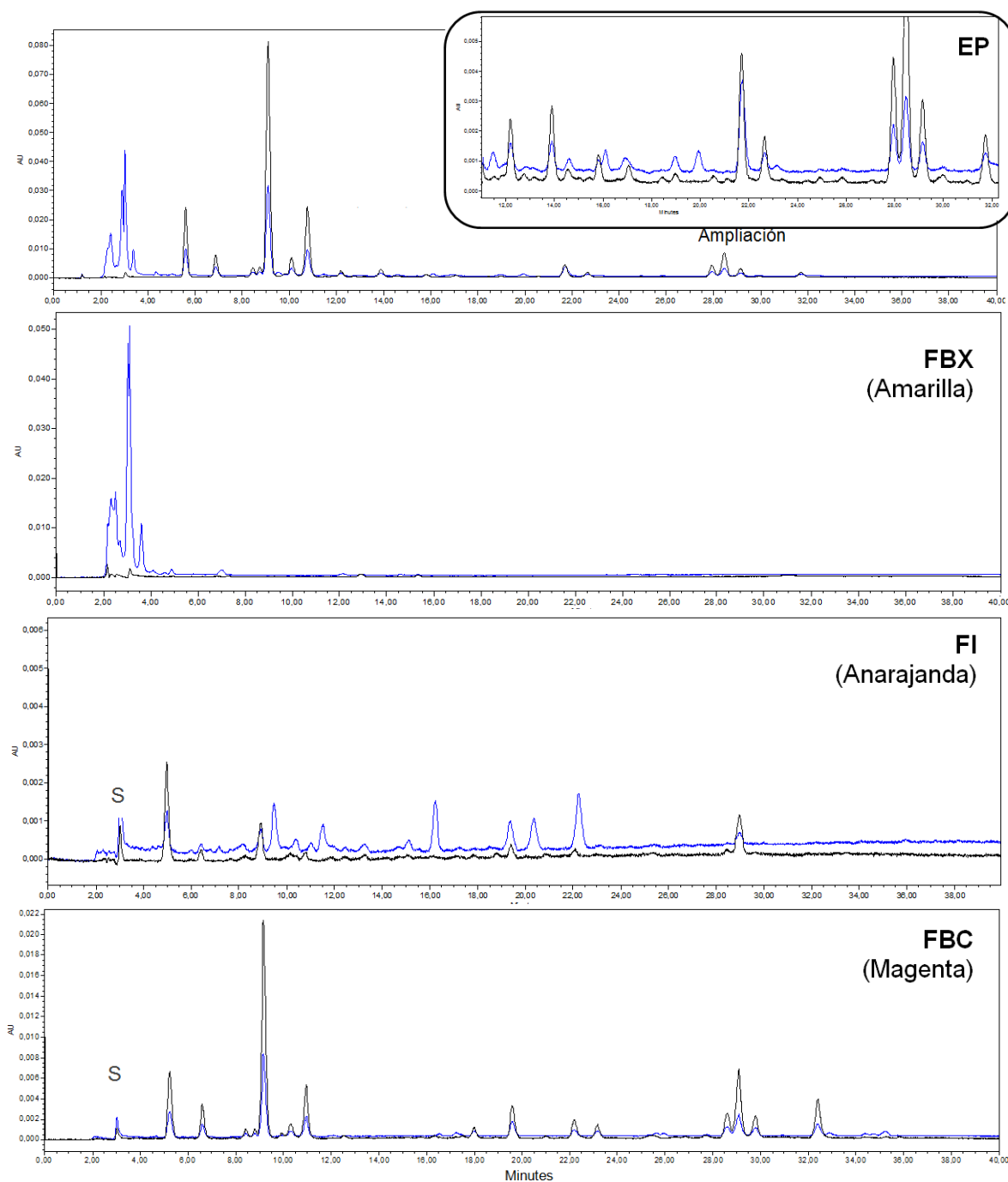


Fuente: Adaptado de Khan (2015).

La FI también presentó picos con $\lambda_{\text{máx}}$ de 538 nm (ver figura 71), que a diferencia de las señales a 480 nm, presentaron intensidades mucho menores en comparación a lo observado en EP; sin embargo, estas trazas fueron suficientes para conferirle coloración anaranjada a la fracción. Los picos en cuestión (**9**, **13** y **27**) se identificaron como las betacianinas: betanina, filocactina y lamprantina II; que ya se analizaron en la FBC donde estos compuestos se detectaron en mayor proporción.

La comparación de los perfiles cromatográficos del EP con las fracciones obtenidas (figura 79) reveló la composición de estas respecto al EP. De manera general, en la FBX únicamente se detectaron señales de importancia a 480 nm y a t_R bajos (primeros 5 minutos), identificando así la fracción con las betaxantinas más polares del extracto. Respecto a la FI, esta resultó ser una mezcla de pigmentos amarillos y rojos ya que presentó picos con $A_{máx}$ tanto a 480 como a 538 nm, los cuales también se apreciaron en el EP entre los minutos 5 y 30 (ver ampliación 3, figura 35). Cabe mencionar que los pigmentos amarillos de la FI son menos polares que aquellos detectados en la FBX, pues sus tiempos de retención mayores así lo sugieren. Por su parte, en la FBC los compuestos corresponden a betacianinas, que en su gran mayoría también se detectaron en EP. Estos resultados corroboran la información dada en la sección anterior sobre el contenido de las fracciones, demostrando una vez más que aunque se obtuvo una fracción (FI) que resultó ser una mezcla, en general se observó una separación adecuada entre los compuestos amarillos y rojos, lo cual permitió una mejor identificación y además, evaluar por separado su actividad antioxidante, como se mostrará en la siguiente sección.

Figura 79. Comparación de los perfiles cromatográficos a 480 nm (línea azul) y a 538 nm (línea negra) del extracto purificado EP y las tres fracciones (FBX, FI y FBC).



*S = señal de sistema cromatográfico. Fuente: Esta investigación.

Un resumen de los compuestos encontrados se registra en la tabla 6.

Tabla 6. Características de compuestos encontrados en la corteza del ulluco.

<i>Pico</i>	<i>t_R</i> [min] ^b	<i>λ</i> _{máx} [nm]	<i>m/z</i> [<i>M + H</i>] ⁺	<i>Betalaína</i>
1	2,2	454,3	381	--
2	2,3	456,7	--	--
3	2,4	468,9	--	--
4	2,7	471,3	--	--
5 ^a	2,9	470,1	--	Arginina-betaxantina
6	3,0	466,5	--	Vulgaxantina I [Glutamina-Betaxantina]
6* ^a	3,2	461,6	--	Isómero de vulgaxantina I
7	3,4	468,9	283	Alanina-Betaxantina
8	4,4	465,2	309	Indicaxantina [Prolina-Bx]
9	5,6	534,6	551	Betanina [Betanidina 5-O-β-glucósido]
10	6,9	534,6	551	Isobetanina [Isobetanidina 5-O-β-glucósido]
11 ^a	8,5	538,3	619	Dehidroxi-filocactina/isofilocactina
12 ^a	8,8	537,1	619	Dehidroxi-filocactina/isofilocactina
13	9,1	534,6	637	Filocactina [betanidina 5-O-(6'-O-malonil)-β-glucósido]
14	9,5	473,8	--	--
15 ^a	9,8	537,1	593 507	17-decarboxi-filocactina 2-decarboxi-betanina
16	10,1	534,6	637	4'-O-malonil-betanina [Betanidina 5-O-(4'-O-malonil-β-glucósido)]
17	10,8	534,6	637	Isofilocactina [Isobetanidina 5-O-(6'-O-malonil)-β-glucósido]
18	11,4	466,5	547 [‡]	Neobetanina [14,15-deshidrobetanina]
19	12,2	534,6	637	4'-O-Malonil-isobetanina [Isobetanidina 5-O-(4'-O-malonil-β-glucósido)]
20 ^a	13,9	537,1	775, 551	Derivado de betanina
21	16,1	443,4	--	--
22a ^a	18,9	470,1	--	Isoleucina-betaxantina
22b	18,9	533,4	593	6'-O-Malonil-2-descarboxi-betanina
23 ^a	19,9	470,1	--	Vulgaxantina IV (Leucina- betaxantina)
24a ^a	21,7	472,5	--	Fenilalanina-betaxantina
24b	21,7	533,4	961, 889	Derivado de betanidina-monofeferuloil-5-O-β-diglucosido

25 ^a	22,6	532,2	---	IsoFeruloil-bougainvillein-r I Derivado de betanidina-monoferuloil-5-O- β -diglucosido
26 ^a	27,9	539,5	---	Lamprantina II [Betanidina 5-O-(6'-O-feruloil)- β -glucósido]
27	28,4	546,9	727	Gomprenina III [Betanidina 6-O-(6'-O-feruloil)- β -glucósido]
28 ^a	29,1	539,5	---	Isolamprantina II Isobetanidina 5-O-(6'-O-feruloil)- β - glucósido
29	31,7	546,9	727	Isogomprenina III [Isobetanidina 6-O-(6'-O-feruloil)- β - glucósido]

[¥] m/z [M - H]⁻, ^a Tentativamente identificados [algunos de los cuales se asignaron por comparación con el extracto de referencia (extracto de remolacha, ER)], ^b Tiempos de retención por HPLC-PDA.

5.7 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

El uso de técnicas para determinar el contenido fenólico en alimentos es ampliamente utilizado dado el interés de determinar su correlación con la actividad antioxidante. Teniendo en cuenta que el ulluco contiene compuestos fenólicos³⁶³, estos fueron cuantificados en los extractos y fracciones (EC, EP FBX, FI y FBC) empleando el método de Folin-Ciocalteu (F-C) descrito en la sección 4.7. Los parámetros estadísticos que se mencionarán a lo largo de las siguientes secciones se calcularon con ayuda del programa estadístico STATGRAPHIC Centurion XV.

El método de F-C requiere la construcción de una curva de calibrado, para la cual generalmente se emplea ácido gálico (AG) como patrón³⁶⁴. En este estudio se utilizaron soluciones patrón de AG entre 10 y 150 ppm que tras someterlas a la reacción, generaron la coloración azul característica del método. En la tabla 7 se presentan los valores de absorbancia promedio, junto a sus desviaciones estándar (S) para un n = 3. Los valores bajos de S muestran una buena precisión en la toma de datos. Además, la prueba de verificación de varianza (prueba de levene, anexo L) indica que los errores en la curva de calibrado en la ordenada y (absorbancia) son aproximadamente iguales para todos los puntos de x (concentración), es decir presentan homocedasticidad con un nivel de confianza del 95,0% y por tanto, el tratamiento de los datos por el método de mínimos cuadrados no ponderado es legítimo³⁶⁵.

³⁶³ DINI, *et al.* Op. cit., p. 1053-1058

³⁶⁴ PRIOR, WU, y SCHAICH. Op. cit., p. 4297.

³⁶⁵ MILLER, N.J. y MILLER J.C. Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid (España) : Pearson Educación, S.A. 2002. p 135.

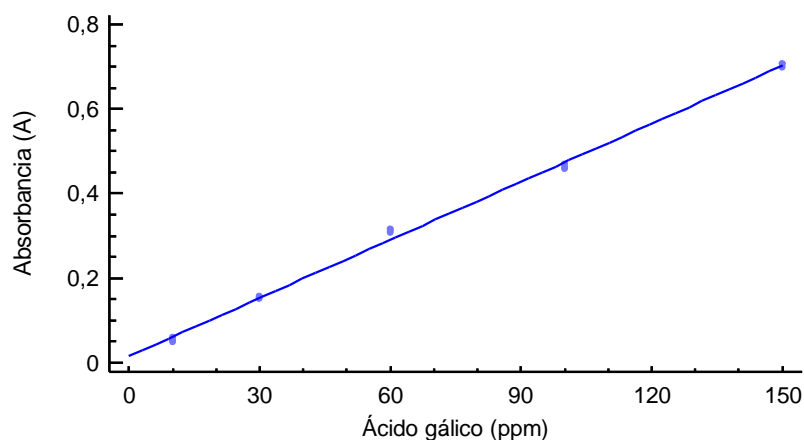
Tabla 7. Resultados del método Folin-ciocalteau con patrones de ácido gálico.

Concentración AG ^a (ppm)	A ^b	S ^c
	Promedio	
10	0,051	0,005
30	0,153	0,004
60	0,311	0,004
100	0,462	0,005
150	0,704	0,005

^a Acido gálico, ^b Absorbancia (Promedio de tres mediciones),

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

Figura 80. Curva de calibración con ácido gálico para determinación de fenoles totales.



Fuente: Esta investigación.

La representación gráfica de la línea de calibrado construida a partir de los datos de la tabla 7 se muestra en la figura 80. En el rango de concentraciones evaluado (10-150 ppm) existe un alto grado de linealidad que no sólo se aprecia por simple inspección visual si no por los valores cercanos a 1 del coeficiente de correlación (r) y determinación (r^2) (tabla 8). La magnitud del r indica que existe una correlación directa y relativamente fuerte entre las variables; lo cual se considera estadísticamente significativo, dado que el valor t -calculado resultó ser mayor que el t -tabulado, a un nivel de confianza del 95,0% ($p < 0,05$). Por su parte, el r^2 indica que el poder explicativo o bondad de ajuste del modelo lineal es alto. La ecuación que describe a este modelo es la siguiente:

$$y (A) = 0,0146 + 0,0046 x (\text{ppm}) \quad \text{Ec. (4)}$$

Tabla 8. Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método F-C.

<i>Parámetros</i>	<i>Valores</i>
Intercepto (a)	0,0146 ± 0,0056 ^a
Pendiente (b)	0,0046 ± 6,559E-05 ^b
Coefficiente de correlación (r)	0,9987
Coefficiente de determinación (r ²)	0,9974
t calculado	70,0274

^a Desviación estándar S_a , ^b Desviación estándar S_b .

Los parámetros estadísticos, registrados en la tabla 8, permiten inferir que el modelo lineal establecido para la curva de calibración es confiable y puede ser utilizado para estimar la concentración fenólica de las muestras de ensayo por interpolación. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el cálculo de un valor de x a partir de un valor dado de y utilizando la ecuación 3 conlleva el uso de la pendiente (b) como de la ordenada en el origen (a) que están sujetos a error. Experimentalmente existen varios factores que también están sujetos a errores aleatorios como por ejemplo la señal del instrumento derivada del material de ensayo, como resultado la determinación del error global en la concentración correspondiente puede ser extremadamente compleja. Sin embargo, el cálculo de S_{x_0} que se define como la desviación estándar del valor de x estimado (x_0), es comúnmente utilizada con este propósito (ver ecuación en anexo M)³⁶⁶. A su vez, a partir del S_{x_0} , se obtienen los límites de confianza LC , que indican el rango donde existe la posibilidad de encontrar el valor verdadero con un nivel de confianza del 95%. Estos valores de x_0 , S_{x_0} y LC se registran en la tabla 9 expresados como mg de ácido gálico por cada gramo de extracto o fracción (mg AG/g Muestra).

Tabla 9. Contenido de fenoles totales en los extractos y fracciones obtenidos de *Ullucus tuberosus*.

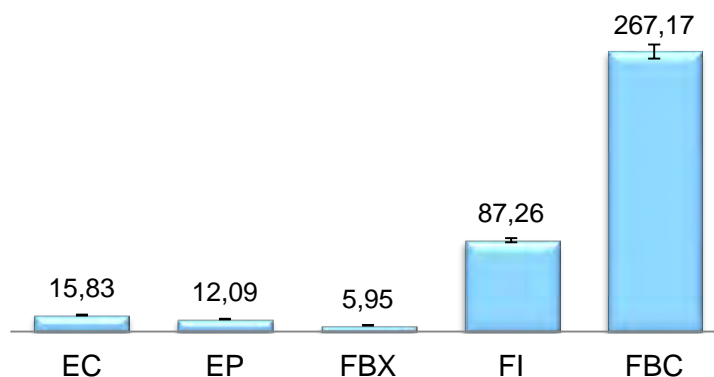
<i>Muestra</i>	<i>Fenoles Totales</i> (mg AG / g Muestra)		
	x_0	S_{x_0}	LC (95%)
EC	15,83	0,39	0,85
EP	12,09	0,25	0,54
FBX	5,95	0,14	0,30
FI	87,26	1,94	4,18
FBC	267,17	6,76	14,59

*AG = ácido gálico, x_0 = valor de x estimado utilizando la recta de regresión expresado en las unidades indicadas, S_{x_0} = desviación estándar de x_0 , LC = Límites de confianza, EC = extracto crudo, EP = extracto purificado, FBX = fracción rica en betaxantinas, FI = fracción intermedia, FBC = fracción rica en betacianinas.

³⁶⁶ MILLER y MILLER. Op. cit., p. 135.

El análisis estadístico, con la prueba de múltiples rangos (ver anexo N), muestra que existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, a excepción de las muestras EC y EP, con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Sin embargo, se puede observar que el EC presentó un contenido fenólico ligeramente menor que el EP, que puede deberse al proceso de precipitación de mucílagos (sección 4.4.2), los cuales podrían aportar contenido fenólico al extracto de ulluco. Se destaca que la FBC (color magenta) es quien representa el mayor contenido de compuestos fenólicos (267,17 mg AG/g muestra) seguido de la fracción FI (87,26 mg AG/ g muestra) y el EC (15,83 mg AG/ g muestra). Es importante resaltar también que la fracción amarilla (FBX) es quien presenta el menor contenido fenólico. El mayor contenido fenólico de FBC está en concordancia con lo publicado en la literatura^{367,368} ya que esta muestra (color rojizo) está enriquecida en betacianinas las cuales presentan en su estructura varios grupos hidróxilo sobre estructuras aromáticas, que como se sabe aportan positivamente a esta prueba³⁶⁹. Por su parte, y como era de esperarse, la FI al ser una mezcla de la FBX y FBC presentó un valor de contenido fenólico intermedio. Los resultados se representan mejor en el diagrama de barras de la figura 81, evidenciándose el siguiente orden decreciente FBC>FI>EC>EP>FBX.

Figura 81. Diagrama de barras del contenido fenólico (mg AG/g Muestra) de extractos y fracciones obtenidos a partir de *Ullucus tuberosus*.



Fuente: Esta investigación.

5.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad o capacidad antioxidante no puede ser evaluada por un sólo método debido a la naturaleza compleja de los compuestos fitoquímicos. Por tanto, en esta investigación se utilizaron dos de los ensayos más comunes: ABTS y DPPH. En términos generales, la capacidad antioxidante de los extractos y fracciones del *Ullucus*

³⁶⁷ BUTERA, *et al.* Op. cit., p. 6895-6901.

³⁶⁸ ESCRIBANO, *et al.* Op. cit., p. 124-127.

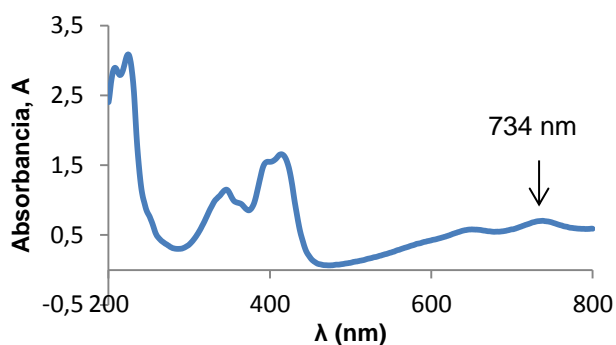
³⁶⁹ ROVER y BROWN, *et al.* Op. cit., p. 367.

tuberosus fue evaluada en relación con su capacidad para reducir a los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•].

5.8.1 MÉTODO TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox)

El método TEAC se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en la sección 4.8.1. Este consiste, básicamente, en medir la decoloración del catión radical ABTS^{•+} ocasionada por la capacidad reductora de un antioxidante. El seguimiento espectrofotométrico de la decoloración se realiza teniendo en cuenta que el radical ABTS^{•+} presenta una absorbancia máxima, en la región visible, a una λ de 734 nm, como se observa en la figura 82.

Figura 82. Espectro de absorción del catión radical ABTS^{•+}.



En el método TEAC los resultados generalmente se expresan en μmol Trolox/g Muestra. Para ello, se requiere la construcción de una curva de calibrado con soluciones patrón de Trolox desde 0 a 2500 μM que, tras someterlas a la reacción con el radical se decoloraron resultando los valores de absorbancia promedio, que se registran en la tabla 10, junto a sus desviaciones estándar S , para un $n = 3$. La prueba de verificación de varianzas para estos datos se muestra en el anexo O.

Tabla 10. Resultados del método ABTS con patrones de trolox.

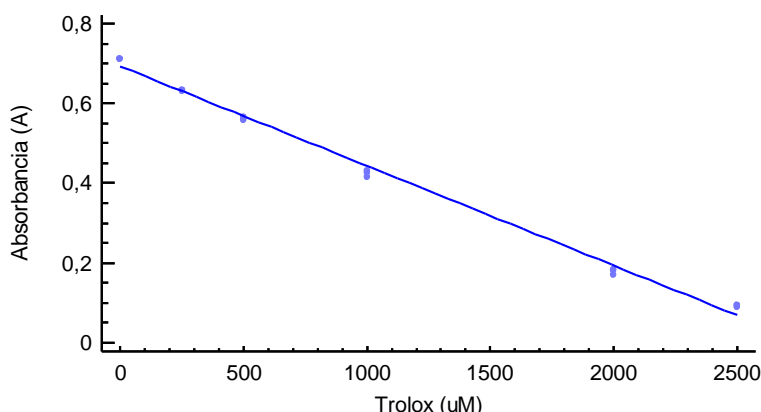
Concentración Trolox (μM)	A^a	
	Promedio	S^b
0	0,713	---
250	0,632	0,002
500	0,558	0,004
1000	0,416	0,007
2000	0,182	0,007
2500	0,094	0,004

^a Absorbancia (Promedio de tres mediciones), ^b Desviación estándar de tres mediciones ($n = 3$).

Los datos de la tabla 10 se representan gráficamente en la figura 83 y los parámetros estadísticos se resumen en la tabla 11. El coeficiente r cercano a 1 y con signo negativo indica que existe una correlación relativamente fuerte e inversa entre las variables, es decir que a medida que la concentración de antioxidante (trolox) aumenta, la absorbancia del radical ABTS decrece. Otro parámetro estadístico que evalúa la significancia del r es el estadístico t ; en este caso, el t calculado es mayor que el t tabulado, por tanto se concluye que existe una correlación estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0% ($p < 0,05$). El r^2 indica que el poder explicativo o bondad de ajuste del modelo lineal es bueno. Este modelo es representado por la ecuación 5, cuya pendiente ($b = 2,504E-4$) muestra una buena sensibilidad del método y su desviación estándar, la precisión adecuada de la curva de calibración. De esta manera se puede decir que el modelo es aplicable dentro del rango de concentraciones evaluado (0-2500 μM) y por tanto, se puede utilizar para hacer predicciones, de una manera análoga a lo explicado en la determinación de fenoles.

$$y (A) = 0,6940 - 2,504E-4 x (\mu\text{M}) \quad \text{Ec. (5)}$$

Figura 83. Curva de calibración con trolox para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).



Fuente: Esta investigación.

Tabla 11. Estadísticas de la regresión lineal del método TEAC.

<i>Parámetros</i>	<i>Valores</i>
Intercepto (a)	$0,6940 \pm 0,0064^a$
Pendiente (b)	$-0,0002504 \pm 0,0000046^b$
Coefficiente de correlación (r)	-0,9973
Coefficiente de determinación (r^2)	0,9946
t calculado	-54,55

^a Desviación estándar S_a , ^b Desviación estándar S_b .

Con el propósito de verificar la funcionalidad del método se determinó la eficiencia antirradical de un antioxidante de referencia (ácido ascórbico), este presentó un valor TEAC de $1,02 \pm 0,06$, cercano al reportado por Re³⁷⁰ ($1,05 \pm 0,02$) con un porcentaje de error de 4%.

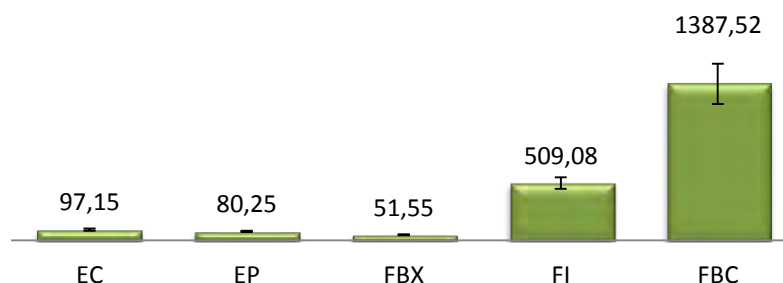
Los valores de x_0 estimado se obtuvieron utilizando la ecuación (5) de la recta de regresión y se expresaron en μmoles de trolox por cada gramo de extracto o fracción ($\mu\text{mol Trolox/ g muestra}$) que se muestran en la tabla 12. El análisis estadístico (ver anexo P) mostró que existe una diferencia estadísticamente significativa (nivel de confianza al 95%, $p < 0,05$) entre la FBC ($1387,52 \mu\text{mol Trolox/ g Muestra}$) y las demás muestras: más del doble de la actividad de la FI y más de 20 veces de la actividad encontrada para las muestras EC, EP y FBX, como se puede observar en el diagrama de barras de la figura 84. Se destaca que la capacidad para capturar el radical libre ABTS^{•+} está acorde y sigue la misma tendencia observada para el contenido fenólico (FBC>FI>EC>EP>FBX), como se muestra en el gráfico de la figura 85, donde se evidencia un alto grado de correlación entre las variables ($r^2 = 0,9988$).

Tabla 12. Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox en los extractos y fracciones obtenidos de *Ullucus tuberosus*.

Muestra (Antioxidante)	TEAC		
	$\mu\text{mol Trolox/ g Muestra}$		
	x_0	S_{x_0}	LC (95%)
EC	97,15	10,28	21,77
EP	80,25	6,36	13,47
FBX	51,55	3,53	7,49
FI	509,08	50,31	106,58
FBC	1387,52	177,91	376,88

x_0 = valor de x estimado utilizando la recta de regresión expresado en las unidades indicadas, S_{x_0} = desviación estándar de x_0 , LC = Límites de confianza.

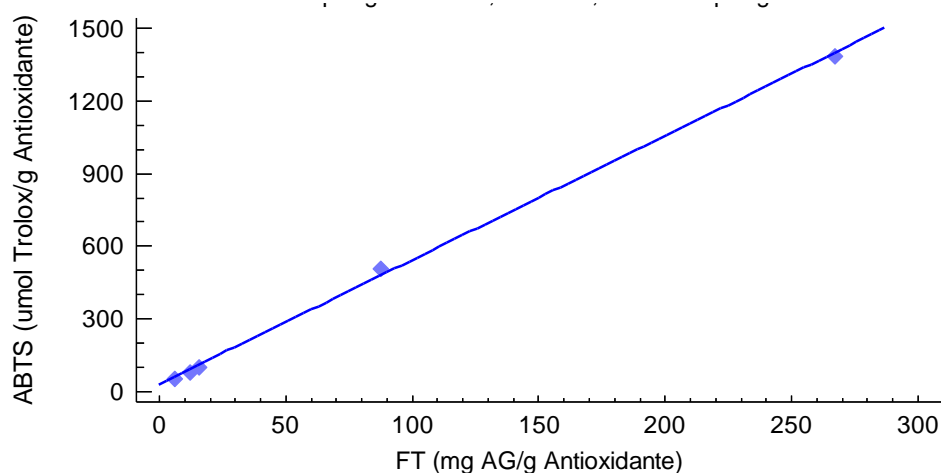
Figura 84. Diagrama de barras de valores de TEAC ($\mu\text{mol trolox/ g Ant}$) de extractos y fracciones obtenidos a partir de *Ullucus tuberosus*.



Fuente: Esta investigación.

³⁷⁰ RE, et al. Op. cit., p. 1231-1237.

Figura 85. Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante frente al Trolox.

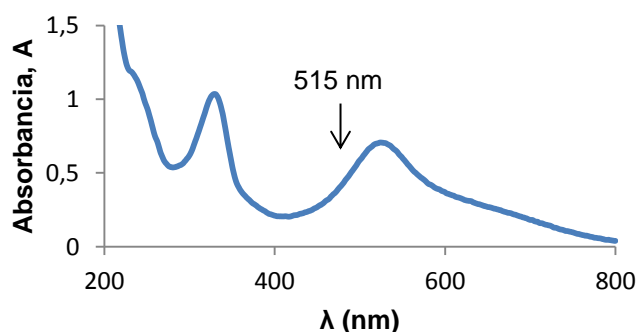


Fuente: Esta investigación.

5.8.2. MÉTODO DPPH

La metodología utilizada para calcular la actividad antioxidante usando el radical DPPH se describe en la sección 4.8.2. Este radical presenta una absorbancia característica a 515 nm, como se muestra en el espectro de la figura 86.

Figura 86. Espectro de absorción del catión DPPH[•].



Fuente: Esta investigación.

Los resultados generalmente se expresan en términos de EC₅₀, definido como la concentración de antioxidante necesario para disminuir la concentración de DPPH[•] en un 50%. Para ello, es necesario construir una curva de calibración, los valores de absorbancia promedio y la desviación estándar (n=3) vs concentración de DPPH[•] se muestran en la tabla 13. La representación gráfica de la línea de calibrado se muestra en la figura 8 y la ecuación 6 es la que describe al modelo. La prueba de verificación de

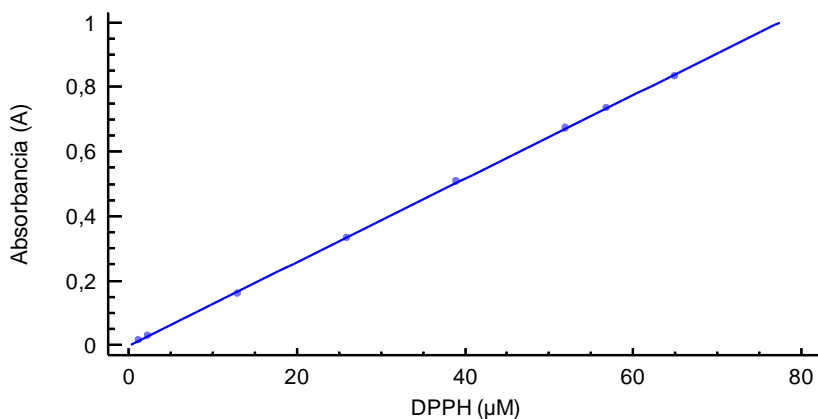
varianza se muestra en el anexo Q. Los parámetros estadísticos como el r y r^2 , muy cercanos a la unidad, demuestran que existe una correlación muy fuerte entre las variables y un alto grado de linealidad (ver tabla 14). Además, dado que el valor t -calculado resultó ser mayor que el t -tabulado, se concluye que la correlación existente entre las variables es estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Por su parte, el valor de la pendiente (b) y desviación estándar (S_b) indican que la sensibilidad y la precisión de la recta son altas dentro del rango de concentraciones evaluado (1,3-64,9 μM). Por tanto, las predicciones realizadas a partir de este modelo serán confiables.

Tabla 13. Datos para la curva de calibrado del método DPPH*.

$[DPPH]^a$ (μM)	A^b Promedio	S^c
1,3	0,014	0,000
2,4	0,030	0,001
13	0,159	0,001
26	0,332	0,000
39	0,508	0,001
51,9	0,672	0,002
56,8	0,734	0,001
64,9	0,833	0,000

^a Concentración del radical DPPH*, ^b Absorbancia (Promedio de tres mediciones), ^c Desviación estándar de tres mediciones.

Figura 87. Curva de calibrado del método DPPH.



Fuente: Esta investigación.

$$y (A) = -0,00328 + 1,296E-2 x (\mu\text{M}) \quad \text{Ec. (6)}$$

Tabla 14. Estadísticas de la regresión lineal (para la curva de calibración) del método DPPH.

<i>Parámetros</i>	<i>Valores</i>
Intercepto (a)	-0,00328±0,00134
Pendiente (b)	0,01296±0,00004
Coefficiente de correlación (r)	0,9999
Coefficiente de determinación (r ²)	0,9998
t calculado	383,588

La funcionalidad del método DPPH fue verificada con ácido gálico, el cual ha sido reportado por Sánchez *et al*³⁷¹ como un estándar de velocidad media, es decir que el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario en el cálculo de EC₅₀ es de entre 5-30 minutos. Razón por la cual, en esta investigación se escogió un tiempo de reacción de 30 minutos. Se encontró una tendencia exponencial entre el % [DPPH*_{REM}] (concentración de DPPH que permanece en solución luego de media hora de reacción) y la concentración del ácido gálico. La correlación entre las variables se expresó mediante la ecuación 7.

$$y (\ln [\text{DPPH}^*_{\text{REM}}]) = a + b \cdot x [\text{antioxidante}] \quad \text{Ec. (7)}$$

Los parámetros estadísticos para el ácido gálico se presentan en la tabla 15. Mediante el proceso de interpolación se obtuvo un valor de EC₅₀ de 0,032 ± 0,004 similar al publicado por Sánchez (0,026 ± 0,001 g antioxidante/g DPPH).

Sánchez y colaboradores calcularon el parámetro T_{EC50} que es el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario a la concentración correspondiente al EC₅₀ y la eficiencia anti-radical (AE = 1/(EC₅₀ + IC₅₀)), como parámetros que se utilizan ampliamente para describir los compuestos antioxidantes. Sin embargo, el tiempo de reacción para alcanzar este punto estará sujeto a la naturaleza de la muestra y a su concentración. En algunos casos las muestras reaccionan muy lentamente de manera que se hace muy complicado determinar este valor. De hecho, en esta investigación se realizaron ensayos preliminares con este propósito y se observaron tiempos de reacción de 8 horas o más sin que la medida de absorbancia se estabilizara. Por esta razón el T_{EC50} no se determinó y se fijó un tiempo de reacción, en este caso 30 minutos. Así, el rango de concentraciones de cada muestra (extractos y fracciones) fue seleccionado de tal manera que exhibieran un comportamiento similar al del patrón de ácido gálico, es decir que al término de 30 minutos se redujera un 50% o más de la concentración inicial del radical. Las concentraciones utilizadas para este propósito y los valores resultantes de % [DPPH*_{REM}] para cada una de ellas se muestran gráficamente en la figura 88. Las concentraciones de los patrones y muestras fueron expresadas como g Muestra/g DPPH, con el fin de comparar con los resultados obtenidos por Sánchez.

³⁷¹ SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI, y SAURA-CALIXTO. Op. cit., p 270-276.

Figura 88. Curvas de calibrado para ácido gálico, extractos y fracciones de ulluco.

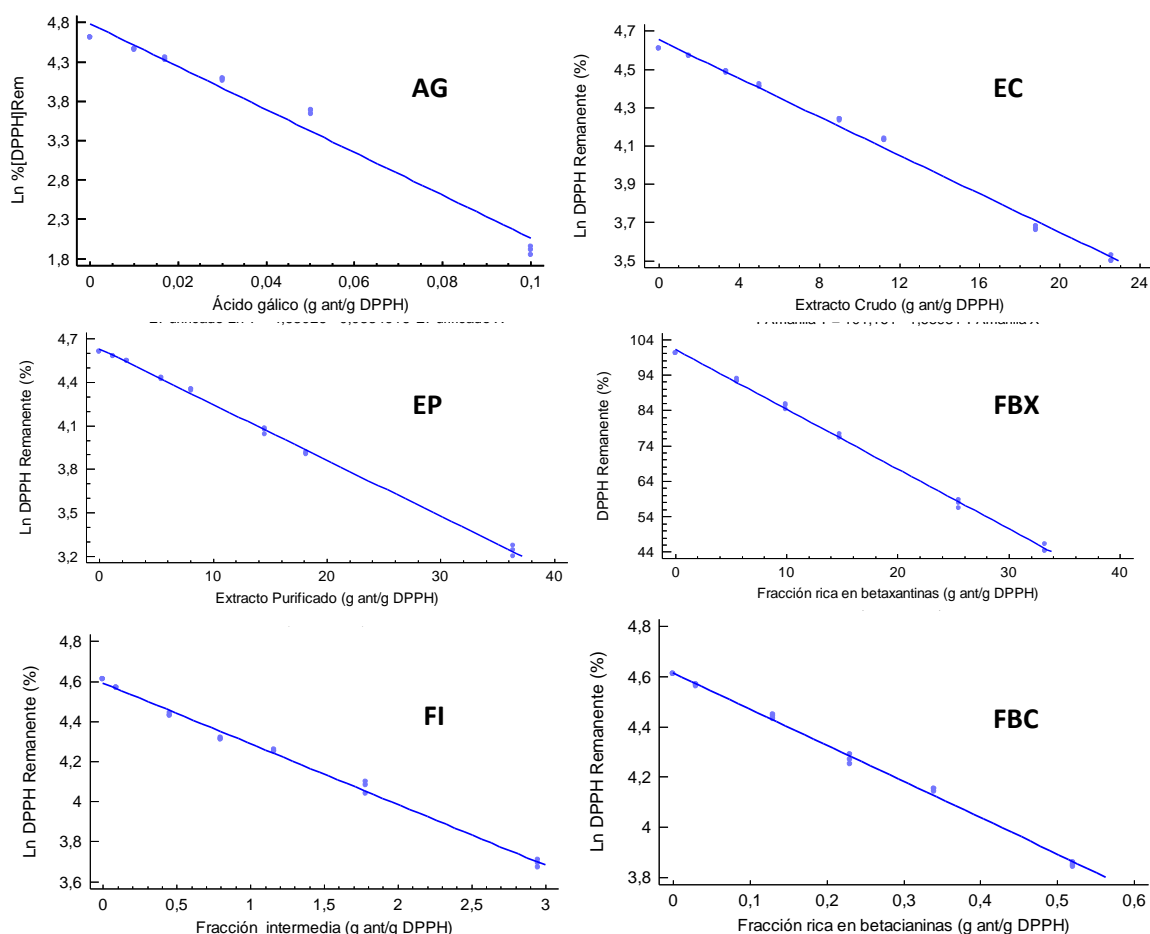


Tabla 15. Parámetros estadísticos de las curvas de regresión para el ácido gálico (AG), extractos (EC y EP) y fracciones (FBX, FI y FBC) del *Ullucus tuberosus* con el método DPPH.

Parámetros	Muestras (Antioxidante)	AG ^a	EC ^a	EP ^a	FBX ^b	FI ^a	FBC ^a
	Intercepto (a)		4,7833	4,6536	4,6303	101,1610	4,5907
Desviación estándar (S _a)		0,0537	0,0101	0,0058	0,3754	0,0078	0,0061
Pendiente (b)		-27,2127	-0,0503	-0,0385	-1,6893	-0,3031	-1,4479
Desviación estándar (S _b)		1,1199	0,0009	0,0004	0,0201	0,0055	0,0221
Coefficiente de correlación (r)		-0,9867	-0,9968	-0,9990	-0,9989	-0,9969	0,9981
Coefficiente de determinación (r ²)		0,9736	0,9937	0,9980	0,9977	0,9938	0,9963
t		89,0976	461,919	798,24	269,474	591,035	757,897

^a Modelo exponencial, ecuación de la forma: $\ln [DPPH]_{REM} = a + b \cdot [Antioxidante]$

^b Modelo lineal, ecuación de la forma: $[DPPH]_{REM} = a + b \cdot [Antioxidante]$

Para la mayoría de las muestras se obtuvieron tendencias exponenciales (ecuación 7). Solamente la fracción amarilla presentó una tendencia lineal. Los estadísticos calculados para la evaluación de su linealidad también se registran en la tabla 15. En general, se obtuvieron valores de r negativos y cercanos a 1 (-0,9867 – -0,9990). Los coeficientes de correlación son similares a los publicados por Sánchez³⁷².

Los valores EC_{50} obtenidos por el cálculo del estimado x_0 a partir de la ecuación de la recta, correspondiente a cada muestra, se registran en la tabla 16 y se representan gráficamente en la figura 89. Entre menor sea el valor EC_{50} , mayor es su capacidad antioxidante frente al radical DPPH, por tanto la fracción rica en betacianinas FBC fue la muestra que presentó la mayor capacidad de reducir al 50% la concentración inicial de DPPH. Además, el análisis estadístico (ver Anexo R) indicó que entre todas las muestras obtenidas existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), evidenciándose el mismo orden decreciente de capacidad antioxidante (FBC > FI > EC > EP > FBX) que en el método TEAC, lo que indica una vez más la fuerte correlación que existe entre el contenido fenólico de cada muestra y la capacidad de reducir radicales libres, en este caso al radical DPPH, tal como se demuestra en la gráfica de la figura 90 con un coeficiente de correlación cercano a la unidad ($r = 0,9944$).

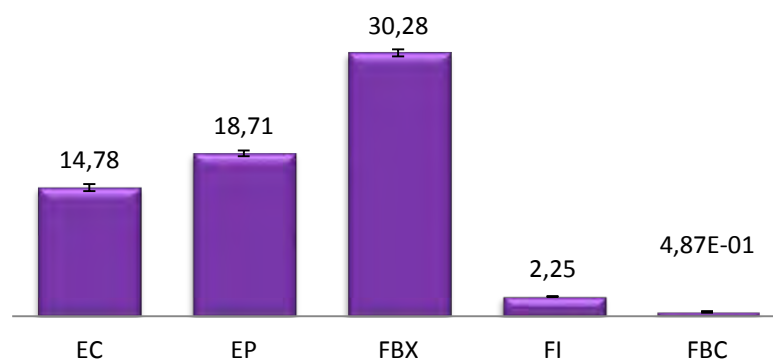
Tabla 16. EC_{50} en los extractos y fracciones obtenidos de *Ullucus tuberosus*.

Muestra	EC_{50}		
	g Muestra /g DPPH		
	x_0	S_{x_0}	LC (95%)
EC	14,78	0,40	0,84
EP	18,71	0,33	0,70
FBX	30,28	0,41	0,85
FI	2,25	0,05	0,11
FBC	4,87E-1	8,45E-2	1,79E-2

AG = ácido gálico, x_0 = valor de x estimado utilizando la recta de regresión expresado en las unidades indicadas, S_{x_0} = desviación estándar de x_0 , LC = Límites de confianza.

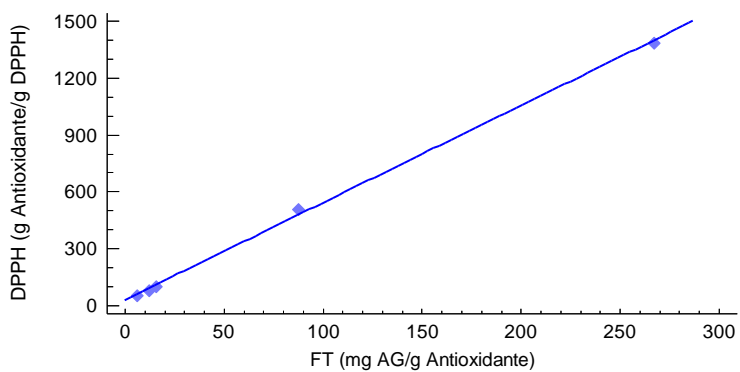
³⁷² SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI, y SAURA-CALIXTO. Op. cit., p. 270-276.

Figura 89. Diagrama de barras de valores de EC_{50} (g Antioxidante/g DPPH) de extractos y fracciones obtenidos a partir de *Ullucus tuberosus*.



Fuente: Esta investigación.

Figura 90. Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante frente al DPPH.



Fuente: Esta investigación.

CONCLUSIONES

La coloración rojo magenta del ulluco “chincheño” es producto de su composición rica no sólo en betalaínas rojas sino también amarillas. Las betacianinas (BC) y betaxantinas (BX) se cuantificaron, por espectroscopia UV-Vis, encontrándose un contenido de $44,5 \pm 0,8$ μg de betanina/g de cáscara de ulluco y $21,8 \pm 0,6$ μg de indicaxantina/g de cáscara de ulluco, respectivamente. Estos resultados son similares a otras especies de ulluco, aunque menores a los de las fuentes más comunes de betalaínas. Sin embargo, la gran cantidad de estructuras betalaínicas encontradas puede representar una ventaja frente a los demás extractos en los que generalmente sólo se detecta la betanina, lo que podría verse reflejado en la obtención de pigmentos rojos, amarillos y tonalidades resultantes de su combinación.

En los extractos y fracciones del ulluco se detectó la presencia de al menos 32 compuestos con absorbancias máximas características de las betalaínas (14 BX y 18 BC), de las cuáles se identificaron tentativamente 26 estructuras empleando técnicas como la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA) y a espectrometría de masas (HPLC-MS); además, la comparación de tiempos de retención con un extracto de referencia (extracto de remolacha) y con la literatura científica reportada también se tuvieron en cuenta como criterios de asignación. De esta manera, la BC mayoritaria se asignó como filocactina [betanidina 5-O-(6'-O-malonil)- β -glucósido] y la BX mayoritaria como vulgaxantina I [Glutamina-Betaxantina. También se detectó la presencia de betanina [betanidina 5-O- β -glucósido] que es la betalaína más abundante en la naturaleza. En general, las BC se detectaron con sus correspondientes isómeros. La cantidad de compuestos detectados muestran una apreciable diversidad de este tipo de pigmentos en la cáscara de este tubérculo.

La fracción magenta (FBC) se caracterizó por su contenido en betacianinas con polaridad variada ya que algunas, como la betanina y filocactina eluyeron a tiempos de retención bajos, mientras que la gomprenina eluyó a un t_R alto. Por su parte, en la fracción amarilla (FBX) se evidenció la presencia de betaxantinas de alta polaridad que eluyeron con rapidez en los procedimientos cromatográficos. En general, se evidenció una separación adecuada entre estas dos clases de pigmentos. Sin embargo, se obtuvo una fracción intermedia de coloración anaranjada que contenía trazas de las betacianinas más abundantes en el extracto de ulluco, además de las betaxantinas menos polares que no se detectaron en la FBX.

La evaluación de la actividad antioxidante del extracto crudo (EC), purificado (EP) y las tres fracciones (FBC, FI y FBX) frente a los radicales ABTS y DPPH demostró que la fracción con mayor contenido de betacianinas (FBC) fue la más activa para capturar radicales libres, seguido por la FI, EP, EC y FBX. Adicionalmente se evidenció el mismo orden decreciente en los resultados de contenido fenólico, por lo que se puede concluir su correlación con la actividad antioxidante. Los valores mayores reportados para la FBC, rica en betacianinas, fueron relacionados con las estructuras encontradas, las cuales presentaron un mayor número de grupos hidróxilo sobre estructuras aromáticas en comparación a las estructuras de betaxantinas, que obtuvieron los menores valores en estas pruebas. Por tanto, se concluye que las betacianinas tienen mayor poder antioxidante que las betaxantinas.

PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

PONENCIA

Nombre del Evento: XV CONGRESO LATINOAMERICANO DE CROMATOGRFÍA Y TÉCNICAS AFINES/VII CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRFÍA. *Organizadores:* CENIVAM (Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales), Universidad Industrial de Santander, Universidad Nacional de Colombia y Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas. *Tipo de evento:* Congreso Internacional. *Realizado en:* Hotel Caribe, Cartagena de Indias, Colombia. Del 29 de septiembre al 03 de octubre de 2014.

➤ Producto asociado

MOSQUERA Q., N.A. y HURTADO G., N.H. Cuantificación y fraccionamiento mediante métodos cromatográficos de las betalaínas del ulluco (*Ullucus tuberosus*). En: Revista Colombiana de Química, 2014. P-PN-70.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

➤ CEJUDO-BASTANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson; MOSQUERA, Natalia y HEREDIA, Francisco J. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. En: Food Research International, 2014. vol. 64, p. 465-471.



Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions

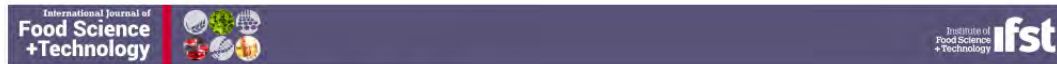


María Jesús Cejudo-Bastante ^a, Nelson Hurtado ^b, Natalia Mosquera ^b, Francisco J. Heredia ^{a,*}

^a Food Color and Quality Lab., Dept. Nutrition and Food Science, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

^b Departamento de Química, Universidad de Nariño, A.A. 1175 Pasto, Colombia

- MONTES-LORA, Sandra; HURTADO, Nelson; MOSQUERA, Natalia; HEREDIA, Francisco J y CEJUDO-BASTANTE, María Jesús. Effect of technological practices on individual betalains and antioxidant activity of Columbian betalain-rich raw materials. *En: International Journal of Food Science and Technology*, 2016. vol. 51, no. 4, p. 1041-1047.



International Journal of Food Science and Technology 2016

Original article

Effect of technological practices on individual betalains and antioxidant activity of Columbian betalain-rich raw materials

Sandra Montes-Lora,¹ Nelson Hurtado,² Natalia Mosquera,² Francisco J. Heredia¹ & María Jesús Cejudo-Bastante^{1*}

¹ Food Color and Quality Laboratory, Department Nutrition and Food Science, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

² Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490 Bogotá, Colombia

(Received 25 September 2015; Accepted in revised form 14 December 2015)

RECOMENDACIONES

A partir del conocimiento generado en este estudio, se puede profundizar en diversas temáticas como la optimización de extracción para mejorar rendimientos, evaluar la actividad antioxidante *in vivo* y explorar sus posibles efectos terapéuticos.

Por otro lado se recomienda liofilizar los extractos, para evitar al máximo la degradación que pueden sufrir en procedimientos de secado.

Para la identificación de cada una de las betalaínas presentes en el ulluco se recomienda mejorar la resolución en la separación de la fracción amarilla ya que de ese modo se facilitaría la identificación de las betaxantinas, cuya asignación fue más complicada, además de la posibilidad de encontrar algunos isómeros.

Finalmente, se recomienda la exploración de los diversos usos potenciales de la especie estudiada, como la obtención de harinas y los usos de su contenido mucilaginoso. Este último podría servir incluso como agente encapsulante que protege al colorante extraído de factores ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

ALFARO DENUS, Gonzalo. El Mundo Andino. y sus Alimentos. En: ALFARO DENUS, Gonzalo y SALAS, Sonia (Eds.). Alimentos del Mundo Andino: Ciclo de Conferencias sobre Alimentos Andinos. Lima, Perú: Universidad Mayor de San Simón, Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN) y el Centro Internacional de la Papa (CIP), 1997. p. 7.

ALKEMA, J. y SEAGER, S.L. The chemical pigments of plants. En: Journal of Chemical Education, 1982. vol. 59, no. 3, p. 183.

ANTOLOVICH, Michael, *et al.* Methods for testing antioxidant activity. En: Analyst. 2002. vol. 127, p. 183.

ARBIZU, Carlos. Clasificación y Morfología. En: LÓPEZ, Glicerio y HERMANN, Michael (Eds.). El cultivo del ulluco en la sierra central del Perú. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 3. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP), Universidad Nacional del Centro, Instituto Vida en los Andes, Universidad Nacional Agraria La Molina, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), 2004. p. 5-6.

ARBIZU, C. y TAPIA, M. Andean tubers. En: HERNÁNDEZ BERMEJO, J.E. y LEÓN, J. (Eds.). Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1994. p. 159.

AREDO, V. *et al.* Deshidratación osmótica de olluco (*Ullucus tuberosus*) con y sin recubrimiento a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y sacarosa. En: Agroindustrial Science, 2013. vol. 2, p. 127.

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

AYALA, Guido. Aportes de los cultivos andinos a la nutrición humana. En: Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y la capacitación. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004. p. 108-109.

AZEREDO, Henriette. Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. En: International Journal of Food Science & Technology, 2009. vol. 44, no. 12, p. 2367.

BARRERA, Víctor, *et al.* Caracterización de las Raíces y los Tubérculos Andinos en la Ecoregión Andina del Ecuador (Capítulo 1). En: BARRERA, Víctor; TAPIA, César y MONTEROS, Alvaro (Eds.). Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 4. Quito, Ecuador – Lima, Perú: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa (CIP), Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), 2004. p. 11.

BEHNKE, H.-D. y MABRY, T.J. (Eds.). Caryophyllales: evolution and systematics. 1ed. Berlin: Springer-Verlag, 2012. p. 11.

BISWAS, Mousumi; DEY, Satyahari; SEN, Ramkrishna. Betalains from *Amaranthus tricolor* L. En: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2013. vol. 1, no. 5.

BRAGA, M.E.M., *et al.* Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products. En: ROSTAGNO, Mauricio A. y PRADO, Juliana M. (Eds.). Natural Product Extraction: Principles and Applications. Cambrigde, UK: RSC Publishing. 2013. p. 231.

BRAGA, M.E.M., *et al.* Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products. En: ROSTAGNO, Mauricio A. y PRADO, Juliana M. (Eds.). Natural Product Extraction: Principles and Applications. Cambrigde, UK: RSC Publishing. 2013. p. 231.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. y BERSET, C.B. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: LWT-Food science and Technology, 1995, vol. 28, no. 1, p. 25-30.

BUSCH, J.M., *et al.* Nutritional composition of ulluco (*Ullucus tuberosus*) tubers. En: Proceedings of the Nutrition Society, 2000, vol. 25, p. 60.

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

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

CAI, Yizhong, *et al.* Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. vol. 49, no. 9, p. 4434.

CAI, Yizhong, *et al.* Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. vol. 46, no. 6, p. 2063-2070.

CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. vol. 51, no. 8, p. 2288.

CAI, Yizhong; SUN, Mei y CORKE, Harold. Identification and distribution of simple and acylated betacyanins in Amaranthaceae. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. vol. 49, p. 1971–1978.

CADIMA, Ximena, ZEBALLOS, José y FORONDA, Edson. Catálogo de papalisa. Bolivia: Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA) e Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal (INIAF), 2010. p. 8.

CALOGERO, Giuseppe, *et al.* Anthocyanins and betalains as light-harvesting pigments for dye-sensitized solar cells. En: Solar energy, 2012. vol. 86, no. 5, p. 1563-1575.

CAMPOS, David, *et al.* Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavon*), Oca (*Oxalis tuberosa Molina*) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. vol. 86. p. 1481–1488.

CARDOSO-UGARTE, G. A., *et al.* Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*).En: LWT-Food Science and Technology, 2014, vol. 59, no. 1, p. 277.

CARMONA, I. De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria. Reporte No. 5. Alimentos procesados. Agrimundo. p. 1-5

CARRASCO, Enrique, *et al.* Los Tubérculos Andinos: Tesoro de los Andes. En: ALFARO DENUS, Gonzalo y SALAS, Sonia (Eds.). Alimentos del Mundo Andino: Ciclo de Conferencias sobre Alimentos Andinos. Lima, Perú: Universidad Mayor de San Simón, Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN) y el Centro Internacional de la Papa (CIP), 1997. p. 45.

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

CASTELLAR, M. R., *et al.* Fermentation of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits for betalains concentration. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2008, vol. 56, no. 11, p. 4253-4257.

CAPITANI, M. I. Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata-Facultad de Ciencias Exactas. 2013. p. 90.

CEJUDO-BASTANTE, María Jesús; HURTADO, Nelson; MOSQUERA, Natalia y HEREDIA, Francisco J. Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. En: Food Research International, 2014. vol. 64, p. 465-471.

CLAVIJO, Neidy, BARÓN, María y COMBARIZA, Juliana. Tubérculos Andinos: Conservación y uso desde una perspectiva agroecológica. 1 ed. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana, 2014. p. 19-20.

CLEMENTE, A.; DESAI, P. V. Evaluation of the hematological, hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of *Amaranthus tricolor* leaf extract in rat. En: Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2011. vol. 10, no. 5, p. 595-602.

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

CULTURA Y TURISMO. Catambuco: datos generales [en línea]. [Pasto]: Subsecretaría de Sistemas de Información, 2015. Publicado 29 noviembre de 2001. Disponible en <http://www.culturapasto.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=135:catambuco&catid=27:corregimientos&Itemid=23>

CHO, Jae Youl, *et al.* Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. En: Journal of pharmacy and pharmacology, 2006. vol. 58, no. 1, p. 113-119.

CHUNG, Hsiao-Hang, *et al.* Characterisation of betalain biosynthesis in *Parakeelya* flowers identifies the key biosynthetic gene DOD as belonging to an expanded LigB gene family that is conserved in betalain-producing species. En: Frontiers in plant science, 2015, vol. 6. p. 2.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. y FENNEMA, Owen R. (Eds.). Fennema's food chemistry. 4 ed. Boca Raton: CRC press, 2007. p. 579.

DEL CARPIO JIMÉNEZ, Carla; SERRANO. FLORES, Carlos y GIUSTI, Mónica. Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lecher. En: Revista Sociedad Química Perú. Vol. 75, no. 1, p. 83.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R. y PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. En: Critical reviews in food science and nutrition, 2000. vol. 40, no. 3, p. 176.

DELGADO-VARGAS, Francisco y PAREDES-LÓPEZ, Octavio. Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Raton: CRC Press, 2002. p. 28-29.

DE OLIVEIRA, A.C., *et al.* Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. En: Food Chemistry, 2009. vol. 115, no. 2, p. 469-475. p. 471.

DINI, A., *et al.* Minor components in food plants-Note I. Flavonol glycosides from *Ullucus tuberosus*. En: Bollettino. della Società italiana di biologia sperimentale, 1991. vol. 67, no. 12, p. 1053-1058.

DOWNHAM, Alison y COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. En: International Journal of Food Science and Technology, 1999. vol. 35, p. 5-22.

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

ESATBEYOGLU, Tuba, *et al.* Betanin—A food colorant with biological activity. En: Molecular nutrition & food research, 2015. vol. 59, no. 1, p. 36

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

ESPÍN, Susana; VILLACRÉS, Elena y BRITO, Beatriz. Caracterización Físico–Química, Nutricional y Funcional de Raíces y Tubérculos Andinos (Capítulo 4). En: BARRERA, Víctor; TAPIA, César y MONTEROS, Alvaro (Eds.). Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). No. 4. Quito, Ecuador – Lima, Perú: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Centro Internacional de la Papa (CIP), Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación (COSUDE), 2004. p. 108.

FDA. Food Additive Status List [en línea]. Estados Unidos: Department of Health and Human Services U.S. Actualizado 16 de diciembre de 2014 [citado 12 de enero 2016]. Disponible en <<http://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditiveinventories/ucm106626.htm>>

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

FLOEGEL, A., *et al.* Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2011. vol. 24, no. 7, p. 1043–1048.

FRAGA, Cesar G.; OTEIZA, Patricia I.; GALLEANO, Monica. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014, vol. 1840, no. 2, p. 931-934.

GANDÍA-HERRERO, Fernando, *et al.* Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2013. vol. 61, no. 18, p. 4294-4302.

GANDÍA-HERRERO, Fernando, *et al.* Stabilization of the bioactive pigment of Opuntia fruits through maltodextrin encapsulation. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2010. vol. 58, no. 19, p. 10646-10652.

GANDÍA-HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA-CARMONA, Francisco. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. En: Planta, 2010. vol. 232, no. 2, p. 449-460.

GANDÍA-HERRERO, Fernando; ESCRIBANO, Josefa y GARCÍA-CARMONA, Francisco. The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. En: Journal of natural products, 2009. vol. 72, no. 6, p. 1142-1146.

GANDÍA-HERRERO, F.; GARCÍA-CARMONA, F. y ESCRIBANO, J. Fluorescent pigments: new perspectives in betalain research and applications. En: Food research international, 2005. vol. 38, no. 8, p. 879-884.

GASZTONYI, Magdolna Nagy, *et al.* Comparison of red beet (*Beta vulgaris* var *conditiva*) varieties on the basis of their pigment components. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, vol. 81, no. 9, p. 932-933.

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

GEORGIEV, Vasil, *et al.* Betalain production in plant in vitro systems. En: Acta Physiologiae Plantarum, 2008, vol. 30, no. 5, p. 583.

GIL, A. Tratado de Nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Tomo II. 2 ed. Madrid: Médica Panamericana, 2010. p. 442.

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

GÓMEZ, Rene. Guía para las Caracterizaciones Morfológicas Básicas en Colecciones de Papas Nativas. En: Manual para caracterización In situ de cultivos nativos. Lima, Perú: Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA), 2006. p. 26–50.

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

HAYEK, Saeed A.; IBRAHIM, Salam A. Antimicrobial activity of xocoonstle pears (*Opuntia matudae*) against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory medium. *International journal of microbiology*, 2012. vol. 2012.

HERBACH, Kirsten M., *et al.* Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 2006. vol. 39, no. 6, p. 667-677.

HERBACH, Kirsten M.; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. En: *Journal of Food Science*, 2006. vol. 71, no. 4, p. R41.

HERBACH, Kirsten M.; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phyllocactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. En: *Rapid communications in mass spectrometry*, 2005. vol. 19, no. 18, p. 2603-2616.

HERBACH, K.M.; STINTZING, F.C. y CARLE, R. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. En: *Journal of Food Science*. Agosto, 2004b. vol. 69, no. 6, p. C491-C498.

HERBACH, Kirsten M.; STINTZING, Florian C. 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*, Septiembre, 2004a, vol. 219, no. 4, p. 377-385.

HERMANN, Michael. Raíces y tubérculos andinos: Prioridades de investigación para un recurso alimentario pospuesto. Lima: Centro internacional de la papa (CIP), 1992. p. 2.

HILOU, Adama; MILLOGO-RASOLODIMBY, Jeanne y NACOULMA, Odile Germaine. Betacyanins are the most relevant antioxidant molecules of *Amaranthus spinosus* and *Boerhavia erecta*. En: *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013. vol. 7, no. 11. p. 645–652.

IBÁÑEZ, F., TORRE, P. y IRIGOYEN, A. Aditivos alimentarios. Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Pública de Navarra, 2003. p. 1-10.

IPGRI/CIP. Descriptores del Ulluco (*Ullucus tuberosus*). Roma, Italia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP), 2003. 42 p.

JACKMAN, R. L y SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. En: *Natural food colorants*. Estados Unidos: Springer, 1996. p. 245.

JACOBSEN, Sven Erik; MUJICA, Ángel y ORTIZ, Rene. La Importancia de los Cultivos Andinos. En: Fermentum, 2003. vol. 13, no. 36, p. 14.

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

KANNER, Joseph; HAREL, Stela; GRANIT, Rina. Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. vol. 49, no. 11, p. 5178-5185.

KARADAG, Ayse; OZCELIK, Beraat; SANER, Samim. Review of methods to determine antioxidant capacities. En: Food Analytical Methods, 2009. vol. 2, no. 1, p. 47.

KAPADIA Govind J. y SUBBA RAO G. Anticancer Effects of Red Beet Pigments. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 125-154.

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

KHAN, Mohammad Imtiyaj y GIRIDHAR, P. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. En: Phytochemistry, 2015. vol. 117, p. 268.

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

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

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

KUGLER, Florian; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC–DAD–ESI–MSⁿ. En : Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007. vol. 387. p. 637-648.

KUGLER, Florian; STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, vol. 52, no. 10, p. 2975-2981.

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

KUSKOSKI, E. Marta, *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Ciência E Tecnologia de Alimentos, 2005. vol. 25, no. 4, p. 726–732.

LU, Guiping, *et al.* Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.). En: Journal of agricultural and food chemistry, 2003. vol. 51, no. 4, p. 1026-1029.

MABRY, T. J.; DREIDING, A. S. The betalains. En: Recent Advances in Phytochemistry. Appleton-Centry-Crofts, NY, 1968.

MANCHALI, Shivapriya, *et al.* Stability of Betalain Pigments of Red Beet. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 60-63.

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

MÉGARD, D., Stability of red beet pigments for use as food colorant: a review, En: Foods & food ingredients journal of Japan, 1993. vol. 158, p. 130

MELCHIORRE, P. Identificación de tubérculos andinos (*Oxalis tuberosa*, *Ullucus tuberosus* y *Tropaeobim tuberosum*) mediante caracteres anatómicos y exomorfológicos. En: Revista de la Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires, 1985. vol. 6, no. 3. p. 141-153.

MILLER, N.J. y MILLER J.C. Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid (España) : Pearson Educación, S.A. 2002. p 135.

MOSQUERA Q., N.A. y HURTADO G., N.H. Cuantificación y fraccionamiento mediante métodos cromatográficos de las betalaínas del ulluco (*Ullucus tuberosus*). En: Revista Colombiana de Química, 2014. P-PN-70.

MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. En: Pure and Applied Chemistry, 2006. vol. 78, no. 8, p. 1478.

NEELWARNE, Bhagyalakshmi y HALAGUR, Sowbhagya B. Red Beet: An Overview. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 5.

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

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

ORTEGA, D., NÚÑEZ, M. y PORTILLA, M. Empacado en atmósfera modificada en la conservación del ulloco. En: Alimentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria, 2011. 1. Vol. 9, No. 2, p. 148.

OTÁLORA, María Carolina, *et al.* Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. En: Food chemistry, 2015, vol. 187, p. 174-181.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. y LARROCHE, C. Production of Pigments. Current developments in solid-state fermentation. India: Springer. 2008, p. 337.

PAULIUC, Marinela; IOSUB, Ion; RAU, Ileana. Separation and purification of natural extracts obtained from beetroot (*Beta vulgaris*): Topic: Chemistry applied in medicine. En: E-Health and Bioengineering Conference (EHB), 2015. IEEE, 2015. p. 1-3.

PARRA-QUIJANO, Mauricio, *et al.* Diversity of *Ullucus tuberosus* (Basellaceae) in the Colombian Andes and notes on ulluco domestication based on morphological and molecular data. En: Genetic resources and crop evolution, 2012. vol. 59, no. 1, p. 49-66.

PÁTKAI, G.; BARTA, J. Decomposition of betacyanins and betaxanthins by heat and pH changes. En: Food/Nahrung, 1996, vol. 40, no. 5, p. 267-270.

PAVOKOVIC, Dubravko; KRSNIK-RASOL, Marijana. Complex biochemistry and biotechnological production of betalains. En: Food technology and biotechnology, 2011. vol. 49, no. 2, p. 146.

PIRES GONÇALVES, Letícia Christina, *et al.* A comparative study of the purification of betanin. En: Food Chemistry, 2012. vol. 131, no. 1, p. 234.

POLJSAK, Borut; ŠUPUT, Dušan y MILISAV, Irina. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. En: Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013. vol. 2013. p. 1.

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

PRAKASH, Aruna; RIGELHOF, Fred y MILLER, Eugene. Medallion Laboratories Analytical Progress: Antioxidant Activity. En: Medallion Labs publication, 2001. vol. 19, p. 1-4.

PRIOR, R.L., WU, X. y SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. En : Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. vol. 53,p. 4297

RE, R, *et al.* Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. En: Free Radical Biology and Medicine. 1999. vol. 26, no. 9. p. 1231-1237.

ROCA, William M., *et al.* Indigenous Andean root and tuber crops: New foods for the new millennium. En: Chronica Horticulturae, 2007. vol. 47, no. 4, p. 13-19.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Natural food pigments and colorants. En: Current Opinion in Food Science, 2016. vol. 7, p. 20.

ROVER, M.R. y BROWN, R.C. Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. En: Journal of Analytical and Applied Pyrolysis. 2013. v. 104, p. 367.

RUEDA, José Luis. Guía para nueve raíces y tubérculos andinos. Perú: Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN), 1997. p. 2.

SAKUTA, Masaaki. Diversity in plant red pigments: anthocyanins and betacyanins. En: Plant biotechnology reports, 2014, vol. 8, no. 1, p. 41. O 42

SALAS DOMÍNGUEZ, Sonia. Avances en la Investigación en Posproducción de Alimentos Andinos en el Marco de Condesan. Lima, Perú: Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Ecorregión Andina (CONDESAN) y Centro Internacional de la Papa (CIP), 1998. p. 6.

SALAZAR, M., ZAMBRANO, J. y VALECILLOS, H. Evaluación del rendimiento y características de calidad de trece clones avanzados de papa (*Solanum tuberosum* L.). En: Agricultura Andina, 2008. Vol. 14, p. 108.

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, 2013. vol. 61, no. 49, p. 11995-12004.

SÁNCHEZ-MORENO, Concepción; LARRAURI, Jose A. y SAURA-CALIXTO, Fulgencio. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. En: Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998, vol. 76, no. 2, p. 270-276.

SAVOLAINEN, Karin y KUUSI, Taina. The stability properties of golden beet and red beet pigments: influence of pH, temperature, and some stabilizers. En: Zeitschrift für

Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1978. vol. 166, no. 1, p. 19-22. SEEJA, N., *et al.* Investigation of total phenolic contents, antioxidant activities and analyses of active compounds in some sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). En: NU Science Journal, 2014. vol. 11, no. 1. p. 40.

SCHWARTZ, S. J.; HILDENBRAND, B. E.; ELBE, J. H. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods to quantify betacyanins. En: Journal of Food Science, 1981, vol. 46, no. 1, p. 296-297.

SHARMA, Vinita; MCKONE, Harold T. y MARKOW, Peter G. Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic Food Dyes. En: Journal of Chemical Education, 2011. vol. 88, no. 1, p. 24-28.

SHIVAPRIYA, M., *et al.* Stability of betalain pigments of red beet. En: Red Beet Biotechnology. Springer US, 2013. p. 60

SCHOEFS, Benoît. Determination of pigments in vegetables. En: Journal of Chromatography A, 2004. vol. 1054, p. 217-226

STEVENS, Laura J., *et al.* Mechanisms of behavioral, atopic, and other reactions to artificial food colors in children. En: Nutrition reviews, 2013. vol. 71, no. 5, p. 268-281.

STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications. En: SOCACIU, Carmen (Ed.), Food Colorants. Chemical and Functional Properties. Boca, Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 2008. p. 286.

STINTZING, Florian C. y CARLE, Reinhold. Betalains—emerging prospects for food scientists. En: Trends in Food Science & Technology, 2007. vol. 18, no. 10, p. 514-525.

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, 2004. vol. 15, no. 1, p. 24.

STINTZING, F.C., SCHIEBER, A. y CARLE, R. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. En : Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002b. vol. 50, no. 8, p. 2303

STINTZING, Florian C.; SCHIEBER, Andreas y CARLE, Reinhold. Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. En: Food Chemistry, 2002a. vol. 77, no. 1, p. 101-106.

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

STUPPNER, Hermann; EGGER, Richard. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris*. En: Journal of Chromatography A, 1996. vol. 735, no. 1, p. 409-413.

SUQUILANDA, Manuel. Producción Orgánica de Cultivos Andinos (Manual Técnico). Ecuador: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Unión de Organizaciones Campesinas del Norte del Cotopaxi (UNOCANC) y Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca, 2012. p. 34

SURCO LAOS, Felipe Artemio. Caracterización de almidones aislados de tubérculos andinos: mashua (*Tropaeolum tuberosum*), oca (*Oxalis tuberosa*), olluco (*Ullucus tuberosus*) para su aplicación tecnológica. Tesis de Magister en Ciencias de los Alimentos. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2004. p. 9.

SVENSON, Johan, *et al.* Betalains in Red and Yellow Varieties of the Andean Tuber Crop Ulluco (*Ullucus tuberosus*). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. vol. 56. p. 7731.

SWARNA, J., *et al.* Characterisation and determination of in vitro antioxidant potential of betalains from *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. En: Food chemistry, 2013. vol. 141, no. 4, p. 4382-4390.

TAPIA, Mario E. y FRIES, Ana M. Guía de campo de los cultivos andinos. Lima: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Asociación Nacional de los Productores Ecológicos (ANPE), 2007. p. 25, 43, 48, 51.

TAPIA, Mario E. Agricultura Andina. Avances en las investigaciones sobre tubérculos alimenticios de los Andes. Perú: Proyecto Investigación de los Sistemas Agrícolas Andinos (PISCA), 1987. p. 13.

TESORIERE, Luisa, *et al.* Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. vol. 53, no. 4, p. 1266-1270.

TESORIERE, Luisa, *et al.* Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. En: The American journal of clinical nutrition, 2004, vol. 80, no. 2, p. 391-395.

TIWARI, Brijesh K. y CULLENS, Patrick J. Extraction of Red Beet Pigments. En: NEELWARNE, Bhagyalakshmi (Ed.). Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications. Nueva York: Springer Science y Business Media, 2013. p. 375

TREJO-TAPIA, Gabriela, *et al.* Effect of screening and subculture on the production of betaxanthins in *Beta vulgaris* L. var. 'Dark Detroit' callus culture. En: Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, vol. 9, no. 1, p. 32-36.

URIBE CALAD, Alvaro Francisco. Principales avances en investigación y desarrollo tecnológico por sistemas de producción agrícola. Corpoica cinco años. Bogotá: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, 1998. p. 446.

VACLAVIK, V. y CHRISTIAN, E. Evaluation of Food Quality. En: Essentials of food science. 3 ed. Texas: Springer, 2008. p. 4, 454.

VIMOS, Carlos; NIETO, Carlos y RIVERA, Marco. El melloco. Características, técnicas de cultivo y potencial en el Ecuador. Publicación miscelánea No. 60. Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 1993. p. 2.

WATANABE, Toshihiro, *et al.* Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. En: New Phytologist, 2008. vol. 178, no. 3, p. 581.

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

WENDEL, M., *et al.* Photophysical properties of betaxanthins: Vulgaxanthin I in aqueous and alcoholic solutions. En: Journal of Luminescence, 2015, vol. 167, p. 289-295.

WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Studies on nonenzymatic oxidation mechanisms in neobetanin, betanin, and decarboxylated betanins. En: Journal of agricultural and food chemistry, 2013. vol. 61, no. 26, p. 6465-6476.

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, 2009. vol. 1216. p. 6893.

WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. Phytochemistry, 2007. vol. 68, no. 2, p. 251-259.

WYBRANIEC, Sławomir, *et al.* Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. En: Phytochemistry, 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, 2005. vol. 53, no. 17, p. 6704-6712.

ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA, Małgorzata, *et al.* The beetroot component betanin modulates ROS production, DNA damage and apoptosis in human polymorphonuclear neutrophils. En: *Phytotherapy Research*, 2012. vol. 26, no. 6, p. 845-852.

ANEXOS

Anexo A. Muestra de ulluco a la cual se le determinó el pH.



Fuente: Esta investigación.

Anexo B. Determinación de firmeza en el ulluco.



Fuente: Esta investigación.

Anexo C. Coloración azul característica de la reacción del Método de Folin.



*De izquierda a derecha la concentración de ácido gálico aumenta (10, 30, 60, 100 y 150ppm). Fuente: Esta investigación.

Anexo D. Coloración azul-verdosa característica del radical ABTS^{•+}.



Fuente: Esta investigación.

Anexo E. Coloración violeta característica del radical DPPH:



*De izquierda a derecha la concentración de DPPH aumenta. Fuente: Esta investigación.

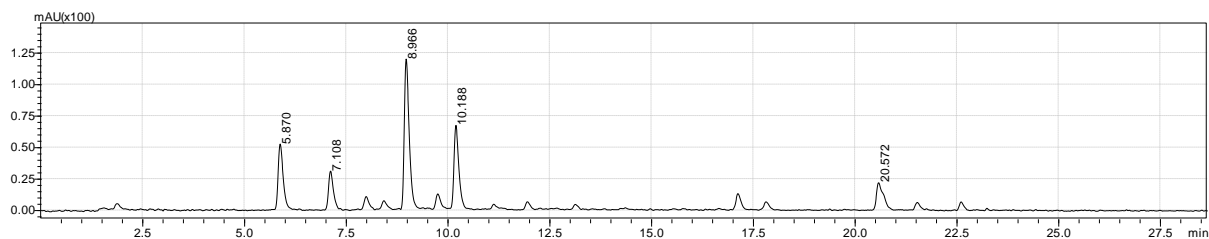
Anexo F. Tabla de porcentaje de áreas y altura de los picos cromatográficos señalados en la fracción FBC.

Pico	% Área	Altura
9	9,07	6489
10	4,70	3282
11	1,13	824
12	1,13	834
13*	32,29	21226
15	0,28	290
16	1,81	1152
17	8,15	5119
22b	5,19	3117
24b	2,78	1639
25	2,03	1240
26	4,15	2303
27	12,87	6655
28	3,96	2063
29	7,07	3738

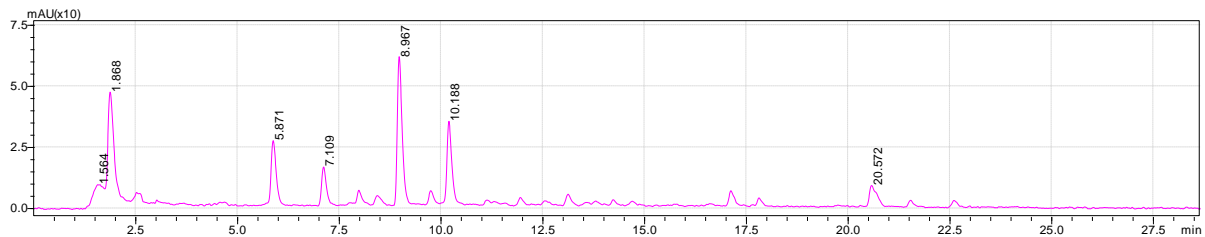
*Compuesto de mayor área

Anexo G. Cromatogramas del extracto purificado (EP) por HPLC-MS a diferentes longitudes de onda.

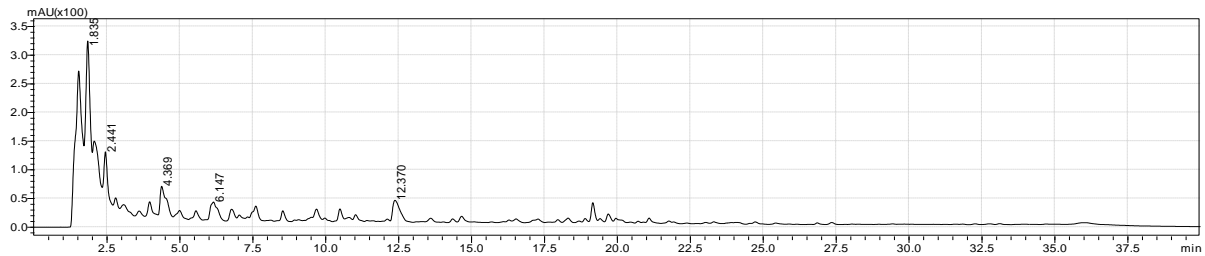
538 nm



480 nm

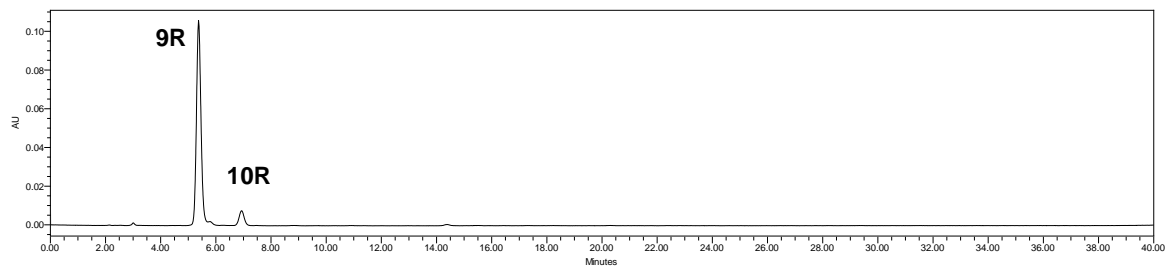


280 nm

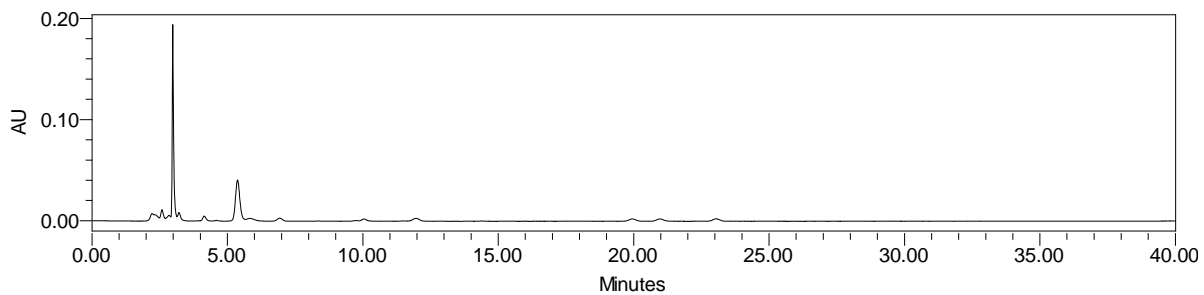


Anexo H. Cromatogramas del extracto de remolacha (ER) por HPLC-PDA y algunos espectros de masas.

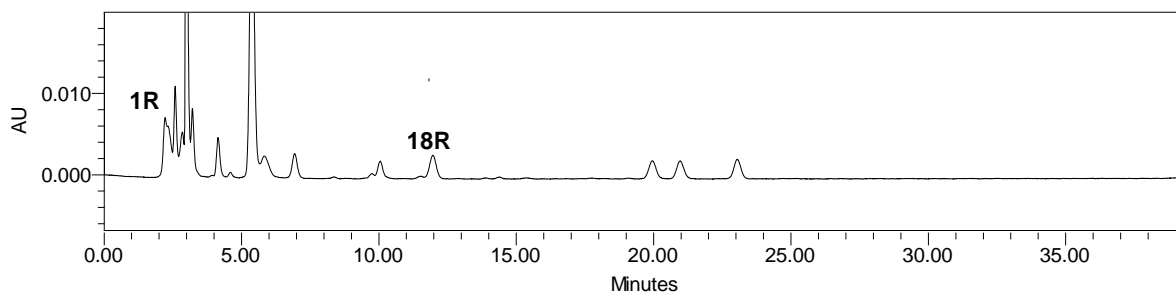
538 nm



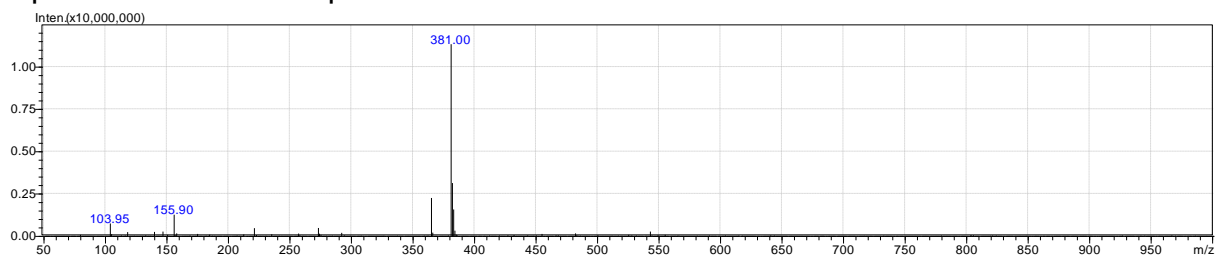
480nm



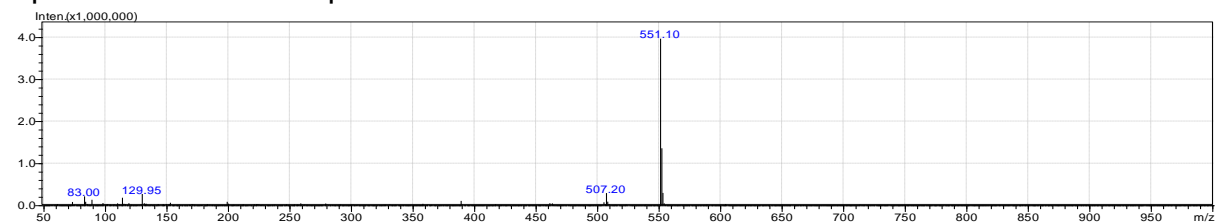
480nm (Ampliación)



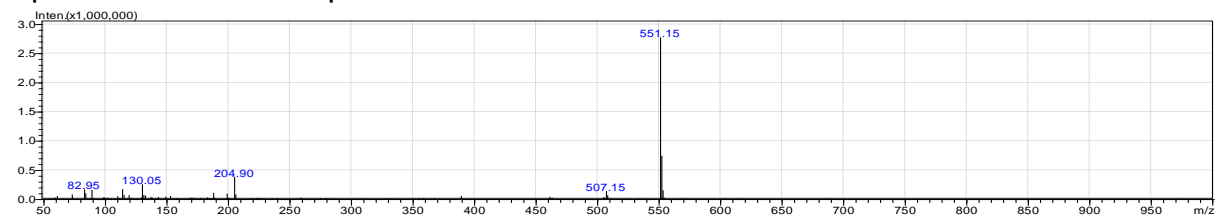
Espectro de masas del pico 1R



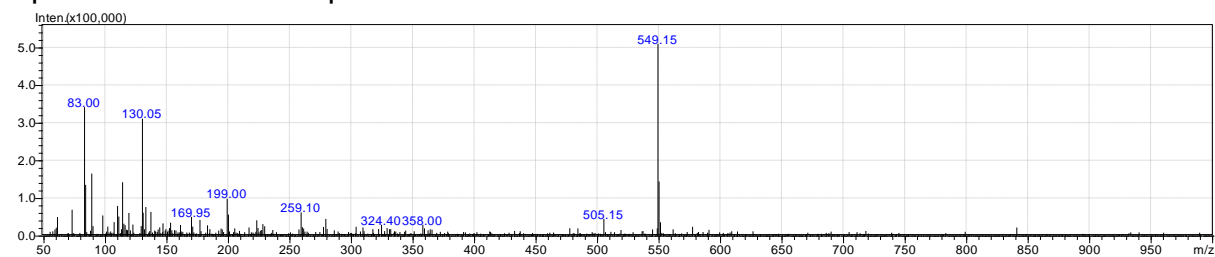
Espectro de masas del pico 9R



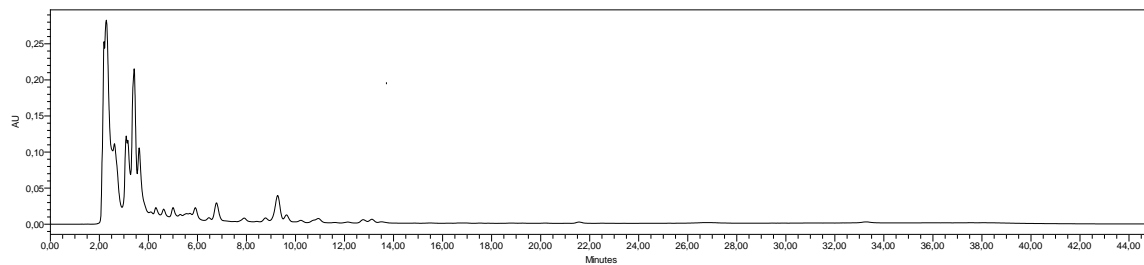
Espectro de masas del pico 10R



Espectro de masas del pico 18R



Anexo I. Cromatograma a 280 nm de la fracción amarilla (FBX) por HPLC-PDA.

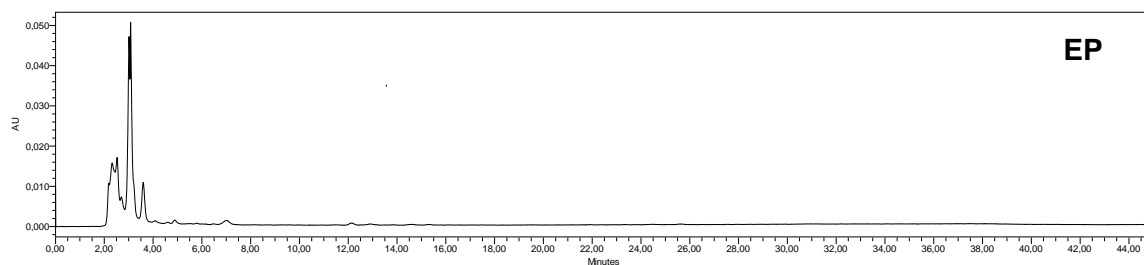
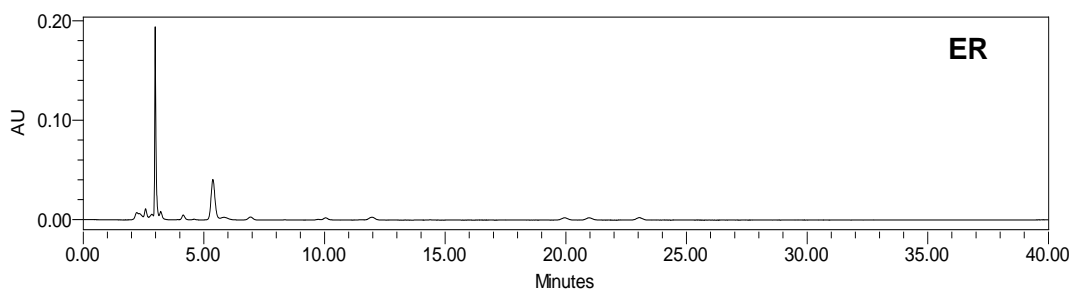


Anexo J. Tabla de porcentaje de áreas y altura de los picos cromatográficos señalados en la fracción FBX.

<i>Pico</i>	<i>% Área</i>	<i>Altura</i>
1	4.16	3168
2	7.09	3294
3	12.64	6466
4	2.87	1498
5[‡]	23.76	17867
6[‡]	24.38	19558
6*	1.11	1092
7	21.16	7816
8	2.82	809

[‡]Compuestos de mayor área

Anexo K. Cromatogramas a 480 nm de la extracto de remolacha (ER) y ulluco (EP).



Anexo L. Verificación de varianza de los datos de la curva de calibrado para determinar el contenido fenólico.

	Prueba	Valor-P
Levene's	0,0508475	0,99435

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

Anexo M. Ecuación de la desviación estándar del estimado S_{x_0}

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}, \hat{y}_i = a + bx_i$$

Fuente: Miller (2002)

Anexo N. Prueba de Múltiple Rangos para el contenido fenólico en los extractos y fracciones (EC, EP, FBC, FI y FBX).

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FBX	3	5,95	X
EP	3	12,09	X
EC	3	15,83	X
FI	3	87,26	X
FBC	3	267,17	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
EC - EP		3,74	5,73549
EC - FBX	*	9,88	5,73549
EC - FI	*	-71,43	5,73549
EC - FBC	*	-251,34	5,73549
EP - FBX	*	6,14	5,73549
EP - FI	*	-75,17	5,73549
EP - FBC	*	-255,08	5,73549
FBX - FI	*	-81,31	5,73549
FBX - FBC	*	-261,22	5,73549
FI - FBC	*	-179,91	5,73549

* indica una diferencia significativa.

Anexo O. Verificación de varianza de los datos de la curva de calibrado para determinar la actividad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,00311	0,456617

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

Anexo P. Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) en los extractos y fracciones (EC, EP, FBC, FI y FBX).

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
FBX	3	51,55	X
EP	3	80,25	X
EC	3	97,15	X
FI	3	509,08	X
FBC	3	1387,52	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
EC - EP		16,9	150,773
EC - FBX		45,6	150,773
EC - FI	*	-411,93	150,773
EC - FBC	*	-1290,37	150,773
EP - FBX		28,7	150,773
EP - FI	*	-428,83	150,773
EP - FBC	*	-1307,27	150,773
FBX - FI	*	-457,53	150,773
FBX - FBC	*	-1335,97	150,773
FI - FBC	*	-878,44	150,773

* indica una diferencia significativa.

Anexo Q. Verificación de varianza de los datos de la curva de calibrado del método DPPH.

Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,604396	0,744051

Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

Anexo R. Prueba de Múltiple Rangos para los valores EC₅₀ de los extractos y fracciones (EC, EP, FBC, FI y FBX).

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
FBC	3	0,487	X
FI	3	2,25	X
EC	3	14,78	X
EP	3	18,71	X
FBX	3	30,28	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
EC - EP	*	-3,93	0,54374
EC - FBX	*	-15,5	0,54374
EC - FI	*	12,53	0,54374
EC - FBC	*	14,293	0,54374
EP - FBX	*	-11,57	0,54374
EP - FI	*	16,46	0,54374
EP - FBC	*	18,223	0,54374
FBX - FI	*	28,03	0,54374
FBX - FBC	*	29,793	0,54374
FI - FBC	*	1,763	0,54374

* indica una diferencia significativa.