

ESTUDIO QUÍMICO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS DE BETALAINAS
AISLADOS POR EXTRACCIÓN TRADICIONAL CON DISOLVENTES Y
RADIACIÓN DE MICROONDAS A PARTIR DE LOS FRUTOS DE DOS
ESPECIES DE CACTUS COLOMBIANO.

DANIEL SANTIAGO BENAVIDES PASUY

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO 2017

ESTUDIO QUÍMICO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS DE BETALAINAS
AISLADOS POR EXTRACCIÓN TRADICIONAL CON DISOLVENTES Y
RADIACIÓN DE MICROONDAS A PARTIR DE LOS FRUTOS DE DOS
ESPECIES DE CACTUS COLOMBIANO.

DANIEL SANTIAGO BENAVIDES PASUY

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

NELSON HUMBERTO HURTADO GUTIERREZ

Ph. D. en Ciencias Químicas

Director

SILVIA CRUZ SÁNCHEZ

Ph. D. en Ciencias Químicas

Codirectora

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO 2017

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

Artículo 1º del acuerdo No 324 del 11 de Octubre de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

Nota de Aceptación

Nelson Humberto Hurtado Gutierrez
Director

William Hidalgo
Jurado

Yaneth Gabriela Misnaza
Jurado

Pasto, 16 de febrero del 2018

AGRADECIMIENTOS

Al director de este trabajo de investigación: Nelson H. Hurtado y a todos los integrantes del Grupo de Investigación de Productos con Importancia Biológica (GIPIB), por el apoyo brindado.

A la Profesora Silvia Cruz por su apoyo y corrección constante en mi trabajo como en mi formación académica.

A la Vicerrectoría de Posgrados e Investigaciones, VIPRI, por la financiación de esta investigación.

A los Profesores del Departamento de Química por haber aportado en mí, la formación académica necesaria para llegar a este título.

A mis amigos “Diana, Manuela, Andrés, Viviana, Erika, Ingrid, Clander” por haber acompañado en cada momento la realización de este trabajo.

A mis Primos “Lizeth, Marlon, Valery” por todo su apoyo incondicional en cada momento de mi vida.

A Nicolás por su constante apoyo en cada momento importante de la realización de este proyecto.

A todos.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada en primer lugar a mis padres “Ana y German” por estar siempre presentes en mi vida con su constante apoyo, a mi familia: mis tíos, mi abuela “Concepción”, y mis primos “Valery, Lizeth, Marlon, Nixon, Jote, Ivan”, ustedes han sido los principales testigos y pilares de este trabajo, brindándome su incondicional apoyo en cada momento.

RESUMEN

Colombia posee una gran variedad de frutos silvestres poco estudiados entre los que figuran las tunas de cactus que se caracterizan por crecer en zonas áridas. El estudio de ésta clase de frutos podría contribuir a darles un valor agregado y promover su cultivo y así fortalecer la economía de estas zonas. La composición química de los frutos de las cactáceas es poco conocida, además, debido a su reconocida actividad antioxidante sus extractos son de gran interés en el tratamiento de diversas enfermedades. En este sentido, dedicar esfuerzos investigativos en el estudio de sus componentes bioactivos permitirá establecer el verdadero potencial de ellas no solo como alimento nutracéutico como colorante natural.

En el presente trabajo se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos tipo Betalaína presentes en dos especies de cactus colombiano, *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta*. Para ello inicialmente se evaluaron dos técnicas de extracción: Extracción tradicional con disolventes (TD) y extracción mediante irradiación asistida con microondas (MAE) y posteriormente se cuantificó el contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas). El análisis de varianza ANOVA permitió establecer que bajo las condiciones evaluadas existen diferencias significativas ($p < 0,05$, nivel de confianza 95%) entre los dos procesos de extracción. Se encontró que el método MAE genera una mayor eficiencia de extracción de este tipo de compuestos. Las mejores condiciones para aislar fenoles mediante la técnica MAE fueron: 90 W de potencia y 10 minutos de extracción.

Mediante el uso de la extracción sólido-líquido y cromatografía en columna se obtuvieron diferentes extractos enriquecidos en betalaínas: extracto crudo (EC), extracto purificado (EP). Por absorción selectiva sobre un soporte C_{18} del extracto etanólico de los frutos se obtuvieron las fracciones enriquecidas en betacianinas (FBC) y betaxantinas (FBX). Además mediante el método de Folin – Ciocalteu se cuantificó el contenido fenólico total (CFT), el contenido de flavonoides totales (FT) y la actividad antioxidante mediante el método TEAC. El análisis de los datos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher y la prueba de múltiples rangos permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores del CFT, FT y TEAC de todas las muestras (extractos purificados y fracciones).

El extracto obtenido por MAE a partir del fruto de la especie *C. Hexagonus* muestra un contenido de betalaínas mayor que en la especie *O. Stricta*. Se

destaca que en las dos especies estudiadas la fracción roja (enriquecida en betacianinas) es la que presenta un mayor contenido fenólico, siendo la fracción roja de la especie *C. Hexagonus* quien presenta el mayor CFT (195,12 mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco). Comparando la fracción amarilla (enriquecida en betaxantinas) de las dos especies, también la aislada a partir de *C. Hexagonus* es quien presenta el mayor CFT (178,4 mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco) y el mayor CF (191,809 mg de catequina/ gramos de extracto seco).

El extracto crudo de *C. Hexagonus* aislado por TD tiene mayor capacidad antioxidante (1,866 mM trolox/ gramos de extracto seco) que el mismo extracto aislado por MAE. Se sugiere que en el extracto crudo de la especie *C. Hexagonus* aislado por TD se aísla una mayor variedad de fenoles que aportan a la actividad antiradical. Sin embargo, cuando del extracto crudo aislado por MAE de las dos especies se separa la fracción roja y amarilla, estas fracciones tienen mayor capacidad antioxidante que los extractos crudos y purificados. La capacidad de captura del radical sintético ABTS (actividad antioxidante) de las diferentes fracciones muestra que la fracción roja (enriquecida en betacianinas) y amarilla (enriquecida en betaxantinas) de la especie *C. Hexagonus* son las que tienen la mayor capacidad antioxidante (TEAC), siendo la fracción roja la más antioxidante.

ABSTRACT

Colombia has a great variety of wild fruits little studied among which are the cactus tunas that are characterized by growing in arid areas. The study of this kind of fruits could contribute to give them an added value and promote their cultivation and thus strengthen the economy of these areas. The chemical composition of the fruits of the cactaceae is little known, in addition, due to its recognized antioxidant activity, its extracts are of great interest in the treatment of various diseases. In this sense, devoting investigative efforts in the study of its bioactive components will allow to establish the true potential of them not only as nutraceutical food as natural coloring.

In the present work, the qualitative and quantitative analysis of the Betalaine type pigments present in two species of Colombian cactus, *Cereus Hexagonus* and *Opuntia Stricta* was carried out. Initially, two extraction techniques were evaluated Conventional extraction with solvents (TD) and extraction by means of microwave-assisted irradiation (MAE) and subsequently the betalains content (betacyanins and betaxanthines) was quantified. The analysis of variance ANOVA allowed to establish that under the evaluated conditions there are significant differences ($p < 0.05$, 95% confidence level) between the two extraction processes, it was found that the MAE method generates a higher extraction efficiency of this type of compounds, the best conditions to isolate phenols through the technique MAE were: 90 W of power and 10 minutes of extraction.

Through the use of solid-liquid extraction and column chromatography different extracts enriched in betalains were obtained: crude extract (EC), purified extract (EP). By selective absorption on a C_{18} support of the ethanolic extract of the fruits, the fractions enriched in betacyanins (FBC) and betaxanthines (FBX) were obtained. In addition, the total phenolic content (CFT), the total flavonoid content (FT) and the antioxidant activity were quantified using the Folin - Ciocalteau method. The analysis of the data using the Fisher's minimal difference (LSD) and the multi-rank test allowed to establish that there are statistically significant differences ($p < 0.05$, 95% confidence level) when comparing CFT, FT values and TEAC of all samples (purified extracts and fractions).

The extract obtained by MAE from the fruit of the species *C. Hexagonus* shows a higher betalaine content than in the species *O. Stricta*. It is noted that in the two species studied, the red fraction (enriched in betacyanines) is the one with the highest phenolic content, with the red fraction of the species *C. Hexagonus* having the highest CFT (195.12 mg of gallic acid / grams of dry extract). Comparing the yellow fraction (enriched in betaxanthines) of the two species, also the one isolated from *C. Hexagonus* has the highest CFT (178.4 mg of gallic acid / grams of dry extract) and the highest CF (191,809 mg of catechin / grams of dry extract).

The crude extract of *C. Hexagonus* isolated by TD has greater antioxidant capacity (1,866 mM trolox / grams of dry extract) than the same extract isolated by MAE. It is suggested that a greater variety of phenols that contribute to antiradical activity is isolated in the crude extract of the species *C. Hexagonus* isolated by TD. However, when the red and yellow fraction is separated from the raw extract isolated by MAE from the two species, these fractions have a higher antioxidant capacity than crude and purified extracts. The capture capacity of the synthetic radical ABTS (antioxidant activity) of the different fractions shows that the red (enriched in betacyanines) and yellow fraction (enriched in betaxanthines) of the species *C. Hexagonus* are those that have the highest antioxidant capacity (TEAC), being the red fraction the most antioxidant.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	21
Objetivo General.	21
Objetivos Específicos.	21
2. ESTADO DEL ARTE	22
3. MARCO TEÓRICO	25
3.1 Familia de las Cactáceas	25
3.2 Cacto	28
3.2.1 Taxonomía y características de fruto	28
3.3 <i>Opuntia Stricta Haw.</i>	29
3.3.1 Taxonomía y características de fruto	30
3.4 Las Betalaínas	31
3.5 Métodos de extracción de betalaínas.	37
3.6 Método UV-Vis de detección de betalaínas.	39
3.7 Estabilidad de Betalaínas.	39
3.8 Actividad Antioxidante de Betalaínas.	39
3.8.1 Método TEAC.	41
3.9 Fenoles Totales.	43
4. METODOLOGÍA	44
4.1 Equipos	44
4.2 Recolección del material vegetal	44
4.3 Preparación del Material Vegetal	45
4.4 Obtención del extracto crudo mediante técnica tradicional con disolventes 46	
4.5 Ensayos Preliminares	46
4.6 Obtención extracto crudo mediante radiación de microondas	47
4.7 Determinación del contenido de betalaínas	48
4.8 Eliminación de hidrocoloides y proteínas	49

4.9	Separación de Betaxantinas y Betacianinas	49
4.10	Fenoles Totales	50
4.11	Flavonoides totales	51
4.12	Actividad Antioxidante	51
4.12.1	Método ABTS	51
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1	PIGMENTOS TIPO BETALAÍNA	52
5.1.1	Ensayos preliminares.	52
5.1.2	Pruebas Preliminares.....	52
5.2	Extracción pigmentos tipo betalaína.....	55
5.2.1	Extracción de los pigmentos tipo Betalaína mediante técnica tradicional con disolventes.....	55
5.2.2	Extracción de los pigmentos tipo Betalaína mediante extracción asistida por microondas (MAE).....	55
5.3	Separación de betaxantinas y Betacianinas.....	55
5.4	Determinación de Fenoles totales.....	57
5.5	Cuantificación de Betalaínas totales.....	63
5.6	Determinación de Flavonoides.....	71
5.7	Determinación de la actividad antioxidante.....	78
5.7.1	Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS.	78
6.	CONCLUSIONES	84
7.	PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN	86
	RECOMENDACIONES	87
	BIBLIOGRAFÍA.....	88
	ANEXOS 1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Cactácea con potencial para ser utilizadas como cultivos nuevos para el mercado de exportación israelí.	25
Tabla 2 Composición química de frutos de diferentes especies del género <i>Opuntia</i>	27
Tabla 3 Características Iniciales de los frutos.	52
Tabla 4 Absorbancias de ácido gálico mediante el método de Folin-Ciocalteu.	57
Tabla 5 CFT <i>Cereus Hexagonus</i> y <i>Opuntia Stricta</i>	59
Tabla 6 Resumen estadístico para CFT - TD	59
Tabla 7 ANOVA para el CFT de los extractos de las dos especies (<i>O. Stricta</i> y <i>C. Hexagonus</i>) obtenidos mediante extracción tradicional (TD).	60
Tabla 8 Prueba de Múltiple Rangos para el CFT de los extractos de las dos especies (<i>O. Stricta</i> y <i>C. Hexagonus</i>) obtenidos mediante extracción tradicional (TD).	60
Tabla 9 Resumen estadístico para CFT MAE	61
Tabla 10 ANOVA para el CFT de los extractos de las dos especies (<i>O. Stricta</i> y <i>C. Hexagonus</i>) obtenidos mediante MAE.	61
Tabla 11 Prueba de Múltiple Rangos para el CFT de los extractos de las dos especies (<i>O. Stricta</i> y <i>C. Hexagonus</i>) obtenidos mediante extracción MAE, con intervalos de confianza del 95%.	62
Tabla 12 Comparación del contenido fenólico.	62
Tabla 13 Contenido de betalaínas para extractos crudos obtenidos por TD y MAE	64
Tabla 14 ANOVA Cuantificación de betalaínas <i>C. Hexagonus</i> y <i>O. Stricta</i> TD	65
Tabla 15 Prueba de múltiples rangos para betacianinas y betaxantinas	65
Tabla 16 Resumen Estadístico del diseño experimental MAE.	68
Tabla 17 Tabla ANOVA Diseño experimental MAE.	68
Tabla 18 Prueba de Múltiples rangos Diseño experimental MAE.	68
Tabla 19 Comparación en el contenido de betacianinas entre diferentes especies o variedades.	69
Tabla 20 Pruebas de Múltiples Rangos Para la especie <i>Cereus Hexagonus</i>	71
Tabla 21 Pruebas de Múltiples Rangos Para la especie <i>Opuntia Stricta</i>	71
Tabla 22 Absorbancias de catequina.	71
Tabla 23 CF para las especies <i>Cereus Hexagonus</i> y <i>Opuntia Stricta</i>	74
Tabla 24 Resumen Estadístico para CF aislados mediante TD.	75
Tabla 25 ANOVA para el contenido de flavonoides de los extractos de las dos especies (<i>O. Stricta</i> y <i>C. Hexagonus</i>) obtenidos mediante TD.	76
Tabla 26 Prueba de Múltiple Rangos para CF de los extractos de las dos especies (<i>O. Stricta</i> y <i>C. Hexagonus</i>) obtenidos mediante TD.	76
Tabla 27 Resumen estadístico para CF aislados MAE	77
Tabla 28 ANOVA para CF de los extractos de las dos especies (<i>O. Stricta</i> y <i>C. Hexagonus</i>) obtenidos mediante MAE.	77

Tabla 29 Prueba de Múltiple Rangos para el CF de los extractos de las dos especies (O. Stricta y C. Hexagonus) obtenidos mediante MAE, con intervalos de confianza del 95%. 78	78
Tabla 30 Decoloración del catión radical ABTS con patrones TROLOX	79
Tabla 31 Valor TEAC para los extractos estudiados (mmol trolox /g extracto).....	80
Tabla 32 Resumen Estadístico para VALOR TEAC aislados por TD.....	80
Tabla 33 ANOVA para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (O. Stricta y C. Hexagonus) obtenidos mediante TD.	81
Tabla 34 Prueba de Múltiple Rangos para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (O. Stricta y C. Hexagonus) obtenidos mediante TD.	81
Tabla 35 Resumen ESTADÍSTICO DEL VALOR TEAC DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR MAE	82
Tabla 36 ANOVA para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (O. Stricta y C. Hexagonus) obtenidos mediante MAE.	82
Tabla 37 Prueba de Múltiple Rangos para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (O. Stricta y C. Hexagonus) obtenidos mediante extracción MAE, con intervalos de confianza del 95%.	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tirosina.....	26
Figura 2	Ceres Hexagonus L.....	29
Figura 3	Opuntia Stricta Haw.....	30
Figura 4	A. Estructura del ácido betalámico. B. Estructura general de las betalaínas (betacianinas y las betaxantinas).....	31
Figura 5	A. Estructura de la Betanidina un ejemplo de las betacianinas. B. Estructura de la Miraxantina-II un ejemplo de las Betaxantinas.....	32
Figura 6	Las rutas biosintéticas que conducen a la formación de betalaínas.....	34
Figura 7	Principales betacianinas y betaxantinas presentes en plantas ricas en betalaínas.....	35
Figura 8	Estructura fase C-18.....	39
Figura 9	Formación del catión radical ABTS.....	41
Figura 10	Oxidación de betanina por acción del catión radical ABTS.....	42
Figura 11	Recolección vegetal.....	44
Figura 12	Fruto Cereus Hexagonus.....	45
Figura 13	Fruto Opuntia Stricta.....	45
Figura 14	Extracto Crudo.....	46
Figura 15	Montaje MAE.....	47
Figura 16	Ecuación general diseño estadístico empleado.....	48
Figura 17	Mucilagos formados.....	49
Figura 18	Esquema del cambio estructural de betanina en medio básico.....	53
Figura 19	(a) Espectro de absorción Cereus Hexagonus.....	53
Figura 20	Proceso de Fraccionamiento sobre C ₁₈ para Op. Stricta.....	56
Figura 21	Curva de calibración de Polifenoles Totales.....	57
Figura 22	Reacción general de polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	58
Figura 23	Mecanismo de oxidación de polifenoles.....	58
Figura 24	Fruto Opuntia Stricta antes y después de la extracción de los pigmentos tipo Betalaína (90% - 10 minutos).....	64
Figura 25	Grafico de Interacciones Diseño Experimental MAE.....	67
Figura 26	Contenido de betacianinas y betaxantina para las dos especies en estudio con respecto a datos bibliográficos de otras especies.....	70
Figura 27	Curva de calibración de Flavonoides.....	72
Figura 28	Reacción general Flavonoides con AlCl ₃	73
Figura 29	Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante por el método ABTS.....	79

GLOSARIO

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

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

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

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

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

EFEECTO HIPSOCRÓMICO: Cuando la longitud de onda de absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda menores. 21

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

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

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

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

FILOGENÉTICO: Relación de parentesco entre especies. Estudio de las relaciones evolutivas entre diferentes grupos de organismos.

ANTESIS: Proceso de floración de las plantas. Estrictamente, es el tiempo de expansión de una flor hasta que está completamente desarrollada y en estado funcional.

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
AG	Ácido gálico
CC	Cromatografía de columna
TD	Extracción tradicional con disolventes
MAE	Extracción asistida con microondas
EC	Extracto crudo
EP	Extracto Puro
FRX	Fracción rica en betaxantinas
FRB	Fracción rica en betacianinas
λ_{max}	Longitud de onda de máxima absorbancia
TEAC	Equivaletes trolox de capacidad antioxidante
Tr	Tiempo de retención
LSD	Procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher
CF	Contenido de Flavonoides
CFT	Contenido Fenólico Total
BC	Betacianinas
BX	Betaxantinas
gff	Gramos de fruto fresco

INTRODUCCIÓN

El color es uno de los atributos más importantes en los alimentos y se considera un indicador de calidad y aceptabilidad de los mismos¹. El color de los alimentos suele perderse después de un procesamiento y/o almacenamiento, por lo tanto los colorantes de alimentos son de gran importancia en la industria para resaltar y uniformar el color original del alimento.

Los colorantes pueden ser de origen natural o sintético siendo éstos últimos los más utilizados. Sin embargo, las regulaciones oficiales de la Unión Europea y EEUU han restringido el uso de colorantes sintéticos debido a sus posibles efectos adversos sobre la salud². En la actualidad existe un creciente interés en el desarrollo, utilización y consumo de colorantes de origen natural^{3, 4}.

Los pigmentos tipo betalaína son una buena opción para ser usados como colorantes en alimentos ya que son solubles en agua⁵, además, constituyen indudablemente una opción interesante dado su gama de colores, desde el anaranjado amarillento al rojo violáceo⁶. También son conocidos por su capacidad antioxidante que según diversas publicaciones científicas generan beneficios para la salud humana^{7, 8}, por lo que su consumo se asocia a la protección contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo⁹, entre las que se encuentran:

¹ AZEREDO, H.M.C. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. En: International Journal of Food Science & Technology. 2008, Vol. 44, p. 2365 – 2376.

²TSUDA, S., et al. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. En: Toxicological Sciences. 2001, Vol. 61, p. 92 – 99

³STINTZING, F., CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: Trends Food Science Technology. 2004, Vol. 15, p. 19 - 38.

⁴MOßHAMMER, M. R., et al. Stability of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* [L.]Mill. cv. 'Gialla') betalains as affected by the juice matrix and selected food additives. En: European Food Research and Technology. 2007, Vol. 225, p. 21 – 32.

⁵STINTZING, F., CARLE, R. Op. Cit., p. 18

⁶ AZEREDO, H. Betalains: properties, sources, applications, and stability -a review. En: Food Science and Technology. Diciembre, 2009, vol. 44, no. 12, p. 2365-2376.

⁷FEUGANG, J., et al. Nutritional and medicinal use of cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. En: Frontiers in Bioscience. Septiembre, 2006, vol. 11, p. 2574-2589.

⁸STINTZING, F., et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Enero, 2005, vol. 53, no. 2, p. 442-451.

⁹STRACK, Dieter; VOGT, Thomas y SCHLIEMANN, Willibald. Recent advances in betalain research. En: Phytochemistry, Febrero, 2003, vol. 62, no. 3, p. 247-269.

aterosclerosis, parkinson, alzheimer, entre otras¹⁰. Por lo anterior se han empezado a explorar fuentes alternativas que contienen pigmentos tipo betalainas, entre géneros de la familia Cactácea¹¹. Los cactus, conocidos por su mínimo requerimiento de agua, han sido cultivados extensivamente en tierras áridas, para alimentos, usos medicinales y terapéuticos¹².

Sobre los frutos silvestres de las Cactáceas *Cereus Hexagonus l.* y *Opuntia Stricta (Haw.)* no hay estudios de la composición química, capacidad antiradical y contenido fenólico, y debido a que estas variedades pueden ser una fuente promisoría de colorantes alimentarios, en la gama de los amarillos y rojos violáceos, es importante dedicar esfuerzos investigativos para valorar su potencial nutraceutico. Hasta la fecha en la gama amarilla de colores, los más utilizados indudablemente son los carotenos, pero son pigmentos con una escasa solubilidad en agua¹³.

En Colombia la especie *Cereus Hexagonus l.* es comúnmente conocida bajo el nombre de cacto, sus frutos son grandes y de muy agradable sabor. La planta se emplea como elemento de adorno en parques, jardines y como cerca viva en las haciendas. Entre las cactáceas colombianas ésta es una de las que presenta frutos de mayor tamaño. El fruto es ovoideo, elipsoide, truncado y algo cóncavo en el ápice, de 5-15 cm de largo por 3 a 6 cm de ancho, rojo-pálido, algo glauco, con pequeñas aréolas, carnoso, de envoltura gruesa, pulpa blanca o rosada y semillas negras brillantes¹⁴.

Numerosos trabajos de investigación están enfocados hacia la extracción de betalainas a partir de diversos materiales tales como extracción con disolventes, extracción asistida por ultrasonido y soxhlet, pero estos métodos de extracción muestran una baja eficiencia de extracción, mayor tiempo de extracción y son costosos¹⁵. Las betalainas usualmente se extraen con disolventes (agua, etanol y metanol) con o sin aplicación de temperatura¹⁶.

¹⁰GUERRA, E. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. En: Anales de medicina interna. Junio, 2001, vol. 18, no. 6, doi: 10.4321/s0212-71992001000600010.

¹¹BROCKINGTON, S., et al. Complex pigment evolution in the Caryophyllales. En: New Phytologist. Junio, 2011, vol. 190, no. 4, p. 854-864.

¹²UTKARSHA, U., et al. Opuntia and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. En: Tropical Plant Biol. Agosto, 2010, Vol 3, p. 136-150.

¹³AZAREDO. Op. Cit., p. 18

¹⁴ROMERO, R. FRUTAS SILVESTRES DE COLOMBIA. Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales. Vol. 2. 1969.

¹⁵MOURE, A., FRANCO, D., SINERIO, J., et al. Evaluation of extracts from Gevuina avellana hulls as antioxidants. En: J. Agric. Food Chem. 2000, Vol. 48, p. 3890 – 3897.

¹⁶DELGADO-VARGAS, F., JIMENÉZ, A. R., 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, p. 173 – 289.

La extracción asistida por microondas es una alternativa prometedora a las extracciones convencionales¹⁷. La MAE es una técnica de extracción novedosa y ambientalmente amigable, que puede ofrecer una alta reproducibilidad en un tiempo más corto, una manipulación simplificada, reduciendo el consumo de disolventes y un menor consumo de energía sin disminuir el rendimiento de extracción de la especie¹⁸. Debido a estas ventajas, la MAE se utiliza como una alternativa a la liberación de componentes bioactivos a partir de los recursos alimenticios. Más aún, la optimización de las variables de proceso en el MAE tales como la temperatura, la masa de la muestra y el tiempo de extracción, puede aumentar la eficacia del tratamiento, así como también crea la oportunidad de conocer el profundo mecanismo detrás de la técnica MAE¹⁹.

El presente trabajo se enfocó en el estudio de la extracción, el contenido fenólicos y actividad biológica de los pigmentos tipo betalaína presentes en la pulpa y epicarpio de los frutos de *Cereus Hexagonus l.* y *Opuntia Stricta haw.* que crecen de forma silvestre en el cañón del Chicamocha, en el Departamento de Santander-Colombia. Estos estudios podrían a futuro apoyar investigaciones relacionadas con la extracción a escala industrial y también a evaluaciones farmacológicas, lo que contribuiría al conocimiento del potencial uso de esta clase de compuestos.

¹⁷ESKILSSON, C., BJORKLUND, E. Analytical-scale microwave assisted extraction. En: Journal of Chromatography. A. 2000, Vol. 902(1), p. 227 – 250.

¹⁸ NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. En: J. Chromatogr. A. 2004, Vol. 1054 (1–2), p. 95 – 111.

¹⁹JADHAV, S.J., LUTZ, S.E., GHORPADE, V.M., et al. Barley: chemistry and value-added processing. En: Crit. Rev. Food Sci. 1998, Vol. 38, p. 123 – 171.

1. OBJETIVOS

Objetivo General.

Realizar un estudio químico comparativo de los extractos de betalaínas aislados mediante extracción tradicional con disolventes y radiación de microondas a partir de los frutos de dos especies de cactus colombiano, *Cereus Hexagonus l.* y *Opuntia Stricta haw.*

Objetivos Específicos.

- Extraer mediante la técnica convencional (maceración química) y por radiación con microondas (MAE) las fracciones ricas en betalaínas (FRB) de los frutos de dos especies de cactus que crecen en Colombia.
- Determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides y la actividad antioxidante (método ABTS) de las FRB aisladas.
- Cuantificar mediante espectroscopia UV-Vis el contenido de betacianinas y betaxantinas de las diversas fracciones obtenidas.
- Comparar estadísticamente las diferencias encontradas en los diferentes extractos aislados.

2. ESTADO DEL ARTE

Las betalaínas podrían ser utilizadas como colorantes rojos y amarillo debido a que son pigmentos naturales hidrosolubles que además poseen actividad antioxidante²⁰. Dichos pigmentos son particularmente escasos en la naturaleza; entre las plantas superiores la ocurrencia de betalaínas se limita a las *Caryophyllales*²¹, y a ciertos hongos superiores tales como *Amanita*, *Hygrocybe*²². Las betalaínas encontradas en plantas superiores se distribuyen a través de sus diferentes órganos²³ produciendo colores rojos, amarillos, rosa y naranja en las flores de *Aizoaceae* y *Portulacaceae*²⁴ y pigmentaciones púrpuras en frutas *Cactaceae* y en la raíz de remolacha roja²⁵. Las betalaínas también se encuentran en la betarraga (*Beta Vulgaris* L. *Spp. Vulgaris*), semillas y hojas de amaranto (*Amaranthus* sp.) y en algunas cactáceas del genero *Opuntia* y *Hylocereus*, como las pitayas y pitahayas^{26, 27, 28}.

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

²⁰TESORIERE, L., 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. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, Vol. 53, p. 1266 - 1270.

²¹MABRY, T. J., TAYLOR, A., TURNER, B. L., The betacyanins and their distribution. En: Phytochemistry. 1963, Vol. 2, p. 61 – 64.

²²STRACK, D., STEGLICH, W., WRAY, V. Betalains. En: Methods in Plant Biochemistry. 1993, Vol. 8, Academic Press, Orlando, 421 – 450.

²³ROSENDAL-JENSEN, S., JUHL-NIELSEN, B., & DAHLGREN, R. Use of chemistry in plant classification. En: Rev. Latinoamer. Quím. 1989; Suppl 1, p. 66 – 89.

²⁴TREZZINI, G. F., ZRÝD, J. P. Two betalains from *Portulaca grandiflora*. En: Phytochemistry. 1991, Vol. 30(6), p. 1897 – 1899.

²⁵PIATELLI, M., IMPERATO, F. Betacyanins of the family cactaceae. En: Phytochemistry. 1969, Vol. 8, p. 1503 – 1507

²⁶CAI, Y., SUN, M., CORKE, H. Colourant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998, Vol. 46, p. 4491 – 4495.

²⁷STINTZING, F.C., SCHIEBER, A. & 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 spectroscopy. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002, Vol. 50, p. 2302 – 2307.

²⁸VAILLANT, F. et al. Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). En: Fruits. 2005, Vol: 60, p. 1 – 10.

efectos adversos para la salud²⁹. El interés de la industria ha mostrado un crecimiento en los frutos de cactus y sus betalaínas desde que se identificaron como antioxidantes naturales que pueden tener efectos positivos para la salud en los seres humanos³⁰. Numerosos informes de investigación están disponibles en la extracción de betalaínas a partir de diversos materiales, tales como extracción con disolventes, extracción asistida por ultrasonido y soxhlet, pero estos métodos de extracción muestran una baja eficiencia de extracción, mayor tiempo de extracción y en algunos casos la inversión de gran capital³¹. Sin embargo, las betalaínas usualmente se extraen con disolventes (agua, etanol y metanol) con o sin aplicación de temperatura³².

La extracción asistida por microondas es una alternativa prometedora a las extracciones convencionales³³. La MAE es una técnica novedosa y ambientalmente amigable de extracción, que puede ofrecer una alta reproducibilidad en un tiempo más corto, una manipulación simplificada, reduciendo el consumo de disolventes y un menor consumo de energía sin disminuir el rendimiento de extracción de la especie³⁴. Debido a estas ventajas, MAE se utiliza como una alternativa a la liberación de componentes bioactivos a partir de los recursos alimenticios. Más aún, la optimización de las variables de proceso en MAE tales como la temperatura, la masa de la muestra y el tiempo de extracción, puede aumentar la eficacia del tratamiento, así como también crea la oportunidad de conocer el profundo mecanismo detrás de la técnica MAE³⁵.

La MAE ha demostrado ser un medio eficaz para extraer betalaínas de remolacha roja, dando rendimientos de extracción más altos en comparación a la extracción convencional en cuanto a tiempo y la temperatura equivalente. La adición de ácido ascórbico protege a las betalaínas de la degradación durante el procesamiento y ayuda en la regeneración del pigmento durante el enfriamiento, por lo tanto, la MAE es una tecnología prometedora para la extracción eficiente de los pigmentos y otros compuestos bioactivos que merece una mayor investigación para desarrollar aplicaciones y técnicas posteriores³⁶.

²⁹GENGATHARAN, A., DYKES, G., CHOO, W. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. En: Food Science and Technology. Diciembre, 2015, vol. 64, no. 2, p. 645-649.

³⁰THIRUGNANASAMBANDHAM, K., SIVAKUMAR, V. Microwave assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. En: Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2015, Vol. 144. P. 1 – 8.

³¹MOURE. Op. Cit., p. 19

³²DELGADO-VARGAS. Op. Cit., p. 19

³³ESKILSSON. Op. Cit., p. 20

³⁴NACZK. Op. Cit., p. 20

³⁵JADHAV. Op. Cit., p. 20

³⁶CARDOSO-UGARTE, G.A., et al. Microwave-Assisted Extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). En: LWT Food Science and Technology, 2014, Vol. 59, p. 276 – 282.

En cuanto a la extracción mediante MAE de los fitoquímicos presentes en las especies *Cereus Hexagonus L.* y *Opuntia Stricta Haw.*, que es el motivo de esta investigación no hay reportes hasta el momento, sin embargo, Castellar et al³⁷ demostraron que los frutos de *O. Stricta* deben ser cosechados alrededor de 9 meses después de la antesis para lograr una buena pigmentación del fruto y una mayor actividad antioxidante. Esta fruta es una buena fuente de betacianinas (81 mg / 100 gff) y otros componentes antioxidantes como los fenoles (135 mg de ácido gálico / 100 gff) y ácido ascórbico (35 mg / 100 g). Tiene baja concentración de azúcar (4,7 g / 100 g ff) y pH (3,3). Por otra parte, no hay estudios sobre la composición química de la especie *Cereus Hexagonus L.*

³⁷CASTELLAR, M. R., SOLANO, F., OBÓN, J. M. Betacyanin and Other Antioxidants Production During Growth of *Opuntia stricta* (Haw.) Fruits. En: *Plant Foods Hum Nutr.*, 2012, vol. 67, p.337–343.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Familia de las Cactáceas

Las cactáceas son una familia constituida por alrededor de 1600 especies. Los miembros de esta familia se encuentran en forma nativa desde Chile y Argentina hasta Canadá. Dentro de las cactáceas existen alrededor de 35 especies que tienen potencial como cultivo para obtención de frutos. Algunos son descritos en la tabla 1³⁸.

Tabla 1 Cactácea con potencial para ser utilizadas como cultivos nuevos para el mercado de exportación israelí.

Nombre botánico	Nombre común (Inglés)	Distribución
<i>Acanthocereus tetragonus</i> (L.) Humk	Acanthocereus	México
<i>Cereus peruvianus</i> (L.) Miller	Apple cactus (Pitaya)	América del Sur (Norte)
<i>Escontria chiotilla</i> (Weber) Britt. & Rose	Pitaya (Jiotilla)	México
<i>Hylocereus costarricensis</i> (Weber) Br. & R.	Pitahaya	América Central
<i>Hylocereus paolryhi</i> (Weber) Br. & R.	Pitahaya	America Central
<i>Hylocereus polyrhizus</i> (Weber) Br. & R.	Pitahaya	America Central
<i>Hylocereus purpusii</i> (Weber) Br. & R.	Pitahaya	America Central
<i>Hylocereus undatus</i> (Weber) Br. & R.	Pitahaya	America Central
<i>Myrtilloactus geometrizzans</i> (Mart.) Cons.	Pitaya	México
<i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm-Dyck	Nopalito, Nopalea	México
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Millar	Prickly pear	America Tropical
<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.	Prickly pear	America Tropical
<i>Pachycereus pringlei</i> (Berger) Br.	Cardon pelon	Desierto Sonoran

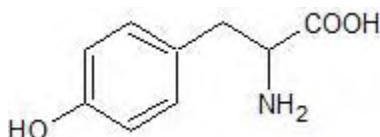
³⁸ESQUIVEL, P. Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. En: Agronomía Mesoamericana. Junio, 2004, vol. 15, no. 2, p. 215-219.

& R.		
<i>Selenicereus megalanthus</i> (Schum.) Br. & R.	Pitaya	Colombia
<i>Stenocereus griseus</i> (Engelm.) Gilbs.	Pitaya	Oaxaca, México
<i>Stenocereus gummosus</i> (Engelm.) Gilbs.	Pitaya agria	Desierto Sonoran
<i>Stenocereus stellatus</i> (Pfeiff.) Riccob.	Pitaya	México
<i>Stenocereus thurberi</i> (Engelm.) Buxb.	Pitaya dulce	México
<i>Stenocereus thurberi</i> var. <i>litoralis</i> (E.) B.	Pitaya dulce	México

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

Las cactáceas pertenecen al orden *Caryophyllales*. Su ubicación filogenética dentro de este orden es indisputable, debido a que las cactáceas y las otras familias en este orden comparten características (sinamorfismos) que no ocurren en ningún otro orden de las angiospermas. Uno de estos sinamorfismos es la presencia de betalainas, un tipo de pigmentos nitrogenados derivados de la tirosina³⁹ (Figura 1)

Figura 1 Tirosina.



Fuente: WALLACE, R.S., GIBSON, A.C. EVOLUTION AND SYSTEMATICS. En: Park S. Nobel (ed.). Cacti: Biology and Uses. Ed. University of California Press. California, EUA, 2002, 280 p.

Las cactáceas comestibles se pueden clasificar en tres tipos: tunas, pitayas (trepadoras) y pereskias (columnares): para las tunas, México se considera el centro

³⁹WALLACE, R.S., GIBSON, A.C. EVOLUTION AND SYSTEMATICS. En: Park S. Nobel (ed.). Cacti: Biology and Uses. Ed. University of California Press. California, EUA, 2002, 280 p.

de origen genético del género *Opuntia*⁴⁰. Actualmente se cultiva a nivel comercial en México, Chile, Argentina, Brasil, Colombia y Perú⁴¹; entre cultivares, se observan diferencias en cuanto al tamaño del fruto, tiempo de maduración, contenido de semillas⁴². La tabla 2⁴³ resume la composición química de frutos de diferentes especies de *Opuntia*; La que más se cultiva en distintas partes del mundo es *Opuntia ficus-indica*, conocida también como nopal o tuna⁴⁴

Tabla 2 Composición química de frutos de diferentes especies del género *Opuntia*

Componentes	Especie		
	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Mill.	<i>O. amyclaea</i> Engelm.	<i>O. streptocantha</i> Lem.
% Humedad	84,7	-	87,0
° Brix	14,8	15,5	-
pH	6,2	6,6	-
% glucose	7,8	8,2	6,0
% fructuosa	7,6	6,7	5,7
% sacarosa	0	1,1	0,1
% azúcares totales	15,4	16,0	11,9
Vit C (mg/100g)	31,7	22,0	-

Fuente: MOHAMED-YASSEEN, Y.; BARRINGER, S.A.; SPLITTSTOESSER, W.E. A note on the uses of *Opuntia* spp. in Central/North America. En: Journal of Arid Enviroments, 1996, Vol. 32, p. 347-353.

Los frutos de las cactáceas trepadoras, denominadas de esta forma debido a su hábito de crecimiento en el cual utilizan árboles como soporte físico, se conocen en Latinoamérica como pitaya. A diferencia del fruto de la tuna, los de este grupo contienen pequeñas semillas digeribles y no presentan las espinas típicas de la tuna (gloquideo), que provocan problemas durante la cosecha y manejo de los frutos. La cáscara puede tener o no espinas, pero las espinas se remueven

⁴⁰PIMIENTA-BARRIOS, E., NOBEL, P.S. Reproductive characteristics of pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) and their relationship with soluble sugars and irrigation. En: Journal of the American Society of Horticultural Science, 1995, vol. 120, p. 1082-1086.

⁴¹INGLESE, P., BASILE, F., SCHIRRA, M. Cacturs pear fruit production. En: Park S. Nobel (ed.). Cacti: Biology and Uses. University of California Press. California, USA, 2002, 280p.

⁴²Ibid., p. 27

⁴³MOHAMED-YASSEEN, Y., BARRINGER, S.A., SPLITTSTOESSER, W.E. A note on the uses of *Opuntia* spp. in Central/North America. En: Journal of Arid Enviroments, 1996, Vol. 32, p. 347-353.

⁴⁴SAENZ, C. Utilización agroindustrial del nopal. En: food and agriculture organization of the united nations, 2006, p. 4-5.

fácilmente durante la maduración. *Hylocereus Undatus* es la especie de cactus trepador más distribuido a nivel mundial⁴⁵.

De las cactáceas, las columnares, denominadas de esta forma debido a la forma de la planta, *Stenocereus* Spp. es la de mayor cultivo, siendo la especie de mayor importancia comercial *Stenocereus Queretaroensis*⁴⁶. Dentro de las cactáceas columnares, una de las especies promisorias es *Cereus Peruvianis*, la cual es de domesticación relativamente reciente y se cree que su origen se encuentra en Brasil⁴⁷ (Mizrahi y Nerd 1999).

3.2 Cacto

La especie *Cereus Hexagonus* es vulgarmente conocida bajo el nombre de cacto en Colombia, Sus frutos son grandes, de muy agradable sabor y preferentemente se comen a mano. La planta se emplea como elemento de adorno en parques, jardines y como cerca viva en las haciendas. De las Cactáceas colombianas ésta es una de las que presenta frutos de mayor tamaño⁴⁸.

3.2.1 Taxonomía y características de fruto

La clasificación taxonómica para la especie *Cereus Hexagonus* es la siguiente.

Reino: *Plantae*
Súper división: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Orden: *Caryophyllales*
Familia: *Cactaceae*
Subfamilia: *Cactoideae*
Tribu: *Cereeae*
Género: *Cereus*
Especie: *C. Hexagonus l.*

Descripción: El cacto es una planta columnar (Figura 2), el vegetal de unos 15 metros de alto; leñoso en la base de color pardo que alcanza tres metros y de aquí en adelante comienza a ramificarse. Las ramas jóvenes son glaucas o glaucoverduscas y verde-pálidas con los años. En la fase juvenil tiene 4 aristas y en la

⁴⁵NERD, A., TEL-ZUR, N., MIZRAHI, Y. Fruits of vine and columnar cacti. En: Park S. Nobel (ed.). Cacti: Biology and Uses. University of California Press. California, USA, 2002, p. 280.

⁴⁶PIMIENTA-BARRIOS. Op. Cit., p. 27

⁴⁷MIZRAHI, Y., NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. En: J. Janick (ed.). Perspectives on New Crops and New Uses. American Society of Horticultural Science, Alexandria, Virginia, USA, 1999, p. 358-366.

⁴⁸ROMERO. Op. Cit., p. 19

adulta 6 hasta 7. Las aréolas de los artejos viejos llegan hasta 6 cm de longitud. Flores sentadas, solitarias, carnosas, inodoras, infundibuliformes, axiliares y alcanzan hasta 28 cm de largo. Tubo cilíndrico blanco-rosado por fuera, glabro, sin escamas; la superior se dilata y presenta sépalos o escamas obovados u oblongos de ápice triangular, carnosos, rosados y manchados de morado, de 4-5 cm de largo y el ápice triangular. La corola o segmentos internos son blancos, glabros, oblongos, oblongo-lanceolados, de unos 7 cm de longitud. Estambres blancos, numerosos, desiguales, glabros, soldados en toda la extensión del tubo; anteras blancas, lineares. Estilo cilíndrico, glabro, blanco-verdusco; estigma con 6-10 lobulillos oblongo-subulados que alcanzan el nivel del ápice de la flor. El fruto es ovoideo, elipsoide, truncado y algo cóncavo en el ápice, de 5-15 cm de largo por 3 a 6 cm de ancho, rojo-pálido, algo glauco, con pequeñas aréolas, carnoso, muy gruesa la envoltura; pulpa blanca o rosada, comestible, de agradable sabor; semillas negras brillantes⁴⁹.

Figura 2 *Cereus Hexagonus* L.



Fuente: Manual De Plantas de Costa Rica. Disponible en: www.flickr.com/photos/68114448@N06/20198948669/in/photostream/ [Última Revisión: 23 de octubre de 2017]

3.3 *Opuntia Stricta* Haw.

La especie *Opuntia Stricta* es un cactus que puede crecer hasta 2 metros de altura y se origina en América Central. Este arbusto espinoso que favorece los hábitats como las laderas rocosas, las orillas de los ríos y las zonas urbanas; fue

⁴⁹ ROMERO. Op. Cit., p. 19

considerada como la peor de todas las malezas de Australia, también es invasiva en Sudáfrica⁵⁰.

3.3.1 Taxonomía y características de fruto

La clasificación taxonómica para la especie *Opuntia Stricta Haw.* es la siguiente⁵¹.

Reino: *Plantae*
Súper división: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Orden: *Caryophyllales*
Familia: *Cactaceae*
Subfamilia: *Opuntioideae*
Tribu: *Opuntieae*
Género: *Opuntia*
Especie: *O. Stricta (Haw.)*

Descripción: Es un [planta](#) rastrera [suculenta](#) armada de espinas, de color púrpura y flores de color naranja y amarillo (Figura 3).

Figura 3 *Opuntia Stricta Haw.*



⁵⁰ Global Invasive Species Database (GISD) 2015. Species profile *Opuntia stricta*. Disponible en: <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=104> [ultimo acceso: 23 de febrero de 2017]

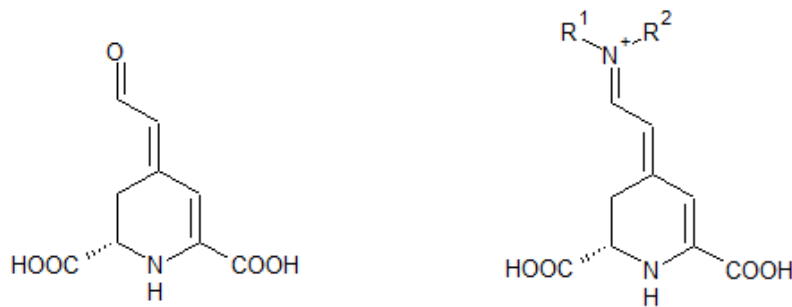
⁵¹ Global Invasive Species Database. Op. Cit., p. 29

Disponible en: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Har%C3%ADa_-_Calle_Vista_del_Valle_-_Opuntia_stricta_02_ies.jpg. [Última Revisión: 23 de octubre de 2017]

3.4 Las Betalaínas

Los pigmentos responsables del color de los frutos de los cactus mencionados anteriormente son las betalaínas, los cuales derivan del ácido betalámico (Figura 4 A) y son solubles en agua. Se clasifican principalmente en dos grupos: las betacianinas, responsables del color rojo-púrpura y las betaxantinas, de coloración amarillo-anaranjado, la estructura química de las betalaínas se indica en la figura 4 B⁵².

Figura 4 A. Estructura del ácido betalámico. B. Estructura general de las betalaínas (betacianinas y las betaxantinas)



Fuente: BÖHM, H., RINK, E. Betalains. En: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, New York. 1988, p. 449 – 463.

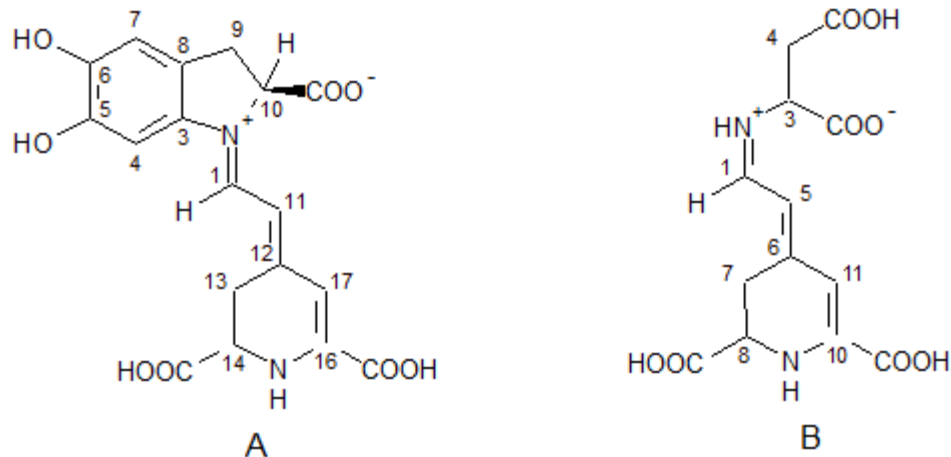
Delgado-Vargas describe la estructura de las betacianinas (Figura 5 A), las cuales muestran algunas variaciones en los grupos acilo y restos de azúcar, mientras que las betaxantinas (Figura 5 B) presenta el mismo resto de dihidropiridina pero muestran una conjugación con varias aminas y aminoácidos. La betanidina es la unidad estructural básica de la mayoría de las betacianinas, seguido de su epímero C15, la isobetanidina⁵³. Un número considerable de diferentes betacianinas se puede obtener con glicosidación de uno de los grupos hidroxilo situados en las posiciones 5 y 6 (Figura 5 A). Las betaxantinas están constituidas por diferentes aminoácidos proteinogénicos y no proteinógenos, así como restos

⁵² BÖHM, H., RINK, E. Betalains. En: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, New York. 1988, p. 449 – 463.

⁵³PIATELLI, M., MINALE, L. Pigments of Centrospermae. III. Distribution of betacyanins, En: Phytochemistry. 1964, Vol. 3, p. 547 – 557.

de aminas biogénicas conjugadas con el ácido betalámico (Figura 5 B). Más de 200 aminoácidos que se encuentran en las plantas pueden dar lugar a potenciales estructuras de betaxantinas⁵⁴. El compuesto que representa las betaxantinas arquetípicas es la indicaxantina, aislada de la tuna, un fruto del cactus *Opuntia Ficus-indica*⁵⁵.

Figura 5 A. Estructura de la Betanidina un ejemplo de las betacianinas. B. Estructura de la Miraxantina-II un ejemplo de las Betaxantinas⁵⁶.



Fuente: PIATELLI, M. The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. En: Conn, E. E., Ed., The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. Vol. 17. Secondary Plant Products, Academic Press, New York, 1981, p. 557 – 575.

Las betacianinas y las betaxantinas absorben a distintas longitudes de onda; las betacianinas a 535-550 nm y las betaxantinas a 475-480 nm en el rango de luz visible^{57, 58, 59, 60, 61}.

⁵⁴STRACK. Op. Cit., p. 22

⁵⁵PIATELLI, M. Betalains. En: Goodwin, T. W., Ed. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. 1976, Vol. 1, Academic Press, New York, p. 560 – 596.

⁵⁶PIATELLI, M. The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. En: Conn, E. E., Ed., The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. Vol. 17. Secondary Plant Products, Academic Press, New York, 1981, p. 557 – 575.

⁵⁷ALLEGRA, M., et al. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. En: Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005, Vol. 332, p. 837 – 844.

⁵⁸SAENZ. Op. Cit., p. 27

⁵⁹FORNI, E., et al. Highperformance liquid chromatographic analysis of the pigments of blood-red prickly pear (*Opuntia ficus-indica*). En: Journal of Chromatography. 1992, Vol. 593, p. 177 - 183

⁶⁰DELGADO-VARGAS. Op. Cit., p. 19

Se ha informado que aproximadamente 60 betacianinas y 33 betaxantinas existen en la naturaleza^{62, 63, 64}. Las betacianinas son glucósidos o acilglucósidos de la betanidina, mientras que las betaxantinas son productos de condensación de ácido betalámico con aminas o aminoácidos, excepto la ciclo-Dopa (figura 6). La tirosina es el precursor de este último compuesto derivado de la vía del shikimato⁶⁵. Después de la escisión de Dopa, se generan 4,5-seco-Dopa o 2,3-seco-Dopa. La vía típica en plantas superiores tiene 4,5-seco-Dopa como precursor del ácido betalámico, la estructura básica del esqueleto de las betalainas⁶⁶ (Figura 6). La forma aglicona de la mayoría de las betacianinas es la betanidina. La sustitución de uno o ambos grupos hidroxilo localizados en las posiciones 5 y 6 de este compuesto por glicosilación y/o acilación dan como resultado la formación de diferentes derivados de betacianinas. Prevalcen los 5-O-glucósidos sobre los 6-O-glucósidos⁶⁷. En etapas adicionales, la glicosilación del 5-O-glucósido y la esterificación con ácidos hidroxicinámicos son también comunes⁶⁸. La betanina (betanidin-5-O-β-glucósido) es la betacianina más extendida entre plantas^{69, 70}.

⁶¹CASTELLAR, M.R., et al. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, Vol. 51, p. 2772 - 2776.

⁶²KHAN, M.I., GIRIDHAR, P. Plant betalains: chemistry and biochemistry. En: *Phytochemistry*. 2015, vol. 117, p. 267–295.

⁶³KUGLER, F., STINTZING, F.C., CARLE, R. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC– DAD–ESI–MS n. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, Vol. 387, p. 637–648.

⁶⁴WYBRANIEC, S., NOWAK-WYDRA, B., MITKA, K., KOWALSKI, P., MIZRAHI, Y. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. En: *Phytochemistry*. 2007, Vol. 68, p. 251–259.

⁶⁵STRACK. Op. Cit., p. 18

⁶⁶Ibid., p. 18

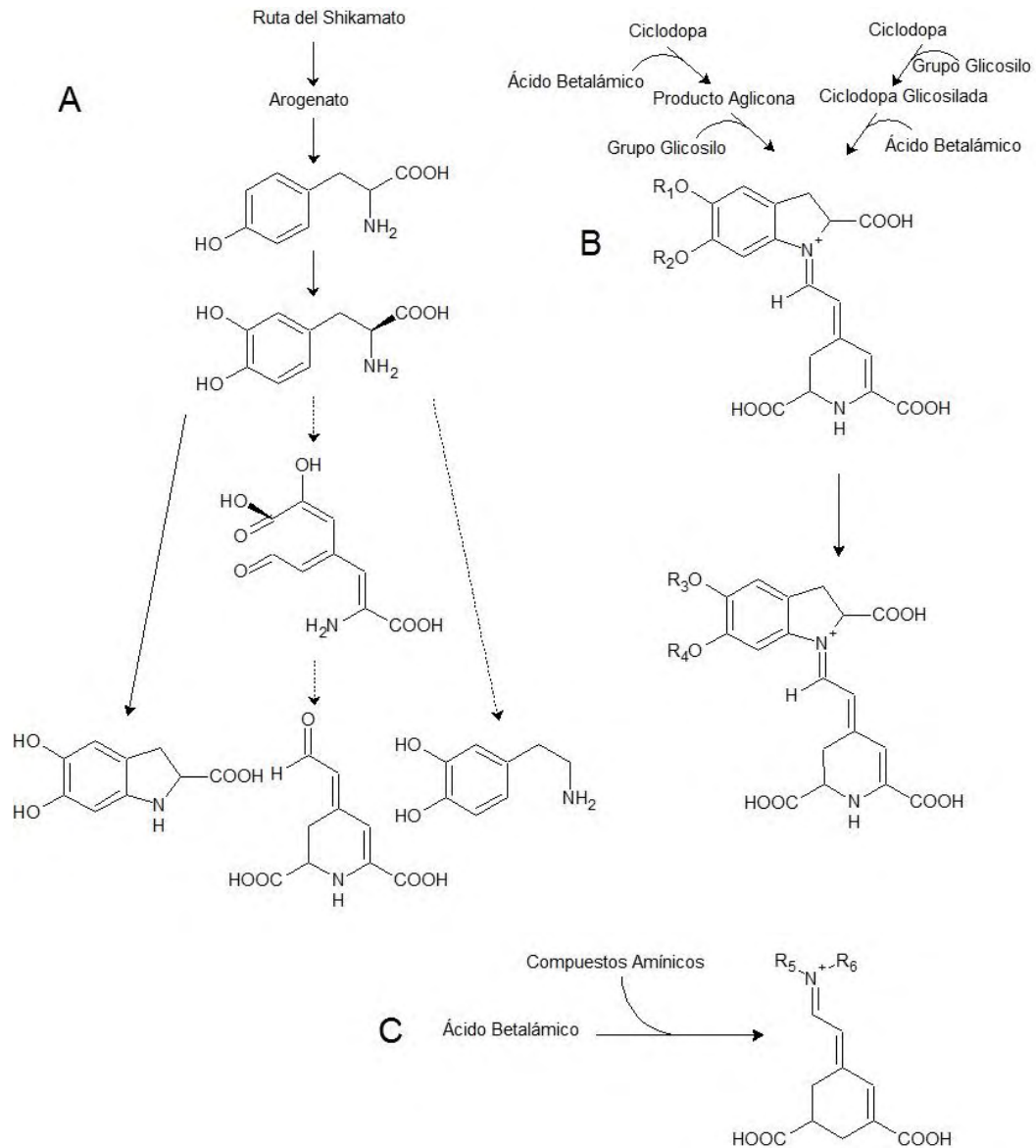
⁶⁷DELGADO-VARGAS. Op. Cit., p. 19

⁶⁸STRACK. Op. Cit., p. 18

⁶⁹ESATBEYOGLU, T., WAGNER, A.E., SCHINI-KERTH, V.B., RIMBACH, G. Betanin – a food colorant with biological activity. En: *Molecular Nutrition & Food Research*. 2015, Vol. 59, p. 36–47.

⁷⁰STINTZING, F. & CARLE, R. Op. Cit., p. 18

Figura 6 Las rutas biosintéticas que conducen a la formación de betalainas.



Fuente: Adaptado de Böhm⁷¹, 1988 y Strack, 1993⁷²

En comparación con los colorantes sintéticos, las betalainas no son tóxicas ni causan reacciones alérgicas^{73, 74, 75}. En contraste con las antocianinas estables a

⁷¹ BÖHM. Op. Cit., p. 31

⁷² STRACK. Op. Cit., p. 22

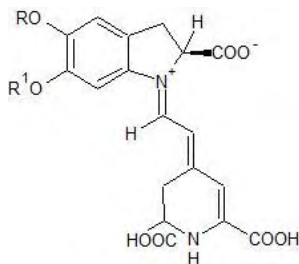
⁷³ SCHWARTZ, S.J., VON ELBE, J.H. Identification of betanin degradation products. En: Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung. 1983, Vol. 176, p. 448–453.

⁷⁴ SCHWARTZ, S.J., VON ELBE, J.H., PARIZA, M.W., GOLDSWORTHY, T., PITOT, H.C. Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. En: Food and Chemical Toxicology, 1983, Vol. 21, p. 531–535.

pH más ácido, el color de las betalaínas se mantiene en un amplio rango de pH de 3 a 7, lo que los hace una alternativa útil a las antocianinas para la coloración de productos alimenticios de baja acidez⁷⁶. Debido a que las betalaínas poseen coeficientes de extinción molares elevados, su poder de coloración es competitivo como colorantes⁷⁷. Debido a la diversidad estructural de las betacianinas rojo-violeta y las betaxantinas amarillo-naranja, una amplia gama de matices puede lograrse mezclando betalaínas individuales⁷⁸. Los colores rojo y violeta resultan de diferentes patrones de sustitución en las betacianinas, mientras que diferentes aminoácidos o aminas en las cadenas laterales determinan el color en las betaxantinas⁷⁹.

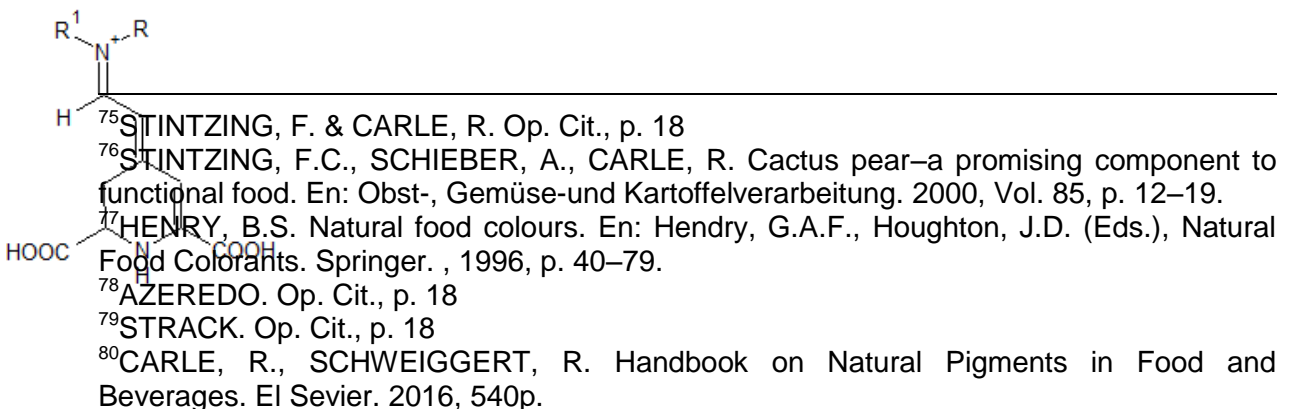
Figura 7 Principales betacianinas y betaxantinas presentes en plantas ricas en betalaínas.⁸⁰

(a) Principales betacianinas en fuentes ricas en betalaínas.



Compuesto	R	R ¹	Fuente
Amaratina	2-O-(β-glucuronic acid)-β-glucose	H	<i>Amaranthus tricolor</i> (Cai et al., 2005)
Betanina	β-glucose	H	<i>Beta vulgaris</i> , <i>Hylocereus polyrhizus</i> , <i>Chenopodium</i> (Stintzing et al., 2002; Kugler et al., 2004)
Hilocerena	5-O-methylglutaryl-β-glucoside	H	<i>Hylocereus polyrhizus</i> (Stintzing et al., 2002)
Filocantina	5-O-malonyl-β-glucoside	H	<i>Hylocereus polyrhizus</i> (Stintzing et al., 2002)

(b) Principales betaxantinas en fuentes ricas en betalaínas.



Fuente:
CARLE, R.,
SCHWEIGGE
RT, R.

Compuesto	R	R ¹	Fuente
Dopaxantina	H	I-Dopa	<i>Bougainvillea</i> sp. (Kugler et al., 2007)
Vulgaxantina I	H	Glutamina	<i>Beta vulgaris</i> (Stintzing et al., 2002b)
Indicaxantina	H	Proline	<i>Opuntia ficus-indica</i> (Stintzing et al., 2002b)

Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. El Sevier. 2016, 540p.

La fuente de betanina más significativa es la remolacha roja⁸¹, mientras que la fuente más común de las betaxantinas, como la vulgaxantina y la indicaxantina, son remolacha amarilla y los cactus, respectivamente^{82, 83, 84, 85}. Las principales fuentes de betalainas descritas en la literatura son *Amaranthus* sp.⁸⁶, *Celosia* sp.⁸⁷, *Gomphrena Globosa*^{88, 89}, *Opuntia ficus-indica*^{90, 91}, *Hylocereus* Spp.^{92, 93},

⁸¹ESATBEYOGLU. Op. Cit., p. 33

⁸²CASTELLANOS-SANTIAGO, E., YAHIA, E.M. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008, Vol. 56, p. 5758–5764.

⁸³CEJUDO-BASTANTE, M.J., CHAALAL, M., LOUAILECHE, H., PARRADO, J., HEREDIA, F.J. Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014, Vol. 62, p. 8491–8499.

⁸⁴GASZTONYI, M.N., DAOOD, H., HÁJOS, M.T., BIACS, P. 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, p. 932–933.

⁸⁵SUMAYA-MARTÍNEZ, M.T., CRUZ-JAIME, S., MADRIGAL-SANTILLÁN, E., GARCÍA-PAREDES, J.D., CARIÑOCORTÉS, R., CRUZ-CANSINO, N., VALADEZ-VEGA, C., MARTINEZ-CARDENAS, L., ALANÍS-GARCÍA, E. Betalain, acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. En: International Journal of Molecular Sciences. 2011, Vol. 12, p. 6452–6468.

⁸⁶CAI, Y.-Z., SUN, M., CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. En: Trends in Food Science & Technology, 2005, Vol. 16, p. 370–376.

⁸⁷SCHLIEMANN, W., CAI, Y., DEGENKOLB, T., SCHMIDT, J., CORKE, H. Betalains of *Celosia argentea*. En: Phytochemistry. 2001, Vol. 58, p. 159–165.

⁸⁸HEUER, S., WRAY, V., METZGER, J.W., STRACK, D. Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. En: Phytochemistry, 1992, Vol. 31, p. 1801–1807.

⁸⁹KUGLER. Op. Cit., p. 33

⁹⁰CASTELLANOS-SANTIAGO, E., YAHIA, E.M. Op. Cit., p. 36

*Portulaca Grandiflora*⁹⁴, *Bougainvillea sp.*⁹⁵, *Phytolacca Americana*⁹⁶, *Beta Vulgaris*⁹⁷ y *Chenopodium sp.*⁹⁸. Azeredo⁹⁹ (2009) presentó una extensa recopilación de plantas que son fuentes de Betalainas, incluyendo también estudios sobre la producción biotecnológica de betalainas, Que hasta ahora no se han considerado como una alternativa debido a los altos costes de producción.

3.5 Métodos de extracción de betalainas.

Para la extracción, las materias primas que contienen betalainas se trituran inicialmente o se maceran. Los pigmentos se pueden extraer posteriormente con agua; Sin embargo, en muchos casos, se requiere etanol (20-50%)¹⁰⁰. La estabilidad de los pigmentos a través de la extracción de agua se mejora mediante una ligera acidificación para evitar la oxidación y medios de polifenol oxidasas¹⁰¹. Además, la inactivación enzimática puede inhibir la degradación enzimática de betalainas¹⁰². Por otra parte, la degradación enzimática de los hidrocoloides puede mejorar los rendimientos de extracción^{103, 104}, y la fermentación es útil para aumentar los contenidos de betacianina mediante la reducción de azúcares

⁹¹STINTZING, F.C., SCHIEBER, A., CARLE, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. En: European Food Research and Technology, 2001, Vol. 212, p. 396–407.

⁹²ESQUIVEL, P., STINTZING, F.C., CARLE, R. Pigment pattern and expression of colour in fruits from different *Hylocereus sp.* genotypes. En: Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2007, Vol. 8, p. 451–457.

⁹³WYBRANIEC, S., MIZRAHI, Y. Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus cacti*. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002, Vol. 50, p. 6086–6089.

⁹⁴TREZZINI, G.F., ZRYD, J.-P. Two betalains from *Portulaca grandiflora*. En: Phytochemistry. 1991, Vol. 30, p. 1897–1899.

⁹⁵KUGLER. Op. Cit., p. 33

⁹⁶JERZ, G., SKOTZKI, T., FIEGE, K., WINTERHALTER, P., WYBRANIEC, S. Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. En: Journal of Chromatography A. 2008, Vol. 1190, p. 63–73.

⁹⁷GASZTONYI. Op. Cit., p. 36

⁹⁸TSAI, P.-J., SHEU, C.-H., WU, P.-H., SUN, Y.-F. Thermal and pH stability of betacyanin pigment of djulis (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and their relation to antioxidant activity. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010, Vol. 58, p. 1020–1025.

⁹⁹AZEREDO. Op. Cit., p. 18

¹⁰⁰DELGADO-VARGAS. Op. Cit., p. 19

¹⁰¹AZEREDO. Op. Cit., p. 18

¹⁰²DELGADO-VARGAS. Op. Cit., p. 19

¹⁰³MOßHAMMER, M.R., STINTZING, F.C., CARLE, R. Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus cacti* and betalain-containing model solutions derived therefrom. En: Food Research International. , 2005, Vol. 38, p. 975–981.

¹⁰⁴MOßHAMMER, M.R., STINTZING, F.C., CARLE, R. Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. En: Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2005, Vol. 6, p. 221–231.

libres¹⁰⁵. Se ha considerado que los tratamientos para mejorar la permeabilidad de las células, tales como campos eléctricos pulsados e irradiación gamma, mejoran los rendimientos de extracción de betalaínas¹⁰⁶.

MAE es una alternativa prometedora a las extracciones convencionales¹⁰⁷. MAE es una técnica novedosa y ambientalmente amigable de extracción, que puede ofrecer una alta reproducibilidad en un tiempo más corto, una manipulación simplificada, reduciendo el consumo de disolventes y un menor consumo de energía sin disminuir el rendimiento de extracción de la especie¹⁰⁸. Debido a estas ventajas, MAE se utiliza como una alternativa a la liberación de componentes bioactivos a partir de los recursos alimenticios. Más aún, la optimización de las variables de proceso en el MAE tales como la temperatura, la masa de la muestra y el tiempo de extracción, puede aumentar la eficacia del tratamiento, así como también crea la oportunidad de conocer el profundo mecanismo detrás de la técnica MAE¹⁰⁹.

TD implica la co-extracción de compuestos como azúcares y proteínas, por lo que se requieren procesos posteriores de purificación con técnicas en fase sólida y fase líquida como cromatografía en columna (CC), utilizando resinas como amberlita XAD-7¹¹⁰. Para la separación de betalaínas, en betaxantinas y betacianinas, se utiliza técnicas como cromatografía de columna (CC), y cromatografía en capa delgada (CCD). En CC, las fases estacionarias más usadas son resinas de intercambio iónico, sephadex, C₁₈ (figura 8). En CCD se usan soportes de celulosa¹¹¹.

¹⁰⁵POURRAT, A., LEJEUNE, B., GRAND, A., POURRAT, H. Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography. En: Journal of Food Science. 1988, Vol. 53, p. 294–295.

¹⁰⁶AZEREDO. Op. Cit., p. 18

¹⁰⁷ESKILSSON, C. & BJORKLUND. Op. Cit., p. 20

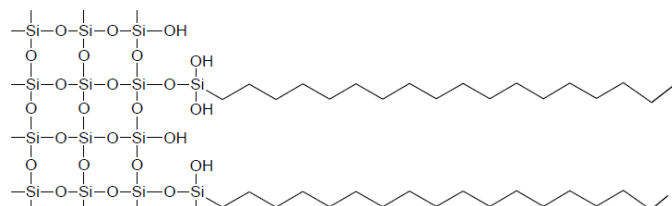
¹⁰⁸NACZK. Op. Cit., p. 20

¹⁰⁹JADHAV. Op. Cit., p. 20

¹¹⁰SANCHEZ GONZALEZ, N., *et al.* Extraction, Stability, and Separation of Betalains from *Opuntia joconostle* cv. Using Response Surface Methodology. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Noviembre, 2013, vol. 61, no. 49, p. 11995-12004.

¹¹¹DAVIES, K. Manual Plant Reviews. Plant Pigments and their Manipulation. Palmerston norte, John Wiley & Sons, 2009, Vol. 14, p. 328-331.

Figura 8 Estructura fase C-18



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

3.6 Método UV-Vis de detección de betalaínas.

El análisis de betalaínas, como el de otros compuestos coloreados, se ha basado en la espectroscopía UV-Vis, las betacianinas son conocidas por mostrar dos máximos de absorción, una en el rango UV entre 270 y 280 nm debido a la estructura ciclo-dopa y una segunda en el rango visible a aproximadamente a 535-538 nm dependiendo del sistema disolvente. La acilación con ácidos hidroxicinámicos produce un tercer máximo aproximadamente a 300-330 nm, mientras que los derivados de ácidos alifáticos no son distinguibles de sus correspondientes betacianinas glicosidados¹¹². Las betaxantinas amarillas tienen un máximo de absorción aproximadamente a 480 nm¹¹³.

3.7 Estabilidad de Betalaínas.

Herbach et al¹¹⁴. (2006) describieron vías de degradación de betalaínas específicas resultantes de diferentes condiciones de procesamiento y almacenamiento. Los autores también describieron los cambios cromáticos debido a la degradación y transformación. Algunas de las vías de degradación incluyen isomerización, desglicosilación, hidrólisis, descarboxilación y deshidrogenación. Alteraciones del color y cambios en el máximo de absorción resultantes de tales procesos de degradación.

3.8 Actividad Antioxidante de Betalaínas.

Los antioxidantes son compuestos que neutralizan químicamente productos activos del metabolismo, tales como radicales libres, que pueden causar daño al

¹¹²STINTZING, F., et al. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. En: Food and Chemical. Febrero, 2004, vol. 65, no. 4, p. 415-422.

¹¹³DELGADO-VARGAS. Op. Cit., p. 19

¹¹⁴HERBACH, K.M., STINTZING, F.C., CARLE, R. Betalain stability and degradation – structural and chromatic aspects. En: Journal of Food Science. 2006, Vol. 71, p. 41–R50.

cuerpo humano y seres vivos¹¹⁵. En los últimos años el interés de los investigadores se ha centrado en encontrar antioxidantes naturales que tengan el potencial para proteger al humano de los daños inducidos por el estrés oxidativo¹¹⁶, causado por los radicales libres, que dañan el ADN y otras macromoléculas, originando enfermedades degenerativas, lesiones malignas y la muerte eventual de células vitales.

Las betalaínas, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, es decir, pueden retrasar o inhibir significativamente la oxidación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RONS), los cuales poseen un electrón desapareado en el orbital externo de su estructura atómica, lo que hace que a nivel celular, tenga una alta reactividad frente a moléculas presentes en la célula, tales como: carbohidratos, lípidos, proteínas; comprometiendo en los seres humanos, la integridad del ADN y causando múltiples enfermedades degenerativas¹¹⁷. Los antioxidantes, por tanto, sirven como inhibidores del proceso corrosivo de la oxidación, protegiendo de esta manera a las células.

Una actividad antioxidante óptima proveniente de los polifenoles, se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado¹¹⁸. La presencia de sustituyentes voluminosos en los anillos, que inducen la donación de electrones, tiene dos efectos: aumenta la efectividad como antioxidantes de los compuestos fenólicos al disminuir la fuerza de los enlaces O-H y, por otro lado, el impedimento estérico generado por los sustituyentes en la región del radical, disminuye la velocidad de las reacciones de propagación en la que está implicado el propio radical fenoxilo, contribuyendo a su estabilización¹¹⁹.

Diferentes métodos se han desarrollado para determinar la actividad antioxidante in vitro en distintos tipos de extractos de origen natural donde están presentes antioxidantes que se ha visto inhiben la generación de sustancias cromógenas de naturaleza radical, y su efecto se analiza por espectroscopía UV-Vis, detectando la disminución en su concentración por efecto del antioxidante. Diferentes

¹¹⁵DELGADO, A. Betalaínas del fruto de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*): identificación, estabilidad y actividad antioxidante in vitro. Tesis pregrado. Universidad de Nariño. 2015

¹¹⁶LUQUE, M.; RÍOS, A., VALCÁRCEL, M. A poly (vinyl chloride) graphite composite electrode flow-injection amperometric determination of antioxidants. En: *Analytica Chimica Acta*. Agosto, 1999, vol. 395, no.1-2, p. 217–223

¹¹⁷KAHKONEN, M., HOPIA, A., HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol., 49. 2001. p. 4076–4082.

¹¹⁸KAPADIA, G., TOKUDA, H., SRIDHAR, R. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. En: *Cancer Letters*. 1998, Vol. 129, p. 87-95.

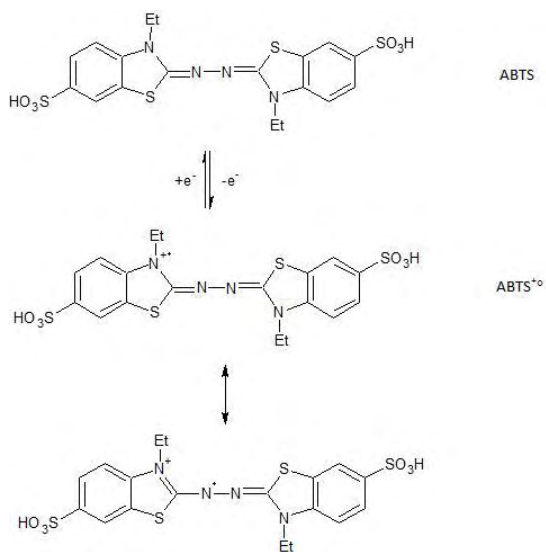
¹¹⁹PEREZ, M. Análisis químico, estabilidad y actividad biológica in vitro de la fracción de polifenoles del fruto de capulí (*Prunus serotina ehrh. var. capulí*). Tesis pregrado. Universidad de Nariño. 2013

compuestos radicales se emplean para ello a nivel in-vitro, entre los que se encuentra el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrahidrazil), DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina), DMPO (5,5-dimetilpirrolidinaN-óxido) y FRAP (reducción antioxidante férrico)¹²⁰.

3.8.1 Método TEAC.

Mediante este método se debe generar el radical ABTS mediante una reacción con dióxido de manganeso o persulfato de potasio (Figura 9). El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El catión radical ABTS^{•+} una vez generado, pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a longitudes de onda de 414, 645, 734 y 815 nm, pero se mide a una λ de 734 nm, ya que estaría próxima a la región infrarroja reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria¹²¹.

Figura 9 Formación del catión radical ABTS



Fuente: OSMAN, A. M.; WONG, K. y FERNYHOUGH, A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts.

¹²⁰KANELIS, A., MANGANARIS, G. Antioxidants and bioactive compounds in fruits. En: Fruit Ripening. Physiology, Signalling and Genomics. Boston, Cabi, 2014, 108 p.

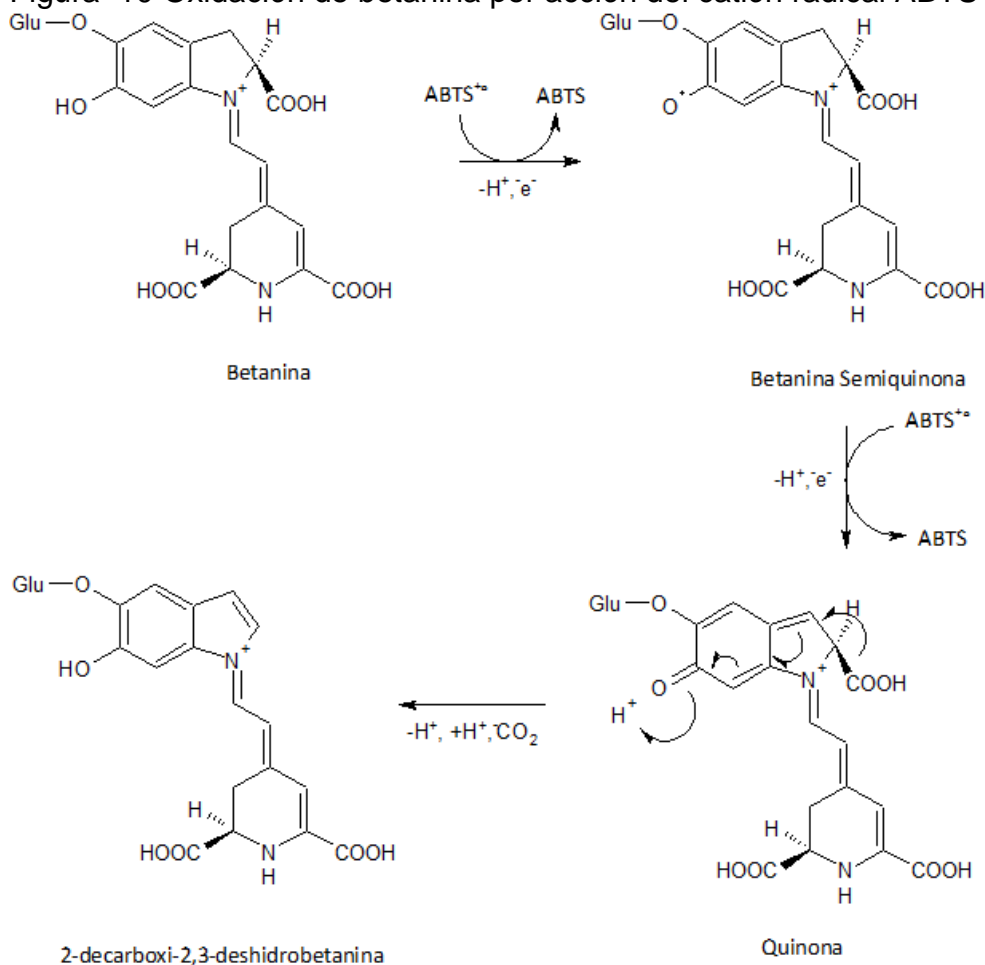
¹²¹SANTACRUZ CIFUENTES, L. Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de química, 2011, 33-34 p.

En: Biochemical and Biophysical Research Communications. Julio, 2006, vol. 346, no. 1, p. 321-329.

3.8.1.1 Oxidación de betalaínas por el radical ABTS.

Wybraniec¹²² propuso el primer mecanismo de oxidación para la betanina con el radical ABTS, sugiriendo que en la oxidación se forme una betanina semiquinona, la cual debe someterse a una posterior oxidación resultando un intermediario de quinona, cuyo reordenamiento da el producto de oxidación estable 2-decarboxi-2,3-dehidrobetanina (Figura 10).

Figura 10 Oxidación de betanina por acción del catión radical ABTS



¹²² WYBRANIEC, S., et al. Studies on Nonenzymatic Oxidation Mechanisms in Neobetain, Betanin, and Decarboxylated Betanins. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Junio, 2013, vol. 61, n. 26, p. 6465-6476.

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

3.9 Fenoles Totales

Existe un método desarrollado por Folin y Ciocalteu, basado en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Este método consiste en someter la muestra a la acción del reactivo de Folin- Ciocalteu el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Los compuestos fenólicos se reducen por transferencia de electrones a pH básico, generando una mezcla de óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), produciendo un espectro de absorción con una λ_{max} de 765nm, proporcional al contenido de fenoles en la muestra¹²³. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de fruta¹²⁴.

¹²³KUSKOSKI E., et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Revista de Ciencia y Tecnología. Octubre-Diciembre, 2005, vol. 25, no. 4, p. 726-732.

¹²⁴FOLIN, C., CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. En: J. Biol. Chem. 1927, Vol. 73, p. 627-650.

4. METODOLOGÍA

4.1 Equipos

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

- Microondas Panasonic NE-1846.
- Columna cromatográfica de 28 cm de largo por 2 cm de diámetro.
- Espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck. 300
- Micropipetas 50 – 100 μm y 100-1000 μm
- Refractómetro ATAGO # RS 500
- Rotaevaporador Heidolph, LABOROTA 4000-efficient.
- Vortex Mixer 120v labnet.

4.2 Recolección del material vegetal

El muestreo de *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta* se realizó en el mes de Julio de 2016, en el Cañón del Chicamocha, departamento de Santander, el cual se encuentra a una altura de 660 metros sobre el nivel del mar¹²⁵. El muestreo del fruto se realizó de forma aleatoria, tomando como referencia características visuales como color y tamaño. La plantas quedaron clasificadas por el herbario de la Universidad Nacional, con el código: 593529 y 595149 respectivamente. Figura 11.

Figura 11 Recolección vegetal.



Fuente: Este estudio.

¹²⁵ Cañón del Chicamocha, [Revisado 29 de enero de 2018]. Disponible en internet: <http://www.colparques.net/CHICAMOCHA>.

4.3 Preparación del Material Vegetal

Para obtener la muestra de trabajo, inicialmente se seleccionaron los frutos de acuerdo a su intensidad en el color. Para su procesamiento se utilizó el fruto completo, en la figura 12 y 13 se muestra los frutos de las especies *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta* respectivamente.

Figura 12 Fruto *Cereus Hexagonus*



Fuente: Este estudio.

Figura 13 Fruto *Opuntia Stricta*



Fuente: Este estudio.

4.4 Obtención del extracto crudo mediante técnica tradicional con disolventes

Siguiendo la metodología propuesta por Delgado-Vargas¹²⁶ se realizó la extracción de los pigmentos mediante el proceso de maceración química. Se utilizaron 90 g de cada uno de los frutos, se cortaron en trozos pequeños y posteriormente se adicionaron 50mL del disolvente (etanol 30%)¹²⁷ a 30°C. La muestra-solvente se mantuvo por tres horas y posteriormente se filtró y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Este proceso se realizó cuatro veces, hasta una decoloración total del fruto. Finalmente se recolectaron 200mL de cada extracto, se rotaevaporó el solvente y se secó el extracto a 40°C. (Figura 14).

Figura 14 Extracto Crudo



Fuente: Este estudio.

4.5 Ensayos Preliminares

Una vez aislado el extracto crudo de cada especie, se prepararon soluciones acuosas al 1.02% p/v y se sometieron a un cambio drástico de pH con gotas de NaOH 2M. También se midieron espectros UV-Vis en el rango de 200 a 700nm, en un espectrofotómetro Pharo Merk para cada uno de los extractos.

¹²⁶ DELGADO-VARGAS. Op. Cit., p. 19

¹²⁷ PIATELLI. Op. Cit. 32

4.6 Obtención extracto crudo mediante radiación de microondas

El tiempo de extracción varía entre 1, 4 y 10 minutos, mientras la potencia varía en el 10, 90 o 100% (H) de la potencia de salida del microondas utilizado (1100 watts).

La figura 15 muestra el montaje utilizado, el cual consta de un sistema de reflujo adaptado a un microondas con capacidad de variación de tiempo y potencia (marca Samsung).

Figura 15 Montaje MAE



Fuente: este estudio.

La irradiación de microondas se realizó con un Microondas casero marca Panasonic NE-1846; se realizó un diseño estadístico 3^2 variando la potencia del equipo y el tiempo de extracción, dejando constante la concentración de la muestra (10 g/ 30 ml de solvente), El esquema se muestra en la Figura 14. 10 g de cada fruta se irradiaron durante 1, 4, 10 minutos a potencias

de H (100), 10, 90 % de la potencia de salida del microondas utilizados (1100 w) con soluciones al 30% v/v de agua-etanol¹²⁸.

El modelo estadístico implementado se muestra en la figura 16.

Figura 16 Ecuación general diseño estadístico empleado

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_1 : Contenido de Betalainas.

i: irá de 1-3, siendo la variación en la potencia del microondas.

j: irá de 1-3, siendo la variación en los tiempos de extracción.

k: irá de 1-3, siendo el número de repeticiones del experimento.

4.7 Determinación del contenido de betalaínas

El contenido de betalaínas de los extractos crudos se determinó por el método espectrofotométrico¹²⁹. Se prepararon soluciones de concentración 0,19002 g/L de cada uno de los extractos crudos (TD y MAE), a partir de ésta se prepararon diluciones comprobando que la absorbancia esté en el rango óptimo para el análisis (< 1; > 0.8).

Para la determinación del contenido en betaxantinas y betacianinas se utilizó la siguiente ecuación $B(\text{mg/g}) = (A \times FD \times PM \times V) / (\epsilon \times m \times L)$, donde B es el contenido de betacianinas o betaxantinas, en mg/g, A es la absorbancia a 538 nm para betacianinas y 480 nm para betaxantinas, FD es el factor de dilución, PM es el peso molecular (Betanina = 550 g/mol e Indicaxantina = 308 g/mol), V es el volumen del extracto, ϵ es el coeficiente de extinción molar (Betanina = 60000 L/ mol.cm, e Indicaxantina = 48000 L/mol.cm) y L es la longitud de la celda (1 cm).

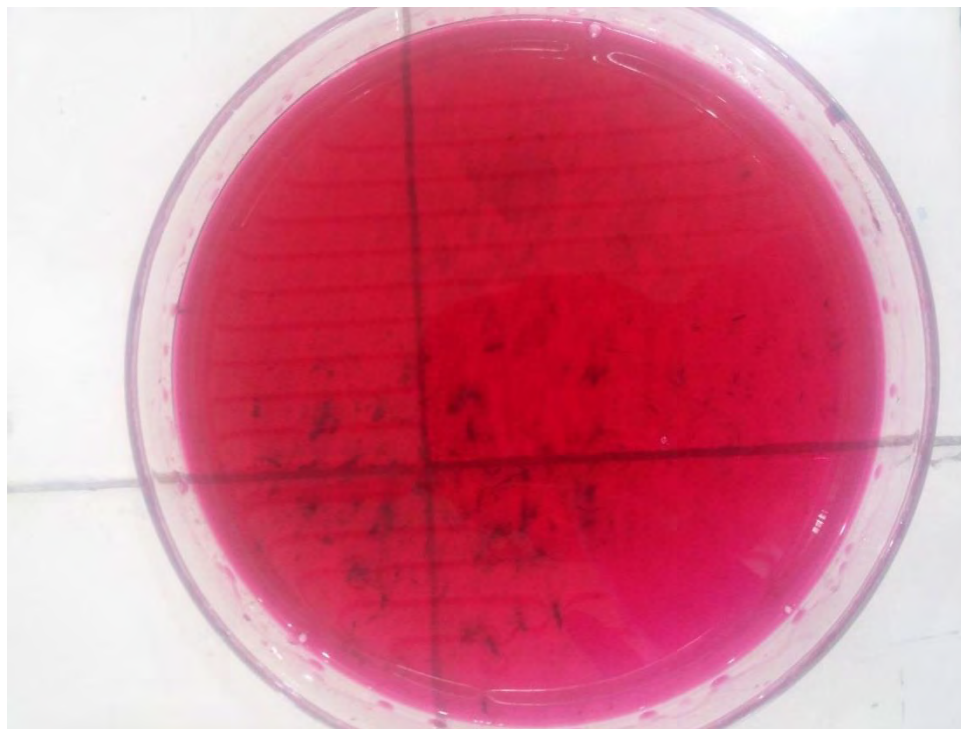
¹²⁸ RAVICHANDRAN, K. et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. En: Food Research International. Marzo, 2013, Vol. 50, p. 670 –675.

¹²⁹ STINTZING, F. & CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: Trends Food Science Technology. 2004, Vol. 15, p. 19 - 38.

4.8 Eliminación de hidrocoloides y proteínas

La eliminación de hidrocoloides y proteínas se realizó utilizando etanol al 96% en una proporción 2:1 etanol: extracto crudo a temperatura ambiente¹³⁰. 2g de cada extracto crudo seco se disolvieron en 4mL de agua tipo II, posteriormente se adicionó 8mL de etanol al 96% se agitó y se dejó reposar por 30 minutos; los mucilagos formados (figura 17) se separaron de la fase acuosa mediante filtración al vacío con papel filtro; el etanol se eliminó por rotaevaporación. Finalmente se llevó el extracto purificado (EP) a sequedad.

Figura 17 Mucilagos formados.



Fuente: esta estudio.

4.9 Separación de Betaxantinas y Betacianinas

Para la separación de la fracción roja y amarilla, se utilizó una columna cromatográfica de dimensiones 28 x 2 cm utilizando como fase estacionaria sílica C₁₈ (SIGMA). La activación de la resina se realizó pasando sobre la

¹³⁰ STINTZING, F; SCHIEBER, A; CARLE, R. Betacyanin in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyhizus* (Weber) Britton & Rose. En: Food. Chem. 2002, Vol.77 p.101–106.

columna tres volúmenes de metanol y posteriormente 3 volúmenes de agua tipo II acidificada con ácido fórmico (pH 3)¹³¹. Posteriormente 0.2g de cada extracto purificado se disolvieron en 1ml de agua tipo II, y se cargó la solución en la columna; el fraccionamiento de las dos clases de pigmentos se realizó con agua acidificada con ácido fórmico al 98% (pH 3) para obtener las fracciones ricas en betaxantinas (FRX, fracción amarilla) y luego la fracción rica en betacianinas (FRB, fracción roja) se eluyó con una mezcla de metanol:agua acidificada pH3 (95:5). Este procedimiento se realizó para los frutos de las dos variedades de cactus.

4.10 Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu¹³² para los extractos crudos (EC), extractos Puros (EP), la fracción rica en betacianinas (FRB) y la fracción rica en Betaxantinas (FRX) obtenidos de los frutos de las dos especies de cactus mediante las dos técnicas de extracción.

Siguiendo la metodología propuesta por Singleton & Rossi¹³³, los compuestos fenólicos fueron oxidados a fenolatos, por el reactivo Folin - Ciocalteu en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno - tungsteno de color azul; a 0,2 mL de muestra se les agregó 2,6 mL de agua tipo II seguida de 0,2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu dejando reaccionar la mezcla durante 6 minutos adicionando luego de ello 2 mL de Na₂CO₃ (7%) para un volumen final de 5mL, se dejó en reposo durante 90 minutos, posteriormente se leyó la absorbancia a 750 nm; la curva de calibración se realizó con ácido gálico en concentraciones de 10 a 200 ppm. La absorbancia final de cada muestra fue comparada con una curva estándar de ácido gálico. Cada medición se realizó por triplicado.

¹³¹ STINTZING, F; SCHIEBER, A; 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: *J. Agric. Food. Chem.* 2002. Vol. 50, p. 2302-2307.

¹³² FOLIN. Op. Cit. p. 43.

¹³³ SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. En: *Am. J. Enol. Viticult.* 1965. Vol. 16, p. 144-158.

4.11 Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó por la metodología propuesta por Peñarrieta en 2007¹³⁴ con algunas modificaciones, para los extractos crudos (EC), extractos Puros (EP), la fracción rica en betacianinas (FRB) y la fracción rica en Betaxantinas (FRX) de cada una de las especies mediante los dos métodos de extracción.

Para las muestras de estudio, en un tubo de ensayo se colocaron los reactivos en el siguiente orden 200 µL de muestra seguida de 800 µL de H₂O y 60 µL de NaNO₂ (10%), pasados 5 minutos, se adicionaron 60 µL de AlCl₃. 6 H₂O (20%) luego de 5 minutos se adicionaron 400 µL de NaOH (1M), se agitó y se dejó reaccionar durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 410 nm; la curva de calibración se realizó con catequina a concentraciones de 20 a 170 ppm, cada medición se realizó por triplicado.

4.12 Actividad Antioxidante

4.12.1 Método ABTS

El día del análisis la solución madre de ABTS se diluyó hasta una absorbancia entre los 0,800 a 0,900 a una longitud de onda de 734 nm. Se mezclaron 10 µL de cada muestra a analizar con 2 mL de ABTS (diluido) y se midió la absorbancia después de 6 minutos a 734 nm a 25 °C, la prueba se realiza por triplicado. El porcentaje de inhibición de las muestras, fueron comparadas con una curva de calibración de Trolox (20-200 µmol/L)¹³⁵.

¹³⁴ PEÑARRIETA J. M., ALVARADO J.A., ÅKESSON B., BERGENSTÅHL B. Total Antioxidant Capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds and in canihua (*Chenopodium pallidicaule*) an Andean pseudo-cereal. En: Molecular Nutrition and Food Research. 2008. Vol. 52, p. 708-717.

¹³⁵ Ibid., p. 51

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PIGMENTOS TIPO BETALAÍNA

5.1.1 Ensayos preliminares.

Una característica importante de los pigmentos betalaínicos es su espectro de absorción, el cual presenta una banda característica en la región visible, para betacianinas a 538 nm y para betaxantinas a 480 nm.

Características iniciales de los frutos.

5.1.1.1 *Cereus Hexagonus*

Las características del fruto de las dos especies se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Características Iniciales de los frutos.

Característica	Descripción	
	<i>Cereus Hexagonus</i>	<i>Opuntia Stricta</i>
Color	Fruto maduro presenta una cáscara magenta y pulpa de igual color	Fruto maduro presenta una cáscara rojizo y pulpa de igual color
Forma	Elipsoide de 4 y 6 cm de largo y 2,5 a 3 de ancho	Elipsoide de 1 y 3 cm de largo y 1 a 2 de ancho
Textura	Corteza firme y pulpa blanda.	Corteza firme y pulpa blanda.
pH	4,007 ± 0,035	5,250 ± 0,035
Azúcares	8°Brix	10°Brix

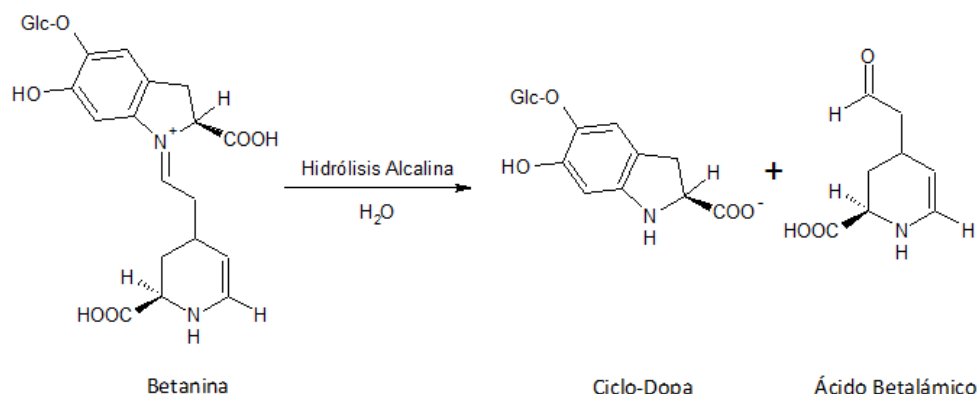
Fuente: este estudio.

5.1.2 Pruebas Preliminares

El cambio de pH de cada uno de los extractos crudos mediante la adición de gotas de NaOH (2M) a cada muestra, evidenció un cambio de color de fucsia para (*Cereus Hexagonus*) y rojizo (*Opuntia Stricta*) a amarillo comprobando la posible presencia de los pigmentos tipo betalaínas, de acuerdo a datos bibliográficos, se ha encontrado que a pH alcalino (9-11) ocurre una ruptura

de enlace aldimina obteniendo dos compuestos, uno de ácido betalámico (amarillo) y otro de ciclo Dopa 5-O-β-glucosido (incolore)¹³⁶ (figura 18)

Figura 18 Esquema del cambio estructural de betanina en medio básico.



Fuente: SING, O. Colorantes Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú, primera edición, octubre de 1997. 134 p.¹³⁷.

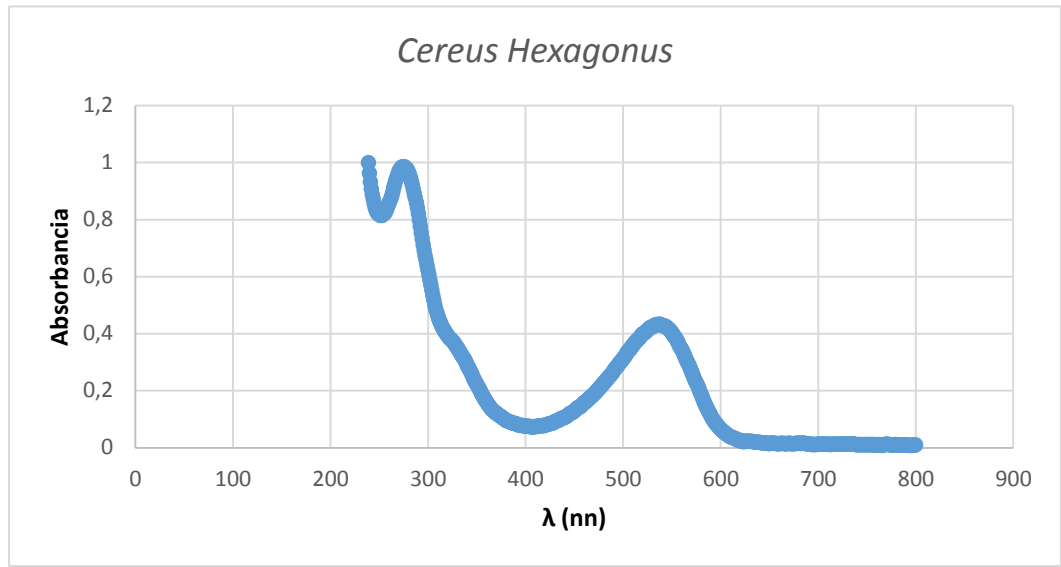
Mediante un proceso de extracción tradicional usando como disolvente etanol al 30%, se obtuvo 5,3 % p/p de extracto crudo, EC (g de extracto/100 g de fruto fresco para la variedad *Cereus Hexagonus* y 3,3 % p/p de EC para la especie *Opuntia Stricta*. Debido al alto contenido de azúcares presentes en las dos especies (8 – 10° Brix aproximadamente) y a la gran mucosidad, se realizó una posterior eliminación de hidrocoloides y proteínas, mediante el cambio en la polaridad del disolvente, obteniendo los extractos purificados (EP).

Para confirmar la presencia de betalainas y descartar la presencia de antocianinas, se tomó en cuenta una de las características espectroscópicas de este tipo de pigmentos: los espectros de absorción para los extractos crudos (EC) de *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta* se muestran en la figura 19 (a) y (b) respectivamente.

Figura 19 (a) Espectro de absorción *Cereus Hexagonus*

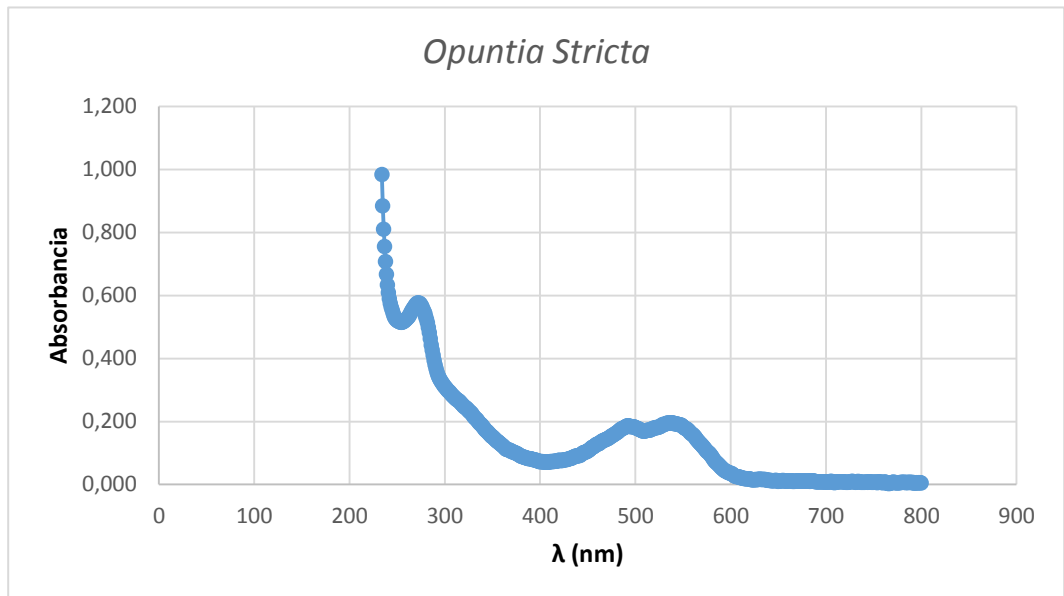
¹³⁶HERBACH, K., STINTZING, F., CARLE, R. Impact of thermal treatment on colour and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. J. Food. Sci. 2004. Vol. 69, p. C491–C498.

¹³⁷ SING, O. Colorantes Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú, primera edición, octubre de 1997. 134 p.



Fuente: este estudio.

(b) Espectro de absorción *Opuntia Stricta*.



Fuente: este estudio.

Los perfiles observados en la figura 18 muestran dos señales características, la primera a 280 nm en la región UV, y la segunda a 535 nm en la región visible, máximos de absorbancia característicos de las betalainas lo que confirma la presencia de las mismas. Piattelli (1976)¹³⁸

¹³⁸ PIATTELLI, M. Betalains. En: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments; Academic Press. 1976, New York: s.n, p. 564.

encontró que el pico de absorbancia aproximadamente a 280 nm al igual que la absorción en 535nm son características espectrales de las betacianinas glicosiladas, que se confirmó con la determinación del contenido de betacianinas; Una característica no observada en el espectro de la especie *Cereus Hexagonus* pero si en la especie *Opuntia Stricta* es un hombro característico a 470 nm correspondiente a la absorción máxima de las betaxantinas, esto se explica debido a que éstas pueden encontrarse en menor concentración en la especie *Cereus Hexagonus*.

5.2 Extracción pigmentos tipo betalaína.

5.2.1 Extracción de los pigmentos tipo Betalaína mediante técnica tradicional con disolventes.

La maceración química se realizó en 4 ciclos utilizando como disolvente etanol al 30%.

Inicialmente, el solvente penetra en la célula de la planta y expulsa el aire contenido en el citoplasma, dando así el inicio del proceso de extracción. La penetración del solvente en la célula induce un momento dipolar en las moléculas de los compuestos a extraer. Por lo tanto, las sustancias extraíbles se adhieren a moléculas de disolvente¹³⁹.

5.2.2 Extracción de los pigmentos tipo Betalaína mediante extracción asistida por microondas (MAE)

5.2.2.1 Especie *Cereus Hexagonus*

Para la extracción asistida por microondas se realizó un diseño experimental 3^2 teniendo como variables el tiempo y la potencia de extracción y como variable respuesta la cantidad de extracto crudo y la cuantificación de betalaínas totales (betaxantinas y betacianinas); cada experimento se realizó por triplicado.

5.3 Separación de betaxantinas y Betacianinas

La separación de los pigmentos tipo Betalaína se logró mediante el uso de las características de retención diferenciada de las betacianinas y las

¹³⁹ SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. 2000, Vol. 78, Convenio Andrés Bello.

betaxantinas debido a su diferente polaridad; para el fraccionamiento de los extractos fue necesario utilizar como eluyente agua acidificada (pH: 3) con ácido fórmico para separar la fracción amarilla (betaxantinas) de la roja (betacianinas); la fracción más retenida en la columna fue la roja, esta se eluyó con metanol:agua acidificada (95:5). (Ver figura 20). Se concluye así que la metodología utilizada fué eficiente para la separación de los compuestos amarillos de los rojos, además del lavado de azúcares como reporta Stintzing *et al.*, 2002.¹⁴⁰

Figura 20 Proceso de Fraccionamiento sobre C₁₈ para *Op. Stricta*.



Fuente: este estudio.

En el proceso de separación de las betacianinas y betaxantinas se obtuvieron para las betacianinas dos fracciones rojas (identificadas como fracción roja y fracción roja II, siendo la más retenida la fracción roja II. Es decir se aislaron dos fracciones de diferente peso molecular; cabe resaltar que las diferentes fracciones rojas aisladas fueron para el extracto puro de

¹⁴⁰ STINTZING, F., SCHIEBER, A., CARLE, R. (2002) Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. En: J. Agric. Food. Chem. 2002. Vol. 50, p. 2302 – 2307.

la especie *Cereus Hexagonus* obtenido mediante técnica tradicional con disolventes.

5.4 Determinación de Fenoles totales.

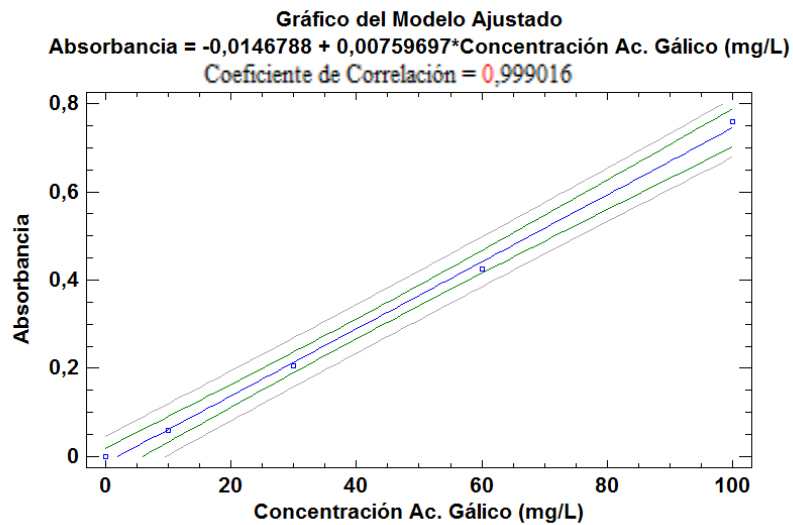
Para cuantificar los fenoles totales se construyó una curva de calibración (figura 21) utilizando como patrón ácido gálico en un intervalo de concentraciones de 10 - 100 ppm (tabla 4) siguiendo el método de Folin-Ciocalteu. Los análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 4 Absorbancias de ácido gálico mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Concentración de ácido gálico (mg/L)	Absorbancia (DS de tres resplicas)
5	0,059 ± 0,005
30	0,205 ± 0,008
60	0,424 ± 0,008
100	0,758 ± 0,016

Fuente: este estudio

Figura 21 Curva de calibración de Polifenoles Totales

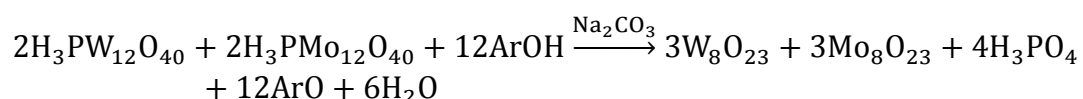


Fuente: este estudio

La figura 22 muestra la reacción implicada en el desarrollo de la coloración de este método; al someter la muestra a la acción del reactivo de Folin-Ciocalteu el cual está formado por mezcla de ácido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), los compuestos fenólicos

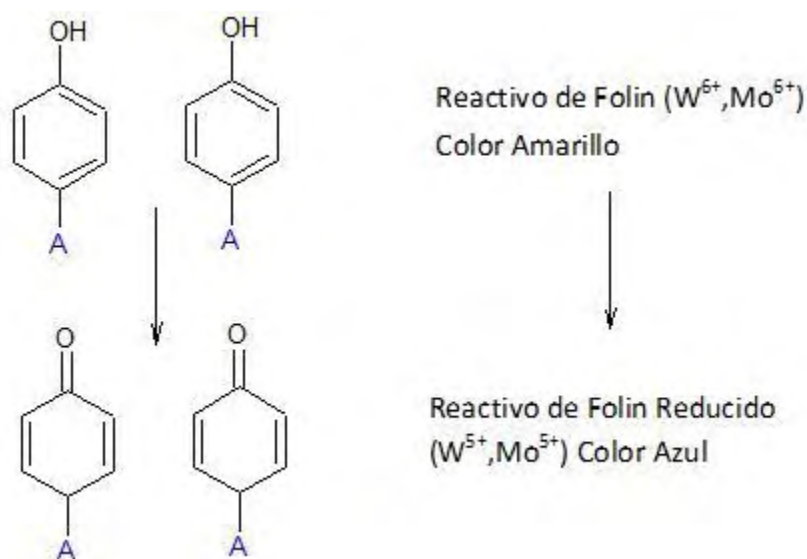
se reducen por transferencia de electrones a pH básico, generando una mezcla de óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), produciendo un espectro de absorción con una λ_{max} de 765nm, proporcional al contenido de fenoles en la muestra¹⁴¹

Figura 22 Reacción general de polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu.



Fuente: Aravena, S., Orthofer, V., Lamuela, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. En: Meth. Enzymol.1999. Vol. 299, p. 152–178.

Figura 23 Mecanismo de oxidación de polifenoles



Fuente: MARTÍNEZ, V., SEGOVIA, I., LÓPEZ, A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. Departamento de tecnología de alimentos. universitat politècnica de valència. 2015.

La intensidad del color azul observada para cada patrón es función de la cantidad de fenoles encontrados en cada una de ellas. Por medio de la ecuación de la recta y mediante interpolación se determinó el contenido de fenoles totales (CFT) de los extractos de las dos especies estudiadas y bajo las dos técnicas de extracción: extracto crudo (EC), extracto purificado (EP),

¹⁴¹ KUSKOSKI. Op. Cit. p. 43

y las fracciones de rojas (BC) y amarillas (BX). El coeficiente de correlación cercano a uno indica una confiable correlación de los datos obtenidos. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/ gramos de fruta fresca. La tabla 5 resume el CFT las distintas especies estudiadas y de los distintos métodos de extracción utilizados en esta investigación.

Tabla 5 CFT *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta*

Método extracción Especie*	TD		MAE	
	<i>Cereus Hexagonus</i>	<i>Opuntia Stricta</i>	<i>Cereus Hexagonus</i>	<i>Opuntia Stricta</i>
Fracción Amarilla	5,894 ± 0,331	3,582 ± 0,245	178,444 ± 4,990	28,498 ± 6,537
Fracción Roja	63,933 ± 6,827	12,899 ± 0,667	195,118 ± 2,821	138,948 ± 1,182
Fracción Roja II	85,974 ± 0,444	-	-	-
Extracto Puro	15,120 ± 0,044	11,957 ± 0,563	14,789 ± 0,610	8,683 ± 0,157
Extracto Crudo	38,714 ± 5,145	7,989 ± 0,033	16,142 ± 0,273	3,095 ± 0,097

*mg de ácido gálico / g de extracto seco. Datos ± DS de tres replicas

Fuente: este estudio

5.4.1 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CFT DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR TD

La tabla 6 resume el CFT, el valor promedio y su desviación estándar, de las diferentes muestras aisladas por TD del fruto de las dos especies de cactus

Tabla 6 Resumen estadístico para CFT - TD

MUESTRA	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	38,714	5,145
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	7,989	0,033
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	15,121	0,044
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	11,957	0,563
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	5,895	0,331
F. AMARILLA O. STRICTA	3	3,582	0,246
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	63,933	6,827
F. ROJA II C. HEXAGONUS	3	85,974	0,444
F. ROJA O. STRICTA	3	12,899	0,667
Total	27	27,340	28,316

Mediante la prueba F de los datos ANOVA se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido fenólico total entre los extractos aislados del fruto de las dos especies de cactus (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*), ya que el valor P es menor de 0.05 (a un nivel de

confianza del 95%). Para saber cuáles medias son significativamente diferentes de otras se usó la prueba de múltiples rangos el cual utiliza el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En la tabla 8 se observan seis grupos homogéneos (según la lineación de las Xs en las columnas). No existen diferencias significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de Xs. Es evidente que existe diferencia significativa entre el CFT de la fracción amarilla de *O. Stricta* (3,58 mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco) y la fracción roja (mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco) aislada de la misma especie, siendo la fracción roja quien presenta el mayor CFT (Tabla 5). Este comportamiento igualmente se observó para la especie *C. Hexagonus*, es decir la fracción roja (enriquecida en betacianinas) es quien presenta el mayor CFT. Es claro además que la fracción roja II aislada de la especie *C. Hexagonus* es la que presenta el mayor CFT (85,97 mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco) (Tabla 5). En *C. Hexagonus* también se destaca que existen diferencias estadísticamente significativas en el CFT entre los extractos crudo, puro, fracción amarilla y fracción roja de esta especie.

Tabla 7 ANOVA para el CFT de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante extracción tradicional (TD).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	20698,9	8	2587,37	313,78	0,0000
Intra grupos	148,423	18	8,24574		
Total (Corr.)	20847,4	26			

Tabla 8 Prueba de Múltiple Rangos para el CFT de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante extracción tradicional (TD).

MUESTRA	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F. AMARILLA O. STRICTA	3	3,582	X
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	5,895	X
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	7,989	XX
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	11,957	XX
F. ROJA O. STRICTA	3	12,899	XX
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	15,121	X
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	38,714	X
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	63,933	X
F. ROJA II C. HEXAGONUS	3	85,974	X

5.4.2 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CFT DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR MAE

La tabla 9 resume el CFT, el valor promedio y su desviación estándar, de las diferentes muestras aisladas por MAE del fruto de las dos especies de cactus.

Tabla 9 Resumen estadístico para CFT MAE

MUESTRA	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	16,142	1,22283	14,309
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	3,095	1,22283	1,262
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	14,789	1,22283	12,956
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	8,683	1,22283	6,849
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	178,444	1,22283	176,611
F. AMARILLA O. STRICTA	3	25,165	1,22283	23,332
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	195,118	1,22283	193,285
F. ROJA O. STRICTA	3	138,948	1,22283	137,115
Total	24	72,548		

Tabla 10 ANOVA para el CFT de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante MAE.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	144935,	7	20705,0	4615,53	0,0000
Intra grupos	71,775	16	4,48594		
Total (Corr.)	145007,	23			

Igualmente mediante la prueba F de los datos ANOVA (Tabla 10) se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido fenólico total entre los extractos aislados por MAE del fruto de las dos especies de cactus (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*), ya que el valor P es menor de 0.05 (a un nivel de confianza del 95%). Para saber cuáles medias son significativamente diferentes de otras se usó la prueba de múltiples rangos que utiliza el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En la tabla 11 se observan siete grupos homogéneos. No existen diferencias significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de Xs. Como lo observado para las dos especies por el método de extracción tradicional, con el método de extracción por microondas (MAE) también se observan diferencias estadísticamente significativas en el CFT entre la fracción roja y la fracción amarilla para las dos especies, sin embargo, se destaca que por el método MAE la cantidad de fenoles (CFT) que se extraen es mayor (Tabla 5). En este caso, también la fracción roja de la especie *C. Hexagonus* es quien mayor CFT presenta (195,12 mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco). Igualmente se observa en los extractos aislados de las dos especies que existen diferencias significativas en el CFT al comparar la mayoría de las

muestras (Extracto crudo, puro, fracción roja y fracción amarilla), exceptuando el CFT del extracto puro y crudo de la especie *C. Hexagonus* (Tabla 5).

Finalmente, mediante una comparación estadística de las medias del CFT de los extractos aislados por los dos métodos de extracción (TD y MAE) se puede concluir no solo que el mejor método de extracción de los polifenoles de los frutos de las dos variedades de Cactáceas es el MAE, sino también que la especie *C. Hexagonus* es quien tiene el mayor contenido de este tipo de compuestos. Adicionalmente, la fracción roja (enriquecida en betacianinas), en las dos especies, es la de mayor contenido fenólico.

Tabla 11 Prueba de Múltiple Rangos para el CFT de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante extracción MAE, con intervalos de confianza del 95%.

MUESTRA	Casos	Media	Grupos Homogéneos
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	3,09533	X
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	8,683	X
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	14,7887	X
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	16,142	X
F. AMARILLA O. STRICTA	3	25,1647	X
F. ROJA O. STRICTA	3	138,948	X
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	178,444	X
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	195,118	X

Se comparó los resultados obtenidos (tabla 12) con respecto a algunos reportes bibliográficos, en cuanto a unidades de mg de ácido gálico/ 100 g de fruto fresco, con las mismas condiciones metodológicas.

Tabla 12 Comparación del contenido fenólico.

Especie/variedad	Contenido Fenólico*	Fuente
<i>Cereus Hexagonus</i> TD	235,510	Este estudio.
<i>Cereus Hexagonus</i> MAE	72,180	Este estudio.
<i>Opuntia Stricta</i> TD	62,885	Este estudio.
<i>Opuntia Stricta</i> MAE	25,173	Este estudio.
<i>H. Polyrhizuz</i>	15,92	Wee & Wee ¹⁴²
<i>H. Undatus</i>	20,14	Wee & Wee ¹⁴³
<i>Opuntia Ficus-indica</i>	218,8	Fernández, et al ¹⁴⁴

¹⁴² WEE, S., WEE, K. Antioxidant properties of two species of Hylocereus fruits. En: Adv. Appl. Sci. Res. 2011, vol. 2, no. 3, p. 418-425.

¹⁴³ Ibid., p. 62.

¹⁴⁴ FERNÁNDEZ LÓPEZ, J., et al. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. En: Plant Foods for Human Nutrition. Septiembre, 2010, vol. 65, no. 3, p. 253-259.

<i>Opuntia Undulata</i>	164,6	Fernández, et al ¹⁴⁵
-------------------------	-------	---------------------------------

*mg ácido gálico/100 g de fruto fresco

Fuente: Este estudio.

Al comparar la cantidad de fenoles en 100 g de fruto, se observa que los frutos analizados tienen mayor contenido que especies como la *H. Polyrhizuz* y *H. Undatus*, pero menor que otros frutos como: *Opuntia Ficus-indica* (218,8) y *Opuntia Undulata* (164,6); se observa que al utilizar TD, la especie *Cereus Hexagonus* posee un mayor CFT que las especies mencionadas; Es evidente también que, MAE muestra un alto valor en el contenido de fenoles totales; esta diferencia en CFT fue muy probablemente debido a que por MAE se extraen selectivamente otro tipo de componentes que no aportan al contenido fenólico. Sin embargo, como se observa más adelante el extracto obtenido por MAE de la especie *Cereus Hexagonus* es la que presenta el mayor contenido en betalaínas totales.

5.5 Cuantificación de Betalaínas totales.

El contenido de betacianinas y betaxantinas se cuantificó mediante la metodología descrita anteriormente (apartado 4,7), registrando la absorbancia de los extractos de betacianinas a 538nm y el de las betaxantinas a 480 nm. La tabla 13 muestra las absorbancias promedio registradas para los extractos crudos de las especies *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta* respectivamente extraídos mediante TD y MAE.

¹⁴⁵ Ibid., p. 63..

Tabla 13 Contenido de betalaínas para extractos crudos obtenidos por TD y MAE

	TD				MAE			
	<i>Cereus Hexagonus</i>		<i>Opuntia Stricta</i>		<i>Cereus Hexagonus</i>		<i>Opuntia Stricta</i>	
	Betacianinas ^a	Betaxantinas ^b	Betacianinas ^a	Betaxantinas ^b	Betacianinas ^a	Betaxantinas ^b	Betacianinas ^a	Betaxantinas ^b
Contenido	17,542 ± 0,296	5,181 ± 0,217	3,079 ± 0,004	3,961 ± 0,038	20,576 ± 0,541	16,445 ± 0,274	5,776 ± 0,035	6,748 ± 0,017
Betalaínas Totales^c	22,723 ± 0,0081		7,040 ± 0,042		37,021 ± 0,319		12,524 ± 0,052	

^a mg de betanina /100g fruto fresco, ^b mg de Indicaxantina/100g de fruto fresco, ^c betaninas + Indicaxantina. *Datos con ± DS de tres réplicas.

Fuente: este estudio.

Figura 24 Fruto *Opuntia Stricta* antes y después de la extracción de los pigmentos tipo Betalaína (90% - 10 minutos)



Fuente: este estudio.

Con los resultados en la tabla 13 se observa que el extracto crudo de la especie *Cereus Hexagonus* es más rico en betacianinas (pigmentos de color rojo) que en betaxantinas (pigmentos de color amarillo), lo que está en concordancia con el color de la pulpa y el epicarpio del fruto; por otra parte, se observa que el extracto crudo de la especie *Opuntia Stricta* tiene una concentración similar entre betacianinas y betaxantinas (pigmentos de color amarillo) lo cual le daría su característico color rojizo a la cascara y a la pulpa del fruto.

Tabla 14 ANOVA Cuantificación de betalaínas *C. Hexagonus* y *O. Stricta* TD

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	414,826	3	138,275	4061,99	0,0000
Intra grupos	0,272	8	0,034		
Total (Corr.)	415,098	11			

Tabla 15 Prueba de múltiples rangos para betacianinas y betaxantinas

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Betacianinas <i>Opuntia Stricta</i>	3	3,079	X
Betaxantinas <i>Opuntia Stricta</i>	3	3,961	X
Betaxantinas <i>Cereus Hexagonus</i>	3	5,181	X
Betacianinas <i>Cereus Hexagonus</i>	3	17,542	X

Se realizó la prueba de múltiples rangos para encontrar los extractos con diferencias estadísticamente significativas, observando que ninguno de los valores obtenidos es homogéneo entre sí (tabla 15).

Los datos obtenidos se compararon con algunas especies estudiadas en la literatura (tabla 19), la diferencia entre estos valores se debe a variaciones metodológicas (TD y MAE) en la obtención de los extractos. Se Puede apreciar que el contenido de betacianina de la especie *Cereus Hexagonus*, usando la maceración química está en concordancia con la especie *O. Undulata* (18,5 mg / 100 g de fruta fresca) y *O. Ficus-indica* (14,5 mg / 100 g de fruta fresca)¹⁴⁶; sin embargo la concentración de betalaínas hallada en la especie *Opuntia Stricta* es baja y no comparables con el contenido publicado para las demás especies. Así, los frutos de cactus podrían representar una fuente prometedora de colorantes naturales y viables para considerarse una explotación industrial.

¹⁴⁶ FERNÁNDEZ LÓPEZ, J., et al. Screening and Mass-Spectral Confirmation of Betalains in Cactus Pears. En: Chromatographia. Septiembre. 2002 vol. 56, p. 591-595.

Por otra parte, en comparación con la remolacha roja como fuente de este tipo de pigmentos, se conoce que los frutos de cactus ofrecen algunas ventajas tecnológicas y sensoriales como la variabilidad estructural de betacianinas¹⁴⁷.

Siguiendo la metodología propuesta se realizó la cuantificación de betacianinas y betaxantinas para cada extracto crudo obtenido mediante MAE para así hallar las mejores condiciones de extracción para este tipo de compuestos a partir de los frutos de cactus.

Las mejores condiciones para la extracción de betalaínas (betaxantinas y betacianinas) son a los 10 minutos y 90% de potencia de salida; mostrando un mayor contenido de betalaínas que en las demás condiciones; una vez obtenido este extracto se realizó su purificación y fraccionamiento de la misma forma como se hizo para los extractos obtenidos mediante TD; Por otra parte, las condiciones que reportan una menor extracción de pigmentos tipo betalaína son a 1 minuto de extracción con 10% de la potencia de salida del equipo; es evidente como el tiempo de extracción influye en la cantidad de betalaínas extraídas en la especie, el mayor tiempo de irradiación de microondas, ayuda a la extracción de este tipo de compuestos.

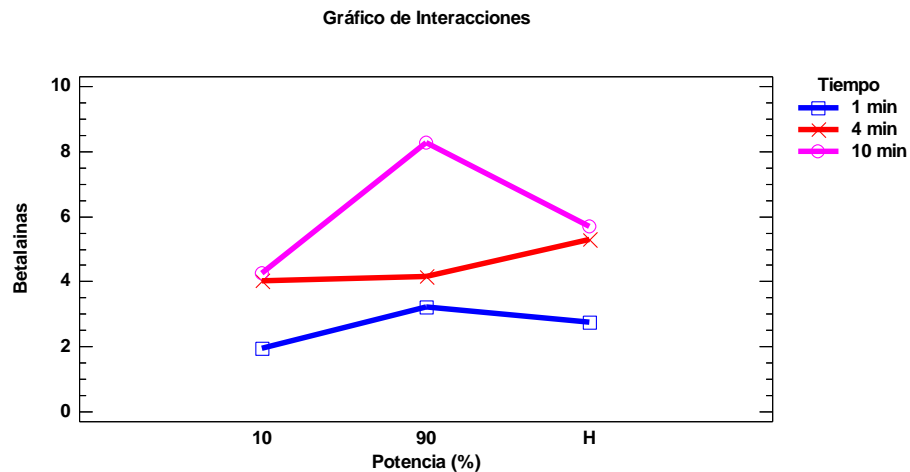
Como lo muestra la figura 25, el grafico de interacción entre los datos de cuantificación de Betalaínas, y los factores: tiempo y potencia, es claro que la mejor combinación de ellos es 90% de potencia de salida y 10 minutos de tiempo de extracción; El tiempo de extracción es un factor clave para determinar la eficacia del proceso MAE para la extracción de betalaínas. Para evaluar su efecto, los experimentos se realizaron a varios tiempos de extracción (1, 4, 10 min). A partir de los resultados (tabla16), se encuentra que el contenido de betalaínas se incrementa con un tiempo de extracción creciente hasta 10 minutos. Este fenómeno podría explicarse por el hecho de que, en etapas iniciales, la irradiación de microondas promovió la acumulación térmica de la mezcla de reacción que conduce a la disolución efectiva de Betalaínas. A partir de entonces, hay un efecto insignificante del tiempo de extracción en el proceso de MAE¹⁴⁸.

¹⁴⁷ STINTZING, F., SCHIEBER, A., CARLE, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. En: European Food Research and Technology. 2002. Vol. 212, p. 396 – 407.

¹⁴⁸ THIRUGNANASAMBANDHAM. Op. Cit. p. 23

La principal desventaja en el procesamiento térmico incluye la degradación de betalaínas a altas temperaturas¹⁴⁹. Este estudio con microondas ha demostrado que hubo un aumento en el contenido de betalaínas en condiciones de tratamiento más altas con irradiaciones de microondas. Este resultado estuvo de acuerdo con el resultado de Harivaindaran ¹⁵⁰ en 2008 de que, a medida que aumenta la temperatura, aumentaba el rendimiento del contenido de betalaínas.

Figura 25 Grafico de Interacciones Diseño Experimental MAE.



Fuente: Este Estudio.

La tabla 17, da a conocer la ANOVA de las betalaínas de MAE, en donde es posible observar el valor $p < 0,05$ indicando diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos (tabla16); Los resultados de la prueba de múltiples rangos (tabla 18) que permite establecer cuáles medias son estadísticamente independientes, para la condición potencia de 90 % y 10 minutos de extracción (en la cual se obtuvo mayor contenido de betalaínas), existe una diferencia estadísticamente significativa con las demás muestras. Es evidente además que no existen diferencias

¹⁴⁹ BARRERA, F., REYNOSO, C., MEJÍA., E. Estabilidad de betalaínas extraídas del garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*). En: Food Science and Technology International. 1998. Vol. 4, p. 115–120.

¹⁵⁰ HARIVAINDARAN, K. V., REBECCA, O., CHANDRAN, S. Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. En: Pakistan Journal of Biological Sciences. 2008. Vol. 11(18), p. 2259–2263.

estadísticas entre las condiciones 10-4 (4,002 mg/g) y 90-4 (4,192 mg/g) como también entre 90-4 y 10-10 (4,294 mg/g).

Tabla 16 Resumen Estadístico del diseño experimental MAE.

			<i>Error Est.</i>		
	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
1	3	2,722	0,0726	2,614	2,829
2	3	1,923	0,0726	1,815	2,031
3	3	3,190	0,0726	3,082	3,298
4	3	5,272	0,0726	5,164	5,379
5	3	4,002	0,0726	3,894	4,109
6	3	4,142	0,0726	4,034	4,249
7	3	5,695	0,0726	5,587	5,803
8	3	4,244	0,0726	4,136	4,352
9	3	8,280	0,0726	8,172	8,388
Total	27	4,386			

Tabla 17 Tabla ANOVA Diseño experimental MAE.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	84,4636	8	10,558	668,17	0,0000
Intra grupos	0,284422	18	0,0158012		
Total (Corr.)	84,7481	26			

Tabla 18 Prueba de Múltiples rangos Diseño experimental MAE.

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10 – 1	3	1,923	X
H – 1	3	2,722	X
90 – 1	3	3,19	X
10 – 4	3	4,002	X
90 – 4	3	4,142	XX
10 – 10	3	4,244	X
H – 4	3	5,272	X
H - 10	3	5,695	X
90 – 10	3	8,28	X

Una vez se obtuvo las mejores condiciones de extracción para la especie *Cereus Hexagonus*, se mantuvo las mismas condiciones para la especie *Opuntia Stricta* logrando una extracción rápida y una decoloración completa del fruto como lo muestra la figura 23.

En la tabla 19 se presenta el contenido de betacianinas de los frutos en estudio en comparación con el contenido de betacianinas en otros tipos de cactáceas expresado en mg de betanina/ 100 g de fruto fresco.

Tabla 19 Comparación en el contenido de betacianinas entre diferentes especies o variedades.

Especie/Variedad	Betacianinas (mg/100 g Fruto Fresco)	Metodología de extracción	Fuente
<i>Cereus Hexagonus</i>	17,542	TD (etanol 30%)	Este Estudio
<i>Opuntia Stricta</i>	3,079	TD (etanol 30%)	Este Estudio
<i>Cereus Hexagonus</i>	20,576	MAE	Este Estudio
<i>Opuntia Stricta</i>	5,776	MAE	Este Estudio
<i>O. Undulata</i>	18,500	TD (H ₂ O)	Fernandez, et al. 2002 ¹⁵¹
<i>O. Ficus-indica</i>	14,500	TD (H ₂ O)	Fernandez, et al. 2002 ¹⁵²

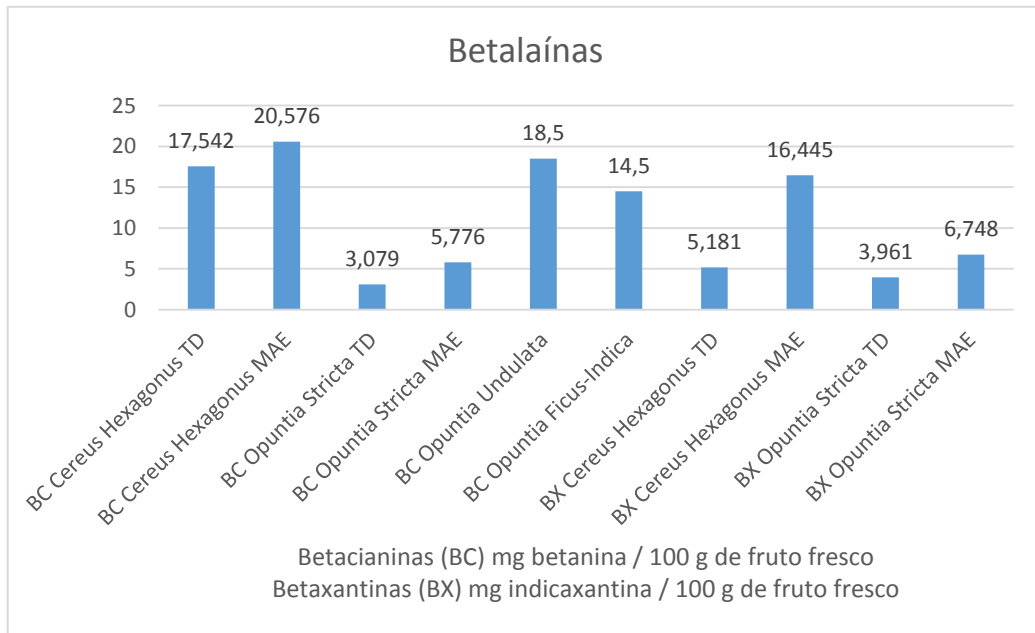
Fuente: este estudio

Se destaca que, los valores reportados en bibliografía son obtenidos con modificaciones en las metodologías de extracción, MAE es una técnica novedosa y de fácil aplicación la cual aumenta en aproximadamente 20% la extracción de los pigmentos tipo betacianina, en las distintas especies de cactus trabajadas en esta investigación; además, es posible observar como la especie *Cereus Hexagonus* es una fuente promisoras de este tipo de pigmentos, debido a su alta concentración y fácil extracción mediante los distintos métodos utilizados.

¹⁵¹ FERNÁNDEZ LÓPEZ. Op. Cit. p. 65.

¹⁵² FERNÁNDEZ LÓPEZ. Op. Cit. p. 65.

Figura 26 Contenido de betacianinas y betaxantina para las dos especies en estudio con respecto a datos bibliográficos de otras especies.



Fuente: este estudio.

Los resultados muestran (Figura 26) que es mayor la eficiencia de extracción de las betalaínas al utilizar la técnica MAE que al utilizar TD. El análisis de los datos permite establecer que el contenido de betalaínas del extracto obtenido del fruto de la especie *Cereus Hexagonus* por MAE es mayor que el obtenido para otras especies utilizando TD.

En la figura 26 se puede observar una mayor eficiencia de extracción tanto de las betacianinas como de las betaxantinas cuando se utiliza la técnica MAE. Se puede establecer además que especie *Cereus Hexagonus* está más enriquecida en betacianinas y la especie *Opuntia Stricta* en betaxantinas.

Con el fin de establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias del contenido de betalaínas totales (betacianinas y betaxantinas), se realizó la prueba de múltiples rangos para las dos especies (Tabla 20 y 21). Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, es posible observar la formación de dos grupos homogéneos, es decir, la cantidad de betalaínas extraídas mediante MAE y TD para las especies *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta* poseen diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Tabla 20 Pruebas de Múltiples Rangos Para la especie *Cereus Hexagonus*.

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Betalaínas TD	3	22,723	x
Betalaínas MAE	3	37,021	x

Tabla 21 Pruebas de Múltiples Rangos Para la especie *Opuntia Stricta*.

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Betalaínas TD	3	7,04	x
Betalaínas MAE	3	12,524	x

Además, como se puede observar, la extracción asistida con microondas aumentó aproximadamente en un 43% la cantidad de betalaínas presentes en el extracto crudo para ambas especies, reduciendo la cantidad de disolvente utilizado así como el tiempo de extracción necesario para una decoloración total del fruto.

5.6 Determinación de Flavonoides

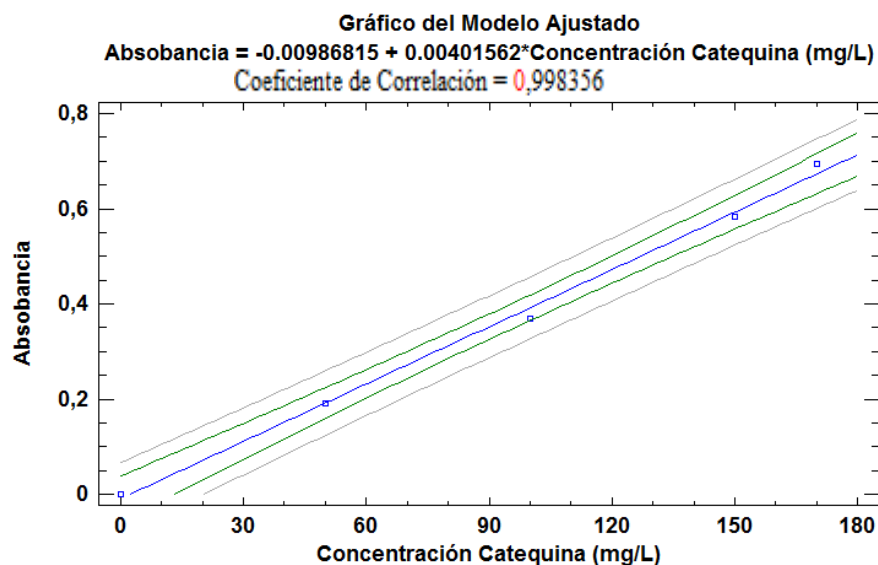
Para cuantificar los flavonoides totales se construyó una curva de calibración (figura 27) utilizando como patrón catequina en un intervalo de concentraciones de 50 - 170 ppm (tabla 22) siguiendo el método descrito en el apartado de metodología (4,11). Los análisis se realizaron por triplicado.

Tabla 22 Absorbancias de catequina.

Concentración de catequina (mg/L)	Absorbancia (\pm DS de tres replicas)
50	0,191 \pm 0,037
100	0,370 \pm 0,032
150	0,584 \pm 0,052
170	0,693 \pm 0,021

Fuente: este estudio

Figura 27 Curva de calibración de Flavonoides.



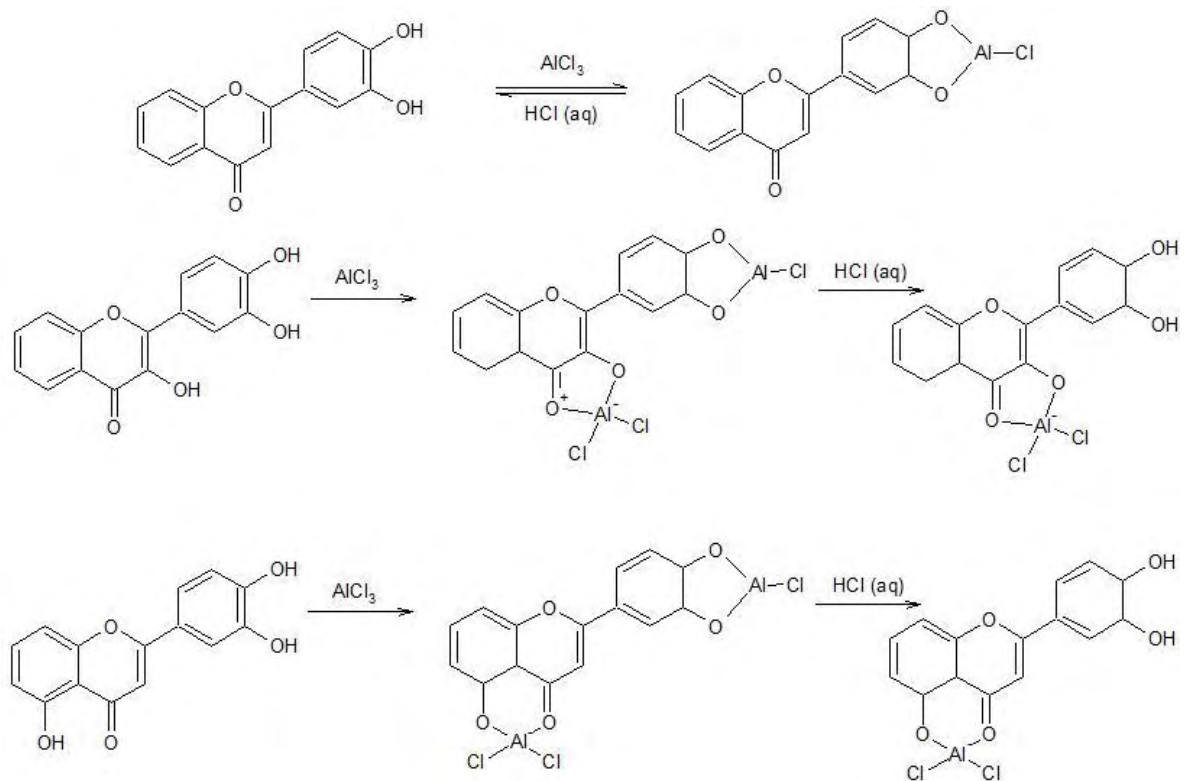
Fuente: este estudio

La fundamentación de algunas técnicas espectroscópicas para la determinación del contenido de flavonoides en determinadas matrices está relacionada con la capacidad de formación de diferentes complejos con dicho tipo de compuestos¹⁵³; El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol, que producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales¹⁵⁴.

¹⁵³ PEKAL A., PYRZYNSKA K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. En: Food Analytical Methods. 2014. Vol. 7, p. 1776 – 1782.

¹⁵⁴ ULUBELEN A., TOPCU G., KOLAK U. Labiatae flavonoids and their bioactivity. En: Studies in Natural Products Chemistry. 2005. Vol. 30, p. 233-302.

Figura 28 Reacción general Flavonoides con AlCl_3



Fuente: ULUBELEN A, TOPCU G, KOLAK U. Labiatae flavonoids and their bioactiviy. En: Studies in Natural Products Chemistry. 2005. Vol. 30, p. 233-302.

La intensidad del color rojo observada para cada patrón es función de la cantidad de flavonoides encontrados en cada una de ellas. Por medio de la ecuación de la recta se obtuvo el contenido de flavonoides de los extractos evaluados de las dos especies estudiadas mediante los dos métodos de extracción utilizados: extracto crudo, extracto purificado, y las fracciones roja y amarilla. El coeficiente de correlación cercano a uno indica una buena linealidad de los datos obtenidos. Los resultados se expresaron en mg de catequina/ gramos de extracto seco.

La tabla 23 resume el CF las distintas especies estudiadas y de los distintos métodos de extracción utilizados en esta investigación.

Tabla 23 CF para las especies *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta*

Método extracción	TD		MAE	
	<i>Cereus Hexagonus</i>	<i>Opuntia Stricta</i>	<i>Cereus Hexagonus</i>	<i>Opuntia Stricta</i>
Fracción Amarilla	10,291 ± 0,830	2,603 ± 0,014	191,809 ± 3,456	122,516 ± 1,611
Fracción Roja	96,011 ± 0,156	3,886 ± 0,041	169,673 ± 2,536	31,471 ± 0,783
Fracción Roja II	8,278 ± 0,551	-	-	-
Extracto Puro	14,362 ± 0,906	6,876 ± 0,150	13,946 ± 0,933	5,773 ± 0,254
Extracto Crudo	42,924 ± 0,528	6,415 ± 0,110	14,112 ± 0,639	2,998 ± 0,314

*mg de ácido gálico / g de extracto seco Datos ± DS de tres replicas

Fuente: esta estudio.

La fracción más retenida fue la fracción Roja II, mientras la fracción roja fue la fracción intermedia entre la separación de la fracción amarilla (rica en betaxantinas) y la fracción roja II, siendo de un color rojo-anaranjado.

Como se puede observar en la tabla anterior, el comportamiento de los datos en cuanto a flavonoides varía considerablemente en todos los casos, tanto en *Cereus Hexagonus* como en *Opuntia Stricta* mediante los dos métodos de extracción, MAE y TD; la fracción roja (betacianinas), de la especie *Cereus Hexagonus* mediante la técnica convencional es la que mayor contenido de flavonoides tiene, por otra parte cuando se aplica radiación de microondas para la extracción de los pigmentos, la fracción amarilla (betaxantinas) incrementa en gran medida la cantidad de flavonoides presentes en ella.

Por otra parte, para la especie *Opuntia Stricta* en cuanto a los extractos adquiridos mediante TD, su cantidad de flavonoides no solo es baja en comparación con la otra especie estudiada, sino también no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las fracciones de betacianinas y betaxantinas. Cuando se aplica MAE como método de extracción, no sólo la fracción amarilla incrementa su cantidad de flavonoides presentes, sino también cada uno de los extractos evaluados.

Lo anterior y el comportamiento de los extractos en CF, donde la fracción amarilla (betaxantinas) de las dos especies estudiadas, extraída mediante MAE es la que presenta mayor cantidad de estos compuestos, se atribuye a la técnica utilizada, debido a la irradiación de microondas que destruye las células incrementando la temperatura y la presión en el interior de la misma, generando la ruptura de las paredes celulares y por ende liberación de compuestos intracelulares¹⁵⁵. La mayoría de los extractos de plantas obtenidos mediante MAE son polifenoles, incluyendo flavonoides, (flavonas, flavonoles, isoflavonas, catequinas, flavanonas, flavononas y derivados del ácido cinámico), antocianinas y carotenoides¹⁵⁶.

Comparando cada método de extracción, se observa como los extractos obtenidos mediante extracción asistida con microondas, aumentaron la cantidad de flavonoides en cada muestra evaluada, tanto para *Cereus Hexagonus* como en *Opuntia Stricta*, se puede observar como la técnica MAE es una prometedora forma de extracción que incrementa en un gran valor la cantidad de flavonoides en los extractos.

5.6.1 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CF DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR TD

La tabla 24 resume el contenido de flavonoides, el valor promedio y su desviación estándar, de las diferentes muestras aisladas por TD del fruto de las dos especies de cactus.

Tabla 24 Resumen Estadístico para CF aislados mediante TD.

			<i>Error Est.</i>	
	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	42,929	0,28238	42,509
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	6,415	0,28238	5,995
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	14,362	0,28238	13,943
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	6,876	0,28238	6,457
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	10,291	0,28238	9,872
F. AMARILLA O. STRICTA	3	2,603	0,28238	2,184
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	96,011	0,28238	95,592
F. ROJA II C. HEXAGONUS	3	8,278	0,28238	7,859
F. ROJA O. STRICTA	3	3,886	0,28238	3,467
Total	27	21,295		

¹⁵⁵ PAP, N., et al. Microwave-assisted extraction of anthocyanins from black currant marc. En: Food and Bioprocess Technology. 2013, Vol. 6, p. 2666 – 2674.

¹⁵⁶ LI, Y., FABIANO-TIXIER, A., ABERT-VIAN, M., CHEMAT, F. Microwave-assisted extraction of antioxidants and food colors. Microwave-assisted extraction for bioactive compounds. En: Food Engineering Series. 2013, Vol. 4, p. 103 - 125.

Mediante la prueba F de los datos ANOVA (tabla 25) se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de flavonoides entre los extractos aislados del fruto de las dos especies de cactus (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*), ya que el valor P es menor de 0.05 (a un nivel de confianza del 95%). Para saber cuáles medias son significativamente diferentes de otras se usó la prueba de múltiples rangos el cual utiliza el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En la tabla 26 se observan ocho grupos homogéneos (según la lineación de las Xs en las columnas). No existen diferencias significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de Xs.

Es evidente, tabla 26, que no existe diferencia significativa entre el Contenido de flavonoides de la fracción amarilla de *O. Stricta* y la fracción roja aislada de la misma especie. Sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa entre el contenido de flavonoides de la fracción amarilla y las fracciones rojas de *C. Hexagonus*. Se observa un comportamiento diferente para la especie *C. Hexagonus*, donde la fracción roja (enriquecida en betacianinas) es quien presenta el mayor Contenido de flavonoides. En *O. Stricta* también se destaca que no existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de flavonoides entre los extractos crudo, puro, de esta especie.

Tabla 25 ANOVA para el contenido de flavonoides de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante TD.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	22412,7	8	2801,59	11711,58	0,0000
Intra grupos	4,30587	18	0,239215		
Total (Corr.)	22417,0	26			

Tabla 26 Prueba de Múltiple Rangos para CF de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante TD.

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F. AMARILLA O. STRICTA	3	2,603	X
F. ROJA O. STRICTA	3	3,886	X
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	6,415	X
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	6,876	X
F. ROJA II C. HEXAGONUS	3	8,278	X
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	10,291	X
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	14,362	X
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	42,929	X
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	96,011	X

5.6.2 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL CF DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR MAE

La tabla 27 resume el Contenido de flavonoides, el valor promedio y su desviación estándar, de las diferentes muestras aisladas por MAE del fruto de las dos especies de cactus.

Tabla 27 Resumen estadístico para CF aislados MAE

			<i>Error Est.</i>	
	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	14,112	0,973683	12,652
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	2,998	0,973683	1,5385
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	13,946	0,973683	12,486
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	5,773	0,973683	4,3135
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	191,809	0,973683	190,349
F. AMARILLA O. STRICTA	3	122,516	0,973683	121,056
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	169,673	0,973683	168,213
F. ROJA O. STRICTA	3	31,471	0,973683	30,0114
Total	24	69,037		

Tabla 28 ANOVA para CF de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante MAE.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	131661,	7	18808,7	6613,07	0,0000
Intra grupos	45,5068	16	2,84418		
Total (Corr.)	131707,	23			

Igualmente mediante la prueba F de los datos ANOVA (Tabla 28) se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de flavonoides entre los extractos aislados por MAE del fruto de las dos especies de cactus (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*), ya que el valor P es menor de 0.05 (a un nivel de confianza del 95%). Para saber cuáles medias son significativamente diferentes de otras se usó la prueba de múltiples rangos que utiliza el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En la tabla 29 se observan seis grupos homogéneos. No existen diferencias significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de Xs. Como lo observado para las dos especies por TD, con MAE también se observan diferencias estadísticamente significativas en el CF entre la fracción roja y la fracción amarilla para las dos especies. Sin embargo, se destaca que por MAE el CF es mayor (Tabla 23). En este caso, también la fracción amarilla de la especie *C. Hexagonus* es quien mayor CF presenta (191,809 mg de catequina/ gramos de extracto seco). Igualmente se observa en los extractos aislados de las dos especies que existen diferencias significativas en el CF al comparar la mayoría de las muestras (Extracto crudo, puro,

fracción roja y fracción amarilla), exceptuando el CF del extracto puro y crudo de la especie *C. Hexagonus* y *O. Stricta* (Tabla 29).

Finalmente, mediante una comparación estadística de las medias del contenido de flavonoides de los extractos aislados por los dos métodos de extracción (TD y MAE) se puede concluir no solo que el mejor método de extracción de los flavonoides de los frutos de las dos variedades de Cactáceas es el MAE, sino también que la especie *C. Hexagonus* es quien tiene el mayor contenido de este tipo de compuestos. Adicionalmente, la fracción amarilla (enriquecida en betaxantinas), en las dos especies, es la de mayor contenido fenólico.

Tabla 29 Prueba de Múltiple Rangos para el CF de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante MAE, con intervalos de confianza del 95%.

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
EXTRACTO CRUDO <i>O. STRICTA</i>	3	2,998	X
EXTRACTO PURO <i>O. STRICTA</i>	3	5,773	X
EXTRACTO PURO <i>C. HEXAGONUS</i>	3	13,946	X
EXTRACTO CRUDO <i>C. HEXAGONUS</i>	3	14,112	X
F. ROJA <i>O. STRICTA</i>	3	31,471	X
F. AMARILLA <i>O. STRICTA</i>	3	122,516	X
F. ROJA <i>C. HEXAGONUS</i>	3	169,673	X
F. AMARILLA <i>C. HEXAGONUS</i>	3	191,809	X

5.7 Determinación de la actividad antioxidante

5.7.1 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS.

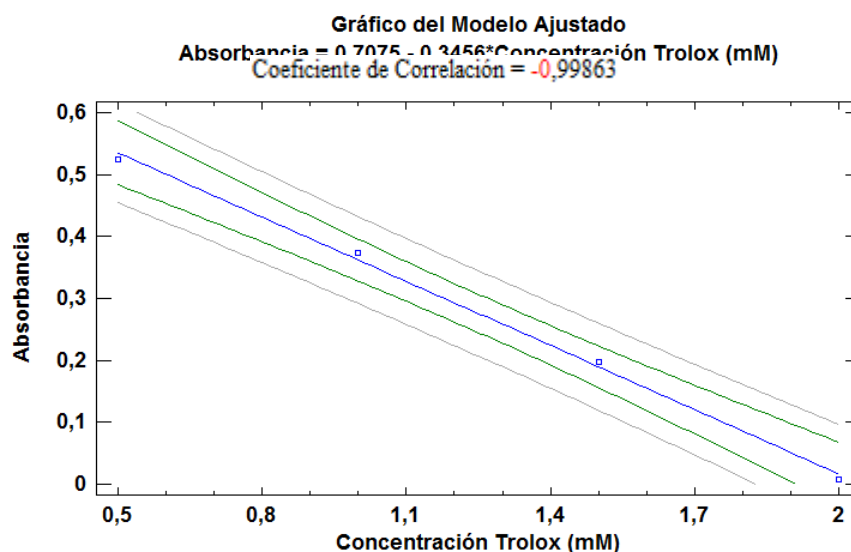
En esta investigación también se determinó la actividad antioxidante mediante el método de ABTS, evaluando así todas las muestras recolectadas para las dos especies estudiadas mediante los dos métodos de extracción utilizados. Se realizó una curva de calibración (figura 28), a partir del promedio de los datos obtenidos de tres replicas, empleando como patrón Trolox, la ecuación de la recta resultante fue $y = -0,3456x + 0,7075$, con un coeficiente de correlación cercano a 1 ($R^2 = 0,99863$), que indica la buena linealidad de la gráfica. La pendiente negativa indica la decoloración que sufre el catión radical ABTS al reaccionar con el antioxidante. Las concentraciones y absorbancias obtenidas se muestran en la tabla 30.

Tabla 30 Decoloración del catión radical ABTS con patrones TROLOX

mM Trolox	Replica			Promedio
	I	II	III	
0,5	0,543	0,497	0,532	0,524 ± 0,024
1	0,384	0,351	0,388	0,374 ± 0,020
1,5	0,178	0,167	0,247	0,197 ± 0,043
2	0,009	0,007	0,005	0,007 ± 0,002

Fuente: este estudio

Figura 29 Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante por el método ABTS.



Fuente: este estudio.

Como control positivo se usó el patrón ácido ascórbico a una concentración 1.5 mM. El valor de la capacidad antioxidante TEAC obtenida fue de 1,150 ± 0,033, similar al reportado por Re, *et al*¹⁵⁷ de 1,05 ± 0,02.

Utilizando la ecuación de la recta de calibrado ($y = -0,3456x + 0,7075$) se obtuvieron los valores de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) para las diferentes muestras aisladas de las dos especies estudiadas mediante los dos métodos de extracción utilizados.

¹⁵⁷ RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free Radical Biology and Medicine. 1999. Vol. 26, p. 1231 – 1237.

La tabla 31 presenta los resultados de actividad antioxidante para la especie *Cereus Hexagonus* y *Opuntia Stricta* mediante los dos métodos de extracción.

Tabla 31 Valor TEAC para los extractos estudiados (*mmol trolox /g extracto*)

Método extracción	TD		MAE	
	<i>Cereus Hexagonus</i>	<i>Opuntia Stricta</i>	<i>Cereus Hexagonus</i>	<i>Opuntia Stricta</i>
Fracción Amarilla	0,004 ± 0,001	0,020 ± 0,010	0,961 ± 0,068	0,117 ± 0,055
Fracción Roja	0,239 ± 0,086	0,036 ± 0,007	0,829 ± 0,029	1,228 ± 0,125
Extracto Puro	0,269 ± 0,041	0,061 ± 0,006	0,026 ± 0,004	0,052 ± 0,004
Extracto Crudo	1,866 ± 0,049	0,053 ± 0,008	0,052 ± 0,002	0,030 ± 0,002

* mmol trolox /g extracto

Fuente: este estudio

5.7.1.1 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR TEAC DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR TD

La tabla 32 resume el VALOR TEAC, el valor promedio y su desviación estándar, de las diferentes muestras aisladas por TD del fruto de las dos especies de cactus

Tabla 32 Resumen Estadístico para VALOR TEAC aislados por TD

	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	1,866	0,0221058
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	0,053	0,0221058
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	0,269	0,0221058
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	0,061	0,0221058
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	0,004	0,0221058
F. AMARILLA O. STRICTA	3	0,020	0,0221058
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	0,239	0,0221058
F. ROJA O. STRICTA	3	0,036	0,0221058
Total	24	0,319	

Mediante la prueba F de los datos ANOVA, tabla 33, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en el valor TEAC entre los extractos aislados del fruto de las dos especies de cactus (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*), ya que el valor P es menor de 0.05 (a un nivel de confianza

del 95%). Para saber cuáles medias son significativamente diferentes de otras se usó la prueba de múltiples rangos el cual utiliza el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En la tabla 34 se observan tres grupos homogéneos (según la lineación de las Xs en las columnas). No existen diferencias significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de Xs.

Es evidente que existe diferencia significativa entre el valor TEAC del extracto crudo de *C. Hexagonus* (1,866 mM trolox/ gramos de extracto seco) y las demás fracciones aislada de la misma especie, siendo este quien presenta el mayor valor TEAC (Tabla 32). Es claro además que no existen diferencias estadísticamente significativas en el valor TEAC entre ninguno de los extractos y fracciones de *O. Stricta*.

Tabla 33 ANOVA para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante TD.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8,42443	7	1,20349	820,93	0,0000
Intra grupos	0,023456	16	0,001466		
Total (Corr.)	8,44788	23			

Tabla 34 Prueba de Múltiple Rangos para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante TD.

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	0,004	X
F. AMARILLA O. STRICTA	3	0,02	X
F. ROJA O. STRICTA	3	0,036	X
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	0,053	X
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	0,061	X
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	0,239	X
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	0,269	X
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	1,866	X

5.7.1.2 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL VALOR TEAC DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR MAE

La tabla 35 resume el VALOR TEAC, el valor promedio y su desviación estándar, de las diferentes muestras aisladas por MAE del fruto de las dos especies de cactus.

Tabla 35 Resumen ESTADÍSTICO DEL VALOR TEAC DE LOS EXTRACTOS AISLADOS POR MAE

			<i>Error Est.</i>	
	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>(s agrupada)</i>	<i>Límite Inferior</i>
EXTRACTO CRUDO O. STRICTA	3	0,03	0,0317247	-0,017
EXTRACTO PURO O. STRICTA	3	0,052	0,0317247	0,004
EXTRACTO PURO C. HEXAGONUS	3	0,026	0,0317247	-0,021
EXTRACTO CRUDO C. HEXAGONUS	3	0,052	0,0317247	0,004
F. AMARILLA O. STRICTA	3	0,117	0,0317247	0,069
F. ROJA O. STRICTA	3	1,228	0,0317247	1,180
F. AMARILLA C. HEXAGONUS	3	0,961	0,0317247	0,913
F. ROJA C. HEXAGONUS	3	0,829	0,0317247	0,781
Total	24	0,411875		

Tabla 36 ANOVA para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante MAE.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5,34687	7	0,763839	252,98	0,0000
Intra grupos	0,04831	16	0,00301937		
Total (Corr.)	5,39518	23			

Igualmente mediante la prueba F de los datos ANOVA (Tabla 36) se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en el VALOR TEAC entre los extractos aislados por MAE del fruto de las dos especies de cactus (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*), ya que el valor P es menor de 0.05 (a un nivel de confianza del 95%). Para saber cuáles medias son significativamente diferentes de otras se usó la prueba de múltiples rangos que utiliza el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En la tabla 37 se observan cuatro grupos homogéneos. No existen diferencias significativas entre aquellos niveles que comparten una misma columna de Xs. Como lo observado para las dos especies por el método TD, con el método MAE también se observan diferencias estadísticamente significativas en el VALOR TEAC entre la fracción roja y la fracción amarilla para las dos especies, sin embargo, se destaca que por el método MAE el VALOR TEAC es mayor (tabla 32). En este caso, también la fracción roja de la especie *O. Stricta* es quien mayor VALOR TEAC presenta (1,228 mM trolox / gramo de extracto seco). Igualmente se observa en los extractos aislados de las dos especies que existen diferencias significativas en el VALOR TEAC al comparar la mayoría de las muestras (Extracto crudo, puro, fracción roja y fracción amarilla), exceptuando el CFT del extracto puro y crudo de las especies mostrado en la tabla 36.

Finalmente, mediante una comparación estadística de las medias del CFT de los extractos aislados por los dos métodos de extracción (TD y MAE) se

puede concluir no solo que el mejor método de extracción de los frutos de las dos variedades de Cactáceas es el MAE, sino también que la especie *C. Hexagonus* es quien tiene el mayor VALOR TEAC en sus dos fracciones.

Tabla 37 Prueba de Múltiple Rangos para el VALOR TEAC de los extractos de las dos especies (*O. Stricta* y *C. Hexagonus*) obtenidos mediante extracción MAE, con intervalos de confianza del 95%.

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
EXTRACTO PURO <i>C. HEXAGONUS</i>	3	0,026	X
EXTRACTO CRUDO <i>O. STRICTA</i>	3	0,03	X
EXTRACTO CRUDO <i>C. HEXAGONUS</i>	3	0,052	X
EXTRACTO PURO <i>O. STRICTA</i>	3	0,052	X
F. AMARILLA <i>O. STRICTA</i>	3	0,117	X
F. ROJA <i>C. HEXAGONUS</i>	3	0,829	X
F. AMARILLA <i>C. HEXAGONUS</i>	3	0,961	X
F. ROJA <i>O. STRICTA</i>	3	1,228	X

Las especies evaluadas poseen una buena actividad antioxidante, algo que motiva la continuación de estudios más específicos a nivel farmacológico.

6. CONCLUSIONES

En el proceso de evaluación de dos métodos de extracción; tradicional con disolventes (TD) y la extracción asistida con radiación de microondas (MAE) de los compuestos fenólicos de dos especies de cactus, se encontró que el método MAE genera una mayor eficiencia de extracción de este tipo de compuestos. Las mejores condiciones para aislar fenoles mediante la técnica MAE fueron: 90 W de potencia y 10 minutos de extracción.

Mediante el uso de cromatografía en columna (C_{18} como fase estacionaria) fue posible aislar del fruto de las dos especies de cactus estudiadas, una muestra enriquecida en betacianinas (fracción roja) y una muestra enriquecida en betaxantinas (fracción amarilla).

El extracto obtenido por MAE a partir del fruto de la especie *C. Hexagonus* muestra un contenido de betalaínas mayor que en la especie *O. Stricta*. Se destaca que en las dos especies estudiadas la fracción roja (enriquecida en betacianinas) es la que presenta un mayor contenido fenólico, siendo la fracción roja de la especie *C. Hexagonus* quien presenta el mayor CFT (195,12 mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco). Comparando la fracción amarilla (enriquecida en betaxantinas) de las dos especies, también la aislada a partir de *C. Hexagonus* es quien presenta el mayor CFT (178,4 mg de ácido gálico/ gramos de extracto seco) y el mayor CF (191,809 mg de catequina/ gramos de extracto seco).

El extracto crudo de *C. Hexagonus* aislado por extracción tradicional con solventes (TD) presento mayor capacidad antioxidante (1,866 mM trolox/ gramos de extracto seco) que el mismo extracto aislado por MAE. Se sugiere que en el extracto crudo de la especie *C. Hexagonus* aislado por TD se aísla una mayor variedad de fenoles que aportan a la actividad antiradical. Sin embargo, cuando a partir del extracto crudo aislado por MAE se separa la fracción roja y amarilla de las dos especies, estas fracciones tienen mayor capacidad antioxidante que los extractos crudos y purificados.

La capacidad de captura del radical sintético ABTS (actividad antioxidante) de las diferentes fracciones muestra que la fracción roja (enriquecida en betacianinas) y amarilla (enriquecida en betaxantinas) de la especie *C.*

Hexagonus son las que tienen la mayor capacidad antioxidante (TEAC), siendo la fracción roja la más antioxidante.

7. PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

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

PONENCIA

- “EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS TIPO BETALAÍNA DEL FRUTO DE UNA VARIEDAD DE CACTUS COLOMBIANO (*OPUNTIA SP*)“

Evento: I Simposio de Ciencias Exactas y Naturales, Octubre del 24 al 27 de 2016. Universidad de Nariño. Pasto – Colombia.

- “EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS TIPO BETALAINA DE LOS FRUTOS DE DOS VARIEDAD DE CACTUS COLOMBIANO (*Cereus Hexagonus (L) – Opuntia Stricta (Haw)*)”

Evento: XXVIII Congreso Peruano de Química “Dr. Gastón Pons Muzzo” FQIQ – UNMSM, Marzo del 29 al 31 de 2017. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un perfil mediante cromatografía HPLC y HPLC-MS/MS.

Para una elucidación estructural completa se recomienda aislar una mayor cantidad de los compuestos en estado puro, para realizar estudios de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) y análisis bidimensionales como COSY, HSQC, HMBC y TOCSY.

BIBLIOGRAFÍA

ALAM, M., BRISTI, J., RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. En: Saudi. Pharm. J. 2012, Vol. 21, p.143-152.

ALLEGRA, M., et al. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. En: Biochemical and Biophysical Research Communications. 2005, Vol. 332, p. 837 – 844.

AZEREDO, H.M.C. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. En: International Journal of Food Science & Technology. 2008, Vol. 44, p. 2365 – 2376.

BARRERA, F., REYNOSO, C., MEJÍA., E. Estabilidad de betalaínas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). En: Food Science and Technology International. 1998. Vol. 4, p. 115–120.

BÖHM, H., RINK, E. Betalains. En: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, New York, 1988, p. 449 – 463.

BRAND, W., CUVELIER, M., BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. En: Food. Sci. Technol. 1995, Vol. 28, p. 25-30.

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

CAI, Y., SUN, M., CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. En: Trends in Food Science & Technology. 2005, Vol. 16, p. 370 – 376.

CAI, Y., SUN, M., CORKE, H. Colourant properties and stability of Amaranthus betacyanin pigments. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998, Vol. 46, p. 4491 – 4495.

CAI, Y., SUN, M., CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. En: *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51, p. 2288–2294.

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, p. 276 – 282.

CARLE, R., SCHWEIGGERT, R. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages. El Sevier. 2016, 540p.

CASTELLAR, M., SOLANO, F., OBÓN, J. M. Betacyanin and Other Antioxidants Production During Growth of *Opuntia stricta* (Haw.) Fruits. En: Plant Foods Hum Nutr., 2012, vol. 67, p.337–343.

CASTELLAR, M.R., et al. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003, Vol. 51, p. 2772 - 2776.

CASTELLANOS-SANTIAGO, E., YAHIA, E.M. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008, Vol. 56, p. 5758–5764.

CEJUDO-BASTANTE, M.J., et al. Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014, Vol. 62, p. 8491–8499.

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

DELGADO-VARGAS, F., JIMENÉZ, A. R., 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, p. 173 – 289.

DAVIES, K. Manual Plant Reviews. Plant Pigments and their Manipulation. Palmerston norte, John Wiley & Sons, 2009, Vol. 14, p. 328-331.

DELGADO, A. Betalaínas del fruto de pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*): identificación, estabilidad y actividad antioxidante in vitro. Tesis pregrado. Universidad de Nariño. 2015

ESATBEYOGLU, T., et al. Betanin – a food colorant with biological activity. En: Molecular Nutrition & Food Research. 2015, Vol. 59, p. 36–47.

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

ESQUIVEL, P., STINTZING, F.C., CARLE, R. Pigment pattern and expression of colour in fruits from different *Hylocereus* sp. genotypes. En: Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2007, Vol. 8, p. 451–457.

ESKILSSON, C., BJORKLUND, E. Analytical-scale microwave assisted extraction. En: Journal of Chromatography. A. 2000, Vol. 902(1), p. 227 – 250.

FERNÁNDEZ LÓPEZ, J., et al. Screening and Mass-Spectral Confirmation of Betalains in Cactus Pears. En: Chromatographia. Septiembre. 2002 vol. 56, p. 591-595.

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

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

FOLIN, C., CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. En: J. Biol. Chem. 1927, Vol. 73, p. 627-650.

FORNI, E., et al. Highperformance liquid chromatographic analysis of the pigments of blood-red prickly pear (*Opuntia ficus-indica*). En: Journal of Chromatography. 1992, Vol. 593, p. 177 – 183

GASZTONYI, M.N., DAOOD, H., HÁJOS, M.T., BIACS, P. 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, p. 932–933.

GENGATHARAN, A., DYKES, G., CHOO, W. Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. En: Food Science and Technology. Diciembre, 2015, vol. 64, no. 2, p. 645-649.

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

Global Invasive Species Database (GISD) 2015. Species profile *Opuntia stricta*. Disponible en: <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=104> [ultimo acceso: 23 de febrero de 2017]

HARIVAINDARAN, K. V., REBECCA, O., CHANDRAN, S. Study of optimal temperature, pH and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. En: Pakistan Journal of Biological Sciences. 2008. Vol. 11(18), p. 2259–2263.

HENRY, B.S. Natural food colours. En: Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. (Eds.), Natural Food Colorants. Springer. , 1996, p. 40–79.

HERBACH, K., STINTZING, F., CARLE, R. Impact of thermal treatment on colour and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. J. Food. Sci. 2004. Vol. 69, p. C491–C498.

HERBACH, K.M., STINTZING, F.C., CARLE, R. Betalain stability and degradation – structural and chromatic aspects. En: Journal of Food Science. 2006, Vol. 71, p. 41–R50.

HEUER, S., WRAY, V., METZGER, J.W., STRACK, D. Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. En: Phytochemistry, 1992, Vol. 31, p. 1801–1807.

INGLESE, P., BASILE, F., SCHIRRA, M. Cacturs pear fruit production. En: Park S. Nobel (ed.). Cacti: Biology and Uses. University of California Press. California, USA, 2002. 280p.

JADHAV, S.J., LUTZ, S.E., GHORPADE, V.M., et al. Barley: chemistry and value-added processing. En: Crit. Rev. Food Sci. 1998, Vol. 38, p. 123 – 171.

JERZ, G., SKOTZKI, T., FIEGE, K., WINTERHALTER, P., WYBRANIEC, S. Separation of betalains from berries of *Phytolacca americana* by ion-pair high-speed counter-current chromatography. En: Journal of Chromatography A. 2008, Vol. 1190, p. 63–73.

KAHKONEN, M., HOPIA, A., HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 49 (2001); p. 4076–4082.

KHAN, M.I., GIRIDHAR, P. Plant betalains: chemistry and biochemistry. En: Phytochemistry. 2015, vol. 117, p. 267–295.

KAPADIA, G., TOKUDA, H., SRIDHAR, R. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. En: Cancer Letters. 1998, Vol. 129, p. 87-95.

KANELIS, A., MANGANARIS, G. Antioxidants and bioactive compounds in fruits. En: Fruit Ripening. Physiology, Signalling and Genomics. Boston, Cabi, 2014, 108 p.

KUGLER, F., STINTZING, F.C., CARLE, R. Characterisation of betalain patterns of differently coloured inflorescences from *Gomphrena globosa* L. and *Bougainvillea* sp. by HPLC– DAD–ESI–MS n. En: Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2007, Vol. 387, p. 637–648.

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

LI, Y., FABIANO-TIXIER, A., ABERT-VIAN, M. & CHEMAT, F. Microwave-assisted extraction of antioxidants and food colors. Microwave-assisted extraction for bioactive compounds. En: Food Engineering Series. 2013, Vol. 4, p. 103 - 125.

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

MABRY, T. J., TAYLOR, A., TURNER, B. L., The betacyanins and their distribution. En: Phytochemistry. 1963, Vol. 2, p. 61 – 64.

MARTÍNEZ, V., SEGOVIA, I., LÓPEZ, A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. Departamento de tecnología de alimentos. universitat politècnica de valència. 2015.

MIZRAHI, Y., NERD, A. Climbing and columnar cacti: new arid land fruit crops. En: J. Janick (ed.). Perspectives on New Crops and New Uses. American Society of Horticultural Science, Alexandria, Virginia, USA, 1999, p. 358-366.

MOHAMED-YASSEEN, Y., BARRINGER, S.A., SPLITTSTOESSER, W.E. A note on the uses of *Opuntia* spp. in Central/North America. En: Journal of Arid Enviroments, 1996, Vol. 32, p. 347-353.

MORENO, D., GARCÍA, C., GIL, J. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. En: Phytochemistry Rev. 2008, Vol. 7, p. 261 – 280.

MOßHAMMER, M. R., et al. Stability of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* [L.]Mill. cv. 'Gialla') betalains as affected by the juice matrix and selected

food additives. En: European Food Research and Technology. 2007, Vol. 225, p. 21 – 32.

MOßHAMMER, M.R., STINTZING, F.C., CARLE, R. Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom. En: Food Research International. , 2005, Vol. 38, p. 975–981.

MOßHAMMER, M.R., STINTZING, F.C., CARLE, R. Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. En: Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2005, Vol. 6, p. 221–231.

MOURE, A., FRANCO, D., SINERIO, J., et al. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. En: J. Agric. Food Chem. 2000, Vol. 48, p. 3890 – 3897.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. En: J. Chromatogr. A. 2004, Vol. 1054 (1–2), p. 95 – 111.

NERD, A., TEL-ZUR, N., MIZRAHI, Y. Fruits of vine and columnar cacti. En: Park S. Nobel (ed.). *Cacti: Biology and Uses*. University of California Press. California, USA, 2002, p. 280.

OKEZIE, I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. En: Mutation. 2002, Res. 523, p. 280.

PAP, N., et al. Microwave-assisted extraction of anthocyanins from black currant marc. En: Food and Bioprocess Technology. 2013, Vol. 6, p. 2666 – 2674.

PEKAL A, PYRZYNSKA K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. En: Food Analytical Methods. 2014. Vol. 7, p. 1776 – 1782.

PEÑARRIETA J. M., ALVARADO J.A., ÅKESSON B. & BERGENSTÅHL B. Total Antioxidant Capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds and in canihua (*Chenopodium pallidicaule*) an Andean pseudo-cereal. En: Molecular Nutrition and Food Research. 2008. Vol. 52, p. 708-717.

PEREZ, M. Análisis químico, estabilidad y actividad biológica in vitro de la fracción de polifenoles del fruto de capulí (*prunus serotina ehrh. var. capulí*). Tesis pregrado. Universidad de Nariño. 2013

PIATELLI, M., IMPERATO, F. Betacyanins of the family cactaceae. En: *Phytochemistry*. 1969, Vol. 8, p. 1503 – 1507

PIATELLI, M., MINALE, L. Pigments of Centrospermae. III. Distribution of betacyanins, En: *Phytochemistry*. 1964, Vol. 3, p. 547 – 557.

PIATELLI, M. Betalains. En: Goodwin, T. W., Ed. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 1976, Vol. 1, Academic Press, New York, p. 560 – 596.

PIATELLI, M. The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. En: Conn, E. E., Ed., *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Vol. 17. *Secondary Plant Products*, Academic Press, New York, 1981, p. 557 – 575.

PIMIENTA-BARRIOS, E., NOBEL, P.S. Reproductive characteristics of pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) and their relationship with soluble sugars and irrigation. En: *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 1995, vol. 120, p. 1082-1086

POURRAT, A., LEJEUNE, B., GRAND, A., POURRAT, H. Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography. En: *Journal of Food Science*. 1988, Vol. 53, p. 294–295.

RAVICHANDRAN, K. et al. Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. En: *Food Research International*. Marzo, 2013, Vol. 50, p. 670 –675.

RE, R., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 26, p. 1231 – 1237.

ROSENDAL-JENSEN, S., JUHL-NIELSEN, B., DAHLGREN, R. Use of chemistry in plant classification. En: *Rev. Latinoamer. Quím*. 1989; Suppl 1, p. 66 – 89.

SÁENZ, C. Utilización agroindustrial del nopal. En: *food and agriculture organization of the united nations*, 2006, p. 4-5.

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

SÁNCHEZ, C., LARRAURI, J., SAURA, C. A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. En: *J. Food. Sci. Agric*. 1998. Vol. 76, p. 270- 276.

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

SCHLIEMANN, W., CAI, Y., DEGENKOLB, T., SCHMIDT, J., CORKE, H. Betalains of *Celosia argentea*. En: *Phytochemistry*. 2001, Vol. 58, p. 159–165.

SCHWARTZ, S.J., VON ELBE, J.H., PARIZA, M.W., GOLDSWORTHY, T., PITOT, H.C. Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. En: *Food and Chemical Toxicology*, 1983, Vol. 21, p. 531–535.

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. En: *Am. J. Enol. Viticult.* 1965. Vol. 16, p. 144-158.

SING, O. *Colorantes Naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú, primera edición, octubre de 1997. 134 p.

SOBKOWSKA, E., CZAPSKI, J. & KACZMAREK, R. Red table beet pigment as food colorant. En: *International Food Ingredients*. 1991, Vol. 3, p. 24–28.

STINTZING, F.C., SCHIEBER, A., CARLE, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. En: *European Food Research and Technology*. 2002. Vol. 212, p. 396 – 407.

STINTZING, F., SCHIEBER, A., 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: *J. Agric. Food. Chem.* 2002. Vol. 50, p. 2302 – 2307.

STINTZING, F.C., SCHIEBER, A., CARLE, R. Cactus pear—a promising component to functional food. En: *Obst-, Gemüse-und Kartoffelverarbeitung*. 2000, Vol. 85, p. 12–19.

STINTZING, F., CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: *Trends Food Science Technology*. 2004, Vol. 15, p. 19 - 38.

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

STINTZING, F.C., SCHIEBER, A., 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 spectroscopy. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, Vol. 50, p. 2302 – 2307.

STINTZING, F., CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. En: *Trends Food Science Technology*. 2004, Vol. 15, p. 19 - 38.

STINTZING, F., SCHIEBER, A., CARLE, R. Betacyanin in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyhizus* (Weber) Britton & Rose. En: *Food. Chem.* 2002, Vol.77 p.101–106.

STINTZING, F., SCHIEBER, A., 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: *J. Agric. Food. Chem.* 2002. Vol. 50, p. 2302-2307.

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

STRACK, D., VOGT, T., SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. En: *Phytochemistry*, Febrero, 2003, vol. 62, no. 3, p. 247-269.

STRACK, D., STEGLICH, W., WRAY, V. Betalains. En: *Methods in Plant Biochemistry*. 1993, Vol. 8, Academic Press, Orlando, 421 – 450.

SUMAYA-MARTÍNEZ, M.T., et al. Betalain, acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. En: *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, Vol. 12, p. 6452–6468.

TESORIERE, L., et al. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. En: *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004a, Vol. 80, p. 941 – 945.

TESORIERE, L., 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. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, Vol. 53, p. 1266 - 1270.

TESORIERE, L., et al. Increased resistance to oxidation of betalain-enriched human low density lipoproteins. En: Free Radical Res. 2003, Vol. 37, p. 689 – 696.

TESORIERE, L., 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. 2004b, Vol. 80, p. 391 - 395.

THIRUGNANASAMBANDHAM, K., SIVAKUMAR, V. Microwave assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. En: Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 2015, Vol. 144. P. 1 – 8.

TREZZINI, G.F., ZRÝD, J. P. Two betalains from *Portulaca grandiflora*. En: Phytochemistry. 1991, Vol. 30(6), p. 1897 – 1899.

TSAI, P.-J., SHEU, C.-H., WU, P.-H., SUN, Y.-F. Thermal and pH stability of betacyanin pigment of *djulis* (*Chenopodium formosanum*) in Taiwan and their relation to antioxidant activity. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010, Vol. 58, p. 1020–1025.

TSUDA, S., et al. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. En: Toxicological Sciences. 2001, Vol. 61, p. 92 – 99

ULUBELEN, A., TOPCU G., KOLAK U. Labiatae flavonoids and their bioactivity. En: Studies in Natural Products Chemistry. 2005. Vol. 30, p. 233-302.

UTKARSHA U., et al. *Opuntia* and Other Cacti: Applications and Biotechnological Insights. En: Tropical Plant Biol. Agosto, 2010, Vol 3, p. 136–150.

Romero, 1969 CLOMPETAR LA CITA.

VAILLANT, F., et al. Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). En: Fruits. 2005, Vol: 60, p. 1 – 10.

WALLACE, R.S., GIBSON, A.C. EVOLUTION AND SYSTEMATICS. En: Park S. Nobel (ed.). *Cacti: Biology and Uses*. Ed. University of California Press. California, EUA, 2002, p. 280

WEE, S.C., WEE, K.Y. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. En: Adv. Appl. Sci. Res. 2011, vol. 2, no. 3, p. 418-425.

WYBRANIEC, S., NOWAK-WYDRA, B., MITKA, K., KOWALSKI, P., MIZRAHI, Y. Minor betalains in fruits of *Hylocereus* species. En: *Phytochemistry*. 2007, Vol. 68, p. 251–259.

SCHWARTZ, S.J., VON ELBE, J.H. Identification of betanin degradation products. En: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 1983, Vol. 176, p. 448–453.

WYBRANIEC, S., MIZRAHI, Y. Fruit flesh betacyanin pigments in *Hylocereus* cacti. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, Vol. 50, p. 6086–6089.

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

ANEXOS 1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES

HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 479

Bogotá D.C., 28 de noviembre de 2016

Señores

Nelson Humberto Hurtado

Ciudad

Asunto: **Identificación Taxonómica muestras**

Cordial Saludo,

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

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Opuntia stricta</i> (Haw.) Haw. (los frutos adicionales separados del espécimen parecen ser de otra especie, posiblemente <i>Opuntia</i> cf. <i>elator</i> Mill.)	CACTACEAE	593530	Sin colector	001	J. L. Fernández-Alonso/2016
<i>Cereus hexagonus</i> (L.) Mill.	CACTACEAE	593529	Sin colector	002	J. L. Fernández-Alonso/2016

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

Cordialmente,

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

Copie Archivo COL
Héctor Fiala