



Instituto Politécnico Nacional
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

“Optimización del proceso de extracción y determinación de la estabilidad de las betalaínas del fruto de la pitaya *S. stellatus*”

Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias
en Biotecnología

Presenta:

M. en C. María Guadalupe Pérez Loredo

Directora:

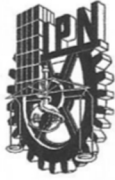
Dra. Blanca Estela Barragán Huerta



Ciudad de México, Mayo 2017

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Residuos Peligrosos del Departamento de Ingeniería de Sistemas Ambientales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional con el financiamiento de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP-20171394) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB-2011-01-169779).

La sustentante fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 384702 y recibió el apoyo de la Beca de Estímulo Institucional de Formación de Investigadores (antes PIFI).



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 13 del mes de Diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB para examinar la tesis titulada:

"Optimización del proceso de extracción y determinación de la estabilidad de las betalainas del fruto de la pitaya *S. stellatus*"

Presentada por el alumno:

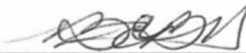
Pérez	Loredo	María Guadalupe
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro: B 1 3 0 7 2 3


aspirante de: **Doctorado En Ciencias En Biotecnología**

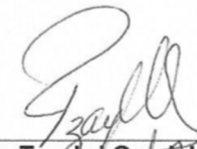
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


La Comisión Revisora

Directora de tesis

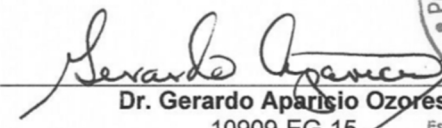

Dra. Blanca Estela Barragán Huerta
11925-ED-16


Dra. Norma Paniagua Castro
11015-EC-15


Dra. Tzayhi Guadalupe Gallardo Velázquez
8346-EG-12/6


Dra. Cristian Jiménez Martínez
11922-EF-16


Dr. Felipe García Ochoa
10415-EA-14


Dr. Gerardo Aparicio Ozores
10909-EG-15



S.E.P.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 13 del mes de diciembre del año 2016, la que suscribe **María Guadalupe Pérez Loredo** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro A130723, adscrita a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Blanca Estela Barragán Huerta y cede los derechos del trabajo titulado “**Optimización del proceso de extracción y determinación de la estabilidad de las betalainas del fruto de la pitaya *S. stellatus***”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y la directora del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones ia_guadalupeperez@hotmail.com ó bbarraganh@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Guadalupe Pérez Loredo

Agradecimientos

Al comité tutorial: Dra. Blanca Estela Barragán Huerta, Dra. Norma Paniagua Castro, Dra. Tzayhri Guadalupe Gallardo Velázquez, Dra. Cristian Jiménez Martínez, Dr. Felipe García Ochoa, Dr. Jorge Yáñez Fernández y Dr. Javier Peralta Cruz (Q.E.P.D.). Por el tiempo dedicado a la revisión del presente documento y sus observaciones al trabajo realizado.

A Oscar Rene López Mendiola, por su invaluable apoyo para conseguir las frutas y durante la recolección de las pitayas utilizadas en el presente estudio. Sin tu ayuda este trabajo no hubiese sido posible.

Al Biólogo Luis Enrique Ruiz Molina, por realizar la identificación y clasificación taxonómica de las pitayas *Stenocereus stellatus*.

A los ingenieros Hugo Cortés Martínez, Francisco Xavier Hernandez Martínez de la empresa Waters México y Brenda Montañez Barragán por su apoyo en la obtención de los cromatogramas de UPLC-MS.

Dedicatorias

Al amor de mi vida Luis Alberto López Juárez porque en las buenas y en las malas estás conmigo, sin tu apoyo y confianza nada de esto sería posible. Gracias por aguantarme, consolarme o regañarme cuando es necesario vamos por más de buenas y no tan buenas experiencias **JUNTOS, TE AMO.**

A mamá quien me enseñó que estudiar es el mejor camino para alcanzar mis metas, sé que estarías orgullosa y a papá quien con su particular estilo me inspiró para seguir adelante; ha sido difícil sin ustedes pero tengo la certeza que me han acompañado en cada paso. **Un beso hasta donde quiera que estén.**

Mis hermanos Calixto, Felipe Jr., y Reyna Esmeralda estoy muy orgullosa de ustedes; muchas gracias por su ejemplo. **Saber que están bien y son felices es una bendición.**

Los López; José Luis, Margarita, Mildred, Anajhi, Felipe, Esmeralda porque han sido testigos y parte de este proceso, **gracias por su cariño y apoyo.**

A los desconocidos que se convierten en amigos y a los amigos que ahora son familia; Pablo García, Alberto Arellano, Sonia Hernández; Gretel Esthefania, Marcela Soto y a los que ya no quisieron estar pero no olvidamos. Gracias por las bromas, las ideas, por estar ahí, por los tragos, la hospitalidad, las risas y las lágrimas compartidas. **Gracias, por estar en mi vida y enriquecerme como persona.**

Y finalmente, aunque no menos importante a mis amigos y compañeros de aventuras dentro del laboratorio: Laura, Mary, Paulina, Vicente, Alejandra, Juan, Diana, Mabel y Mónica. Las experiencias compartidas con ustedes son muy diversas y tratar de dedicarles a cada uno unas palabras sería material para muchas páginas más y la palabra escrita no es mi fuerte, así que seré breve; durante estos casi cuatro años compartí con cada uno de ustedes un espacio y tiempo específico y muy especial para mí; comidas, viajes, ideas, preocupaciones, sus familias, su hospitalidad, el estrés, las fiestas y más. No olviden que siempre deben tomar para sí mismos lo bueno de cada experiencia de la vida y desechar lo malo. Yo me quedo con lo mejor de lo que compartí con todos y cada uno de ustedes y les deseo que lo mejor de su vida este por venir. **Sean felices, al final es lo único que importa.**

Enfrenta los obstáculos a medida que se presenten, no pierdas energía temiendo por lo que pueda haber en el futuro.

Isabel Allende (El reino del dragón de oro)

Índice general

	Pág.
Índice	i
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	viii
Lista de abreviaturas	xi
Unidades de medida	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xvi
1. Introducción	1
2. Antecedentes y Estado del Arte	3
2.1. Colorantes en alimentos.	3
2.1.1. Clasificación de los colorantes	3
2.1.1.1. Colorantes sintéticos utilizados en alimentos.	5
2.1.1.2. Colorantes naturales usados en alimentos.	5
2.1.2. Color.	7
2.1.2.1. Atributos de color.	8
2.1.2.2. Sistemas de color.	9
2.2. Betalaínas	10
2.2.1. Fuentes de betalaínas.	10
2.2.2. Estructura química de las betalaínas.	11
2.2.3. Estabilidad de las betalaínas.	14
2.2.4. Actividad biológica de las betalaínas.	16
2.2.5. Métodos de análisis de betalaínas.	16
2.2.5.1. Extracción.	16
2.2.5.2. Separación y purificación de betalaínas.	17
2.2.5.3. Caracterización de betalaínas.	18
2.2.6. Obtención de betalaínas para su aplicación como colorante.	18
2.2.6.1. Métodos de extracción.	19
2.2.6.1.1. Métodos convencionales.	20
2.2.6.1.2. Métodos no convencionales.	20
2.2.6.1.2.1. Ultrasonido.	20
2.2.6.1.2.2. Microondas.	21
2.2.6.1.2.3. Hidrólisis enzimática.	21
2.2.6.1.2.4. Aplicación de pretratamientos.	22
2.3. Fenoles.	22
2.4. Antioxidantes	26
2.4.1. Radicales libres	26
2.4.2. Estrés oxidativo	27
2.5. Estudios sobre compuestos bioactivos en cactáceas.	27
2.5.1. Pitaya.	28
2.5.2. Producción.	34
3. Justificación	35
4. Objetivos	37

4.1	Objetivo general	37
4.2	Objetivos particulares	37
5.	Materiales y métodos	38
5.1	Material biológico.	38
5.2	Reactivos.	38
5.3	Material de laboratorio.	39
5.4	Equipo de laboratorio.	40
5.5	Desarrollo experimental.	40
5.6	Preparación de muestras de pitaya.	40
5.7	Obtención de extractos de pitaya.	42
5.7.1	Obtención de extractos de pitaya para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).	42
5.7.1.1	Hidrólisis de los extractos de pitaya para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).	42
5.7.2	Extracción de betalaínas para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) y cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC-MS).	43
5.7.2.1	Limpieza del extracto de betalaínas.	44
5.8.	Aplicación de pretratamientos en muestras de pitaya	44
5.8.1	Evaluación del efecto de los pretratamientos combinados.	45
5.8.2	Selección del tiempo de incubación para aplicar el pretratamiento.	46
5.9	Optimización del proceso de extracción de betalaínas.	46
5.9.1	Cinética de degradación.	47
5.10	Evaluación de la estabilidad del extracto.	48
5.10.1	Efecto del pH.	49
5.10.2	Efecto de la temperatura.	49
5.11	Técnicas analíticas.	49
5.11.1	Análisis proximal.	49
5.11.2	Análisis fisicoquímico.	50
5.11.3	Determinación de color.	50
5.11.4	Espectros de absorción de extractos metanólicos.	51
5.11.5	Cuantificación de pigmentos.	51
5.11.6	Compuestos fenólicos totales (CFT).	51
5.11.7	Capacidad antioxidante (CA) con el ensayo ABTS.	52
5.11.8	Ácido ascórbico (AA).	52
5.12	Análisis de compuestos fenólicos y pigmentos de pitaya por HPLC-DAD	53
5.12.1	Análisis de extractos crudos por HPLC-DAD.	53
5.13	Análisis de betalaínas por HPLC-DAD y UPLC-DAD.	54
5.13.1	Análisis de fracciones de betalaínas por HPLC-DAD.	54
5.13.2	Análisis de betalaínas por UPLC-MS.	54
5.14	Análisis estadístico.	55
5.14.1	Análisis de componentes principales.	55
5.14.1.1	Pasos para realizar el análisis de componentes principales en Minitab.	57
6.	Resultados y discusión	60

6.1	Análisis proximal de frutas <i>S. stellatus</i> .	60
6.2	Caracterización fisicoquímica.	60
6.3	Propiedades de color.	61
6.4	Espectros de absorción.	62
6.5	Compuestos fenólicos totales (CFT), Ácido ascórbico (AA), pigmentos (Bc, Bx, BT) y CA en pulpa de <i>S. stellatus</i> .	63
6.6.	Análisis de Componentes Principales (ACP) de propiedades físicas, fisicoquímicas y químicas de frutas de <i>S. stellatus</i> .	64
6.7	Agrupamiento de frutas de cactus por contenido de pigmentos mediante ACP.	66
6.8	Análisis de compuestos fenólicos y pigmentos en extractos crudos de pulpa de pitaya <i>S. stellatus</i> por HPLC-DAD.	70
6.8.1	Análisis de compuestos fenólicos por HPLC - DAD.	71
6.8.1.1	Análisis de fenoles libres (FL), glicosilados (FG) y esterificados (FE) por HPLC-DAD.	77
6.8.2	Análisis de pigmentos por HPLC - DAD.	80
6.9	Selección de una variedad para la extracción de compuestos bioactivos.	81
6.10	Efecto de los pre-tratamientos en la extracción de compuestos bioactivos en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	83
6.10.1	Extracción de betalaínas en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	83
6.10.2	Extracción de compuestos fenólicos totales en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	86
6.10.3	Valores de capacidad antioxidante en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	89
6.10.4	Selección de la muestra y el pretratamiento para la extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	91
6.10.4.1	Análisis de componentes principales (ACP) de la extracción de los compuestos bioactivos en relación al pretratamiento utilizado.	92
6.10.4.2	Efecto de la combinación de pretratamientos en la extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	95
6.10.4.3	Selección del tiempo de incubación para el pretratamiento de la muestra.	99
6.11	Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	100
6.11.1	Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en el color de los extractos.	101
6.11.2	Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en la extracción de betalaínas.	102

6.11.3	Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en el tiempo de vida media y retención de las betalaínas.	104
6.11.4	Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en la extracción de fenoles, capacidad antioxidante y su retención.	106
6.11.5	Selección de condiciones óptimas y validación de la optimización.	108
6.12	Determinación de la estabilidad del extracto.	110
6.12.1	Efecto del pH sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	110
6.12.1.1	Efecto del pH sobre el color.	110
6.12.1.2	Efecto del pH sobre la retención de betalaínas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	111
6.12.1.3	Efecto del pH en los parámetros cinéticos de las betalaínas de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	114
6.12.2	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	118
6.12.2.1	Efecto de la temperatura sobre la retención de betalaínas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	118
6.12.2.2	Efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos de las betalaínas de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	120
6.13	Análisis de las betalaínas de la pitaya <i>S. stellatus</i> .	124
6.13.1	Análisis de betalaínas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).	124
6.13.2	Análisis de betalaínas por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC-MS).	126
7.	Conclusiones	129
8.	Bibliografía	131
Anexos		
Anexo I.	Resultados del análisis de componentes principales de las propiedades físicas, fisicoquímicas y químicas de frutas de <i>S. stellatus</i> .	151
Anexo II.	Características de compuestos fenólicos.	153
Anexo III.	Espectros de absorción de las señales del extracto crudo.	160
Anexo IV.	Resultados del análisis de componentes principales del contenido de compuestos bioactivos en extractos de pitaya <i>S. stellatus</i> sometidos a diferentes pretratamientos.	169
Anexo V.	Contenido de pigmentos, compuestos fenólicos totales y valores de capacidad antioxidante en pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> sometida a diferentes pretratamientos.	171
Anexo VI.	Espectros de absorción de las betalaínas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	172

Anexo VII	Comparative analysis of betalain content in <i>Stenocereus stellatus</i> fruits and other cactus fruits using principal component analysis	174
Anexo VIII	Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (<i>Stenocereus stellatus</i>) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos.	189

Índice de cuadros

No.	Descripción	Pág.
1.	Sistemas de clasificación de colorantes.	4
2.	Metodologías de separación y purificación de betalaínas.	17
3.	Pruebas químicas y metodologías para la caracterización de betalaínas.	19
4.	Clasificación de compuestos fenólicos.	23
5.	Investigaciones en cactáceas del género <i>Opuntia</i> .	29
6.	Investigaciones en cactáceas del género <i>Hylocereus</i> .	31
7.	Investigaciones en cactáceas del género <i>Stenocereus</i> .	33
8.	Producción de pitaya por estado.	34
9.	Experimento factorial 2 ² .	45
10.	Rango de las variables independientes usadas en la optimización.	46
11.	Diseño experimental central compuesto.	47
12.	Gradiente para el análisis de extractos crudos por HPLC.	53
13.	Gradiente para el análisis de betalaínas por HPLC.	54
14.	Gradiente para el análisis de betalaínas por UPLC.	54
15.	Análisis proximal, características fisicoquímicas, y propiedades de color de frutas <i>S. stellatus</i> blanca, amarilla, violeta y roja.	61
16.	Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), capacidad antioxidante (CA), pigmentos, y ácido ascórbico (AA) de frutas <i>S. stellatus</i> blanca, amarilla, violeta y roja.	64
17.	Pigmentos, compuestos fenólicos totales (TPC), y capacidad antioxidante (CA) de frutas de cactus de diferentes países.	67
18.	Intervalos de confianza para el agrupamiento de frutas de cactáceas con base en el contenido de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales.	69
19.	Fenoles derivados y otros antioxidantes identificados por HPLC-DAD en la pulpa de cuatro variedades de pitayas <i>S. stellatus</i> .	71
20.	Fenoles libres, glicosilados y esterificados identificados por HPLC en extractos hidrolizados de pulpa de pitaya blanca <i>S. stellatus</i> .	77
21.	Pigmentos, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los extractos acuosos de pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos con los mejores pretratamientos.	91
22.	Resultados del diseño factorial 2 ² para pigmentos (Bc, Bx y BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) en extractos de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	95
23.	Modelos matemáticos del diseño factorial 2 ² en términos codificados de los factores significativos para el proceso de extracción de pigmentos, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	98
24.	Color de los extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.	101

25.	Contenido de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales en extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.	102
26.	Modelos matemáticos del diseño central compuesto en términos codificados de los factores significativos para la optimización del proceso de extracción de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales en extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	103
27.	Tiempo de vida media y porcentaje de retención de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales en extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.	104
28.	Modelos matemáticos del diseño central compuesto en términos codificados de los factores significativos para el tiempo de vida media y la retención de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales en extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	106
29.	Contenido y porcentaje de retención de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> evaluados durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.	106
30.	Modelos matemáticos del diseño central compuesto en términos codificados de los factores significativos para compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante, retención de compuestos fenólicos totales y retención de capacidad antioxidante en extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	108
31.	Valores teóricos y experimentales para validar la optimización del proceso de extracción de betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	109
32.	Color de extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos con diferentes condiciones de pH.	110
33.	Coeficientes de la ecuación lineal y constantes de degradación de las betalaínas de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes pH	114
34.	Condiciones de pH de mayor estabilidad para betalaínas y antocianinas de diversas fuentes vegetales.	117
35.	Coeficientes de la ecuación lineal y constantes de degradación de las betalaínas de la pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes temperaturas.	120
36.	Datos cromatográficos, espectrofotométricos y de espectroscopia de masas de las betacianinas de la pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	127

Índice de figuras.

No.	Descripción	Pág.
1.	Atributos de color, hue, croma y luminosidad.	8
2.	Espacio de color CIE Lab.	9
3.	Diferentes fuentes de betalaínas, amaranto, betabel, pitahaya, y tunas.	11
4.	Ácido betalámico y betanidina.	12
5.	Betanina, filocactina, 2'-O-apiosil-filocactina, 2'-(5''-O-E-feruloilapiosil)betanina, 2'-(5''-O-E-feruloilapiosyl)filocactina, hilocerenina.	13
6.	Estructura básica de las betaxantinas, indicaxantina .	14
7.	Factores que afectan estabilidad de las betalaínas.	15
8.	Perfil típico de elución de fenoles a 280 nm mediante cromatografía líquida de alta resolución, detector UV con arreglo de diodos en columna C-18 y gradiente de elución.	25
9.	Cactus de <i>S. stellatus</i> y sus frutas: pitaya blanca, amarilla, violeta, y roja.	38
10.	Desarrollo experimental.	41
11.	Paso 2 del análisis de componentes principales en Minitab.	57
12.	Paso 3 del análisis de componentes principales en Minitab.	57
13.	Paso 4 del análisis de componentes principales en Minitab.	58
14.	Resultados del análisis de componentes principales.	59
15.	Espectros de absorción en extractos acuosos de frutas <i>S. stellatus</i> .	63
16.	Componentes principales CP1, CP2 y CP3 para puntuaciones de las muestras de pitaya y cargas de las variables analizadas en pitayas <i>S. stellatus</i> .	65
17.	Puntuaciones y cargas de los componentes principales CP1 y CP2 para el contenido de pigmentos (Bx, Bc y BT) en frutas de cactus de México, España, Argentina, Estados Unidos, Taiwán y Bélgica.	68
18.	Cromatograma a 260 nm obtenido por HPLC-DAD de la mezcla de 17 estándares de fenoles.	70
19.	Cromatograma a 260nm del extracto crudo de pitaya <i>S. stellatus</i> blanca (SSBM) obtenido por HPLC-DAD.	73
20.	Cromatograma a 260nm del extracto crudo de pitaya <i>S. stellatus</i> amarilla (SSAM) obtenido por HPLC-DAD.	74
21.	Cromatograma a 260nm del extracto crudo de pitaya <i>S. stellatus</i> violeta (SSVM) obtenido por HPLC-DAD.	75
22.	Cromatograma a 260nm del extracto crudo de pitaya <i>S. stellatus</i> roja (SSRM) obtenido por HPLC-DAD.	76
23.	Cromatogramas a 260nm de las fracciones de fenoles libres, glicosilados y esterificados de pitaya <i>S. stellatus</i> blanca (SSBM) obtenidos por HPLC-DAD.	78
24.	Cromatogramas 538 y 483nm de los extractos de pitayas <i>S. stellatus</i> amarilla, violeta y roja obtenido por HPLC-DAD.	82
25.	Betalaínas totales en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidas después de la aplicación de los pre-tratamientos.	84

26.	Compuestos fenólicos totales en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos.	87
27.	Capacidad antioxidante de pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenida después de la aplicación de los pretratamientos.	90
28.	Componentes principales CP1 y CP2 para las cargas y puntuaciones del ACP de Bc, Bx, BT, CFT y CA obtenidos en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja <i>S. stellatus</i> sometida a diferentes pretratamientos.	94
29.	Superficie de respuesta de la extracción de betacianinas, betaxantinas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de los extractos de pitaya roja <i>S. stellatus</i> en función de los pretratamientos con ultrasonido y pectinasa.	96
30.	Interacciones en el diseño factorial 2 ² entre los tratamientos por ultrasonido y pectinasa en pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> .	97
31.	Superficie de respuesta para betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales de los extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> en función de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol.	103
32.	Superficie de respuesta para tiempo de vida media de betacianinas, retención de betacianinas, tiempo de vida media de betaxantinas, retención de betaxantinas, tiempo de vida media de betalaínas totales y retención de betalaínas totales de los extractos de pitaya roja <i>S. stellatus</i> en función de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol.	105
33.	Superficie de respuesta para compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante, retención de compuestos fenólicos totales (b) y retención de capacidad antioxidante de los extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> en función de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol.	107
34.	Retención de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales de extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos a diferentes condiciones de pH.	111
35.	Retención de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de extractos de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidos a diferentes condiciones de pH.	112
36.	Betaxantinas con diferente capacidad antioxidante.	113
37.	Cinética de primer orden de la degradación de betacianinas y betaxantinas de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes valores de pH	115
38.	Tiempo de vida media en horas de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes condiciones de pH.	116
39.	Retención de pigmentos, betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes temperaturas.	118
40.	Retención de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes temperaturas.	119

41. Cinética de primer orden de la degradación de betacianinas y betaxantinas de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes temperaturas.	121
42. Tiempo de vida media en horas de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a diferentes temperaturas.	122
43. Determinación de la energía de activación de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> a pH de 4.7, entre 50–80 °C.	123
44. Cromatogramas de la fracción no retenida (a) 483 y (b) 538 nm y de la fracción retenida (c) 483 y (d) 538nm del extracto de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenidas por HPLC-DAD.	125
45. Cromatograma a 534 nm de la fracción B de pulpa de pitaya roja <i>S. stellatus</i> obtenido por UPLC-DAD-MS.	127

Lista de abreviaturas

AA	Ácido ascórbico
ABTS	2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolina 6-ácido sulfónico)
ACP	Análisis de componentes principales
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análisis de varianza (Analysis of variance)
AR	Azúcares reductores
Bc	Betacianinas
BT	Betalaínas totales
Bx	Betaxantinas
Bc t $\frac{1}{2}$	Tiempo de vida media de betacianinas
BT t $\frac{1}{2}$	Tiempo de vida media de betalaínas totales
Bx t $\frac{1}{2}$	Tiempo de vida media de betaxantinas
C	Control
CA	Capacidad antioxidante
CE	Control enzimático
CEA	Control sin enzima, incubación 2 h, 40 °C, 150 rpm.
CEB	Control sin enzima, incubación 24 h, 40 °C, 150 rpm.
CFT	Compuestos fenólicos totales
CHO	Carbohidratos
CL	Celulasa
CP	Componente principal
CPs	Componentes principales
CT	Catequina
DAD	Detector de Arreglo de Diodos (Diode-Array Detection)
DCC	Diseño central compuesto
DE	Desviación estándar
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilenediamina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
E	Enzimático
Ea	Energía de activación
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EB	Equivalentes de betanina
EC	Extracto crudo
EC ₅₀	Concentración efectiva
ECT	Equivalentes de catequina
EE.UU.	Estados Unidos
ES	Extracto seco
ESI	Ionización por electrospray (Electrospray ionization)
ET	Equivalentes de Trolox
EtOH	Porcentaje de etanol
EVC	Equivalentes de vitamina C
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration)
FD&C	Alimentos, medicamentos y cosméticos (Food, Drugs and Cosmetics)

FE	Fenoles esterificados
FG	Fenoles glicosilados
FL	Fenoles libres
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High-Performance Liquid Chromatography)
IC	Intervalos de confianza
λ_{\max}	Longitud de onda de absorción máxima
Mi	Microondas
M1	Microondas 105 W, 1 min
M2	Microondas 105 W, 2 min
MS	Espectrometría de Masas (Mass-Spectrometry)
ORRM	<i>Opuntia robusta</i> roja de México
ORRS	<i>Opuntia robusta</i> roja de España
OSRS	<i>Opuntia stricta</i> roja de España
PC	Pectinasa
PF	Peso fresco
PPC	Proteasa, pectinasa, celulasa.
PS	Peso seco
PT	Proteasa
RPD	Relación pulpa-disolvente
SPAM	<i>Stenocereus pruinosus</i> amarilla de México
SPRM	<i>Stenocereus pruinosus</i> roja de México
SS	Sólidos solubles
SSAM	<i>Stenocereus stellatus</i> amarilla de México
SSBM	<i>Stenocereus stellatus</i> blanca de México
SSRM	<i>Stenocereus stellatus</i> roja de México
SSVM	<i>Stenocereus stellatus</i> violeta de México
tr	Tiempo de retención
U	Ultrasonido
U1	Ultrasonido 5 min
U2	Ultrasonido 10 min
U3	Ultrasonido 15 min
U4	Ultrasonido 20 min
U5	Ultrasonido 25 min
U6	Ultrasonido 30 min
U7	Ultrasonido 35 min
UE	Unión Europea
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
UV-Vis	Ultravioleta - visible
†	2 horas de incubación
††	24 horas de incubación

Unidades de medida

°C	grados Celsius
g	gramo
g·L ⁻¹	gramo por litro
g·mL ⁻¹	gramo por mililitro
GHz	gigahercio o gigahertz
h	hora
kJ·mol ⁻¹	kilojulio por mol
kV	kilovoltio
M	molar
mg	miligramo
mg·g ⁻¹ _{ES}	miligramo por gramo de extracto seco
mg·g ⁻¹ _{PF}	miligramo por gramo de muestra en peso fresco
mg·L ⁻¹	miligramo por litro
mg·mL ⁻¹	miligramo por mililitro
mg·100g ⁻¹ _{PF}	miligramo por 100 gramos de muestra en peso fresco
mg·100g ⁻¹ _{PS}	miligramo por 100 gramos de muestra en peso seco
mg·100mL ⁻¹	miligramo por 100 mililitros
MHz	megahercio o megahertz
min	minuto
mL	mililitro
mL·min	mililitro por minutos
mM	milimolar
mm	Milímetro
mUA	mili unidades de absorbancia
µg·g ⁻¹ _{PF}	microgramo por gramo de muestra en peso fresco
µg·g ⁻¹ _{PS}	microgramo por gramo de muestra en peso seco
µg·100g ⁻¹ _{PF}	microgramo por 100 gramos de muestra en peso fresco
µL	microlitro
µM	micromolar
µm	micrómetro
µmol·g ⁻¹	micromol por gramo
µmol·g ⁻¹ _{ES}	micromol por gramo de extracto seco
µmol·g ⁻¹ _{PF}	micromol por gramo de peso fresco
N	concentración normal (equivalentes por litro de solución)
nm	nanómetro
p·p ⁻¹	peso por peso
p·v ⁻¹	peso por volumen
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo
V·cm ⁻¹	voltio por centímetro
v·v ⁻¹	volumen por volumen
×g	Unidades de aceleración (Fuerza centrífuga relativa)

Resumen

Los colorantes sintéticos rojo 2, 4 y 32 fueron eliminados de la lista de colorantes permitidos por presentar problemas de toxicidad, por lo que existe interés en estudiar nuevas fuentes de pigmentos naturales, que puedan sustituir a los sintéticos. Por tal razón, se decidió extraer y caracterizar los pigmentos presentes en las pitayas de *Stenocereus stellatus*.

En la primera fase del trabajo, se analizaron cuatro variedades de pitayas de *S. stellatus*; se identificó el tipo de compuestos fenólicos presentes y se seleccionó la pitaya roja, que presentó 296.86mg de betalaínas totales (BT) por 100g de peso seco (PS).

En la segunda etapa, se evaluó el efecto sobre la extracción de compuestos bioactivos de la pitaya roja *S. stellatus* de los pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimático (celulasa, pectinasa y proteasa) en pulpa sin y con semilla. Se seleccionó el tratamiento combinado de ultrasonido 15min y pectinasa 0.5% p·p⁻¹, 40°C, 3h, 150rpm en pulpa sin semillas, debido al incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de 47% y de 21% en la capacidad antioxidante (CA), comparado con el proceso de extracción sin pretratamiento.

En la tercera etapa, se optimizó el proceso de extracción mediante un diseño central compuesto (DCC); se evaluó la relación pulpa-disolvente (RPD) (0.16 – 0.83g·mL⁻¹) y la concentración de etanol (EtOH) (15 – 85%) en pulpa pretratada. El punto óptimo de extracción se obtuvo con una relación pulpa-disolvente de 0.46g·mL⁻¹ y con 85% de etanol. Bajo estas condiciones, se incrementó la extracción de BT, CFT y CA un 5.1, 192.3 y 116.9% cada uno, con respecto a la extracción no optimizada.

En la cuarta etapa, se evaluó la estabilidad de las betalaínas, a intervalos de pH entre 2.9 – 7.1 y temperatura 50 – 80°C, con un comportamiento que se ajustó a una cinética de primer orden y mostró una mayor estabilidad en valores de pH entre 4.5 – 5.1 para betacianinas y de 5.1 – 6.5 para betaxantinas, con energía de activación entre 65 – 70KJ·mol⁻¹.

En la quinta etapa, se realizó la identificación pre-eliminar de 5 betacianinas y 2 betaxantinas con características similares a la indicaxantina.

Estos resultados sientan algunas bases para futuras investigaciones relacionadas con los pigmentos naturales y otros compuestos bioactivos de frutos de cactáceas.

Abstract

Red synthetic dyes 2, 4 and 32 were removed from the list of allowed dyes for toxicity problems, so there is interest in studying new sources of natural pigments that can replace the synthetic ones. For this reason, it was decided to extract and characterize the pigments from *Stenocereus stellatus* pitayas.

In the first phase of this work, there were analyzed four varieties of *S. stellatus* fruits; the kinds of phenolics compounds present was identified and it was selected the red pitaya, which presented 296.86 mg of total betalains (TB) per 100g dry weight (DW).

On the second phase, it was evaluated the effect of microwave, ultrasound and enzymatic (celulase, pectinase and protease) pre-treatments over the extraction of bioactive compounds on flesh without and with seeds. Was selected the combined treatment of ultrasound 15min and pectinase 0.5% $w \cdot w^{-1}$, 40°C, 3h, 150rpm on flesh without seeds; due to the increase on total phenolic compounds (TPC) of 47% and 21% of antioxidant capacity (AC) values compared to the extraction process in flesh without pretreatment.

On the third phase, the extraction process was optimized by a central composite design (CCD); flesh-solvent rate (0.16 – 0.83g·mL⁻¹) and ethanol concentration (15 – 85%) on flesh pretreated was evaluated. Optimum extraction was obtained with 0.46 g·mL⁻¹ flesh-solvent rate and 85% of ethanol. Under these conditions the extraction of TB, TPC and AC increased 5.1, 192.3 and 116.9% each one, over extraction unoptimized.

In the fourth phase, betalains stability was evaluated at pH values between 2.9 – 7.1 and temperature conditions from 50 – 80°C, with a behavior that fitted well to first-order kinetics and showed greater stability on pH values from 4.5 – 5.1 for betacyanins and from 5.1 – 6.5 for betaxanthins, with activation energy between 65 – 70KJ·mol⁻¹.

Finally, in the fifth phase was performed the preliminary identification of five different betacyanins and two betaxanthins with similar characteristics to the indicaxanthin were obtained.

These results provide basis for future research related to natural pigments and other bioactive compounds of cactus fruits.

1. Introducción.

Los pigmentos son utilizados en la industria alimentaria para estandarizar la apariencia, debido a variaciones naturales en las materias primas, para corregir la pérdida de color que ocurre durante el procesamiento o para hacer los alimentos más atractivos (bebidas y confitería) con el principal objetivo de promover su consumo (Downham y Collins 2000).

Los colorantes sintéticos más utilizados son aquellos que imparten color amarillo y rojo a los alimentos, pero solo 2 pigmentos amarillos (FD&C amarillo 5 y FD&C amarillo 6) y 2 rojos (FD&C rojo 3 y FD&C rojo 40) se tienen aprobados por la FDA en Estados Unidos para su uso en alimentos (FDA 2015). Las regulaciones oficiales en Estados Unidos y la Unión Europea han restringido el uso de colorantes sintéticos como aditivos, debido a que algunos han mostrado efectos cancerígenos en animales de laboratorio (Tsuda *et al.*, 2001), además los consumidores buscan productos alimenticios más naturales, esto ha provocado que se ponga más atención al desarrollo y uso de pigmentos naturales.

Las antocianinas y betalaínas, son pigmentos naturales presentes en algunas frutas y han sido propuestas como sustitutos de los colorantes sintéticos rojos, por lo cual, se han buscado fuentes potenciales de pigmentos naturales (García-Cruz *et al.*, 2013; Abeorubad, 2011; Liaotrakoon *et al.*, 2013). Los frutos de *Opuntia* e *Hylocereus* son las cactáceas más estudiadas como fuente de pigmentos y otros compuestos bioactivos. Los frutos del género *Stenocereus*, comúnmente llamadas pitayas han sido menos estudiados, a pesar de ser otra potencial fuente de pigmentos.

Se han publicado, algunos estudios de frutas de *S. griseus* y *S. pruinosus* con respecto a CFT, CA, betalaínas y minerales (García-Cruz *et al.*, 2012; García-Cruz *et al.*, 2013), pero la investigación acerca de los compuestos bioactivos de *S. stellatus* aún es escasa.

En la actualidad la demanda de compuestos naturales (fenoles, colorantes antioxidantes) se ha incrementado, debido a que no son tóxicos y además poseen propiedades benéficas para la salud (Biesalski *et al.*, 2009a; Biesalski *et al.*,

2009b). La extracción de estos compuestos debe realizarse bajo condiciones que permitan obtenerlos, conservando sus características bioactivas; el método de extracción ideal debe ser cuantitativo, no destructivo y rápido (Yang *et al.*, 2011).

Los métodos de extracción convencionales (maceración, reflujo, extracción soxhlet) usualmente requieren tiempos de extracción entre 8 – 24 h, tienen bajos rendimientos y alto consumo energético, pero siguen siendo populares debido a la facilidad y bajo costo de operación (Yang *et al.*, 2011; Wang y Weller, 2006). Los métodos de extracción no convencionales son más amigables con el medio ambiente debido a que reducen el uso de químicos y tiempos de extracción, además mejoran el rendimiento y la calidad del extracto.

Además de la aplicación de pretratamientos; diferentes estudios han demostrado que variables como: la relación sólido-disolvente, propiedades del disolvente, tiempo, temperatura de extracción y tamaño de partícula tienen efecto sobre la eficiencia de extracción (Swamy *et al.*, 2014). Por ello, la optimización de procesos de extracción mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM por sus siglas en inglés), es muy utilizada en los últimos años.

Una limitante en la obtención, almacenamiento y aplicación de pigmentos naturales es su estabilidad. Dentro de los factores que afectan la estabilidad de las betalaínas, hay internos (madurez y/o calidad de la materia prima, enzimas) y externos (luz, oxígeno, temperatura, pH, procesamiento, aditivos) que deben tomarse en consideración (Manchali *et al.*, 2012).

Debido a la falta de información sobre los pigmentos y otros compuestos bioactivos de los frutos de pitaya se estableció en la presente investigación, caracterizar 4 variedades de pitaya *S. stellatus* (blanca, amarilla, violeta y roja) del estado de Puebla y seleccionar una de ellas como potencial fuente de betalaínas.

2. Antecedentes y Estado del Arte.

2.1. Colorantes en alimentos.

Desde tiempos inmemoriales los seres humanos han asociado la calidad y seguridad de los alimentos con su color, que es el primer atributo que genera impacto en el consumidor, por ello, es una propiedad muy importante. En los alimentos el color se presenta de manera natural como resultado de la composición del mismo, sin embargo, puede verse alterado durante el procesamiento de los alimentos en mayor o menor grado dependiendo de la naturaleza del compuesto y las condiciones del proceso (Socaciu, 2008).

Por ello, a la mayoría de los alimentos se les adicionan colorantes para mejorar o mantener su color y una importante proporción del costo de producción se aplica para la preservación o adición de este (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

Un aditivo colorante de acuerdo con la FDA (Food and Drug Administration), es un colorante, pigmento u otra sustancia que es capaz de impartir color cuando se aplica a un alimento, drogas, cosméticos o para el cuerpo humano (Barrows *et al.*, 2003).

Los pigmentos son compuestos químicos que absorben la luz en la longitud de onda del espectro visible. El color producido se debe a una estructura molecular específica (cromóforo); dicha estructura captura la energía y la que no es absorbida se refleja o refracta para ser capturada por el ojo y el cerebro interpreta las señales como color (Hari *et al.*, 1994)

Históricamente, los organismos vivos fueron las primeras fuentes de colorantes alimenticios, seguidos de inorgánicos y sintéticos; hoy en día se prefieren los colorantes naturales.

2.1.1 Clasificación de los colorantes.

Los pigmentos se han clasificado utilizando diferentes sistemas (Cuadro 1), cada uno de ellos claramente definidos, pero relacionados entre sí; por ello, el mismo tipo de colorantes puede ser clasificado en diferentes grupos al mismo tiempo. La clasificación en base a su origen y legislación son los sistemas más importantes.

Cuadro 1. Sistemas de clasificación de colorantes.

Bases del sistema	Tipo de pigmentos agrupados	Características	Ejemplos
Origen	Natural	Compuestos orgánicos obtenidos de organismos vivos	Carotenoides, antocianinas
	Sintético	Compuestos orgánicos obtenidos por síntesis química	Colorantes FD&C
	Inorgánico	Encontrados en la naturaleza u obtenidos por síntesis	Óxido de titanio
Características químicas generales	Cromóforos con sistemas conjugados	Enlaces dobles múltiples, separados por solo un enlace simple	Carotenoides, antocianinas, betalainas, colorantes FD&C, lacas
	Compuestos metal-coordinados	Metal presente en su estructura química	Colores hemo (Mioglobina, hemoglobina, clorofila)
Característica estructural específica de los pigmentos naturales	Derivados de tetrapirrol	Compuestos con cuatro estructuras pirrol	Clorofila, colores hemo
	Carotenoides	Derivados de isoprenoides, la mayoría son polímeros de ocho monómeros de isoprenoides	Licopeno, caroteno, luteína
	Irinoides	Derivados de isoprenoides	Geniposido,
	Compuestos N-heterocíclicos	Contienen nitrógeno en su estructura química	Purinas, flavinas, betalainas
	Derivados de benzopiranos	Compuestos heterocíclicos oxigenados	Antocianinas y otros flavonoides
	Quinonas	La estructura química contiene el grupo funcional quinona	Benzoquinonas, antraquinonas
	Melaninas	Estructuras poliméricas obtenidas de monómeros nitrogenados	Eumelaninas
Legislación	Certificable	Sintetizados por el ser humano	Colorantes FD&C y lacas
	Exento de certificación	De origen natural (vegetal, mineral o animal) o contrapartes sintéticas	Jugo de uva, óxido de titanio, carmín, β -caroteno sintético

FD&C = colorantes certificados permitidos para su uso en alimentos, medicamentos y cosméticos. Delgado-Vargas *et al.*, 2000.

2.1.1.1 Colorantes sintéticos utilizados en alimentos.

Después de siglos de utilizar especias y pigmentos inorgánicos como colorantes alimenticios, los daños a la salud inducidos por estos, produjeron la limitación de su uso; eventualmente los colorantes inorgánicos fueron sustituidos por la introducción de los colorantes sintéticos; los cuales son pigmentos obtenidos por síntesis química. La primera legislación en esta materia permitía el uso de 80 colorantes sintéticos como colorantes alimenticios; este número se redujo a 16 en 1904 (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

Actualmente, los colorantes sintéticos son estrictamente evaluados y deben ser sometidos a un proceso de certificación por la FDA en Estados Unidos. Son ampliamente utilizados debido a que imparten un color intenso y uniforme, son baratos, no añaden sabores indeseables y sus mezclas permiten formar una gran variedad de tonos (FDA, 2010).

Debido a que se han encontrado indicios de diferentes efectos nocivos para la salud, se han prohibido una gran cantidad de sustancias químicas sintéticas que eran empleadas como colorantes principalmente aquellos que imparten tonalidades rojas (FDA, 2002). En la legislación más reciente existen solo 8 colorantes sintéticos permitidos en Estados Unidos que son: FD&C azul #1, azul #2, verde #3, rojo #3, rojo #40, amarillo #5, amarillo #6 y Rojo cítrico #2 (uso limitado) (FDA, 2015). Debido a una nueva orientación del consumidor por alimentos más naturales, el uso de colorantes sintéticos en alimentos ha disminuido.

2.1.1.2 Colorantes naturales usados en alimentos.

Son pigmentos que se encuentran en la naturaleza, se extraen por diferentes métodos y pueden ser de origen animal, vegetal o mineral. A pesar de su origen natural, estas sustancias deben de cubrir ciertas exigencias y pautas para su uso en alimentos. Los colorantes naturales son en general más caros, tienen menor poder de tinción, estabilidad y uniformidad de color que los sintéticos; además pueden afectar el aroma y sabor de los alimentos (Cubero *et al.*, 2002).

Algunas ventajas de los colorantes naturales sobre los sintéticos, es que poseen además de sus propiedades tintóreas, propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antimicrobianas (Khan *et al.*, 2012). Se considera que son seguros para el consumo diario, además que mejoran el valor nutricional de los alimentos debido a su poder antioxidante (Socaciu, 2008).

En la legislación de EE.UU. y de la UE algunos colorantes naturales son catalogados como exentos de certificación, pero deben ser respetadas, por quienes los elaboran y quienes los utilizan las especificaciones de identidad, pureza y limitaciones de uso descritas en las regulaciones. La FDA considera 30 colorantes permitidos para su aplicación en alimentos entre los que se pueden mencionar; cúrcuma, riboflavina, ácido carmínico, carotenos y betanina (Socaciu, 2008; Barrows, 2003).

En los últimos 20 años, se ha incrementado la sustitución de los colorantes sintéticos por colorantes naturales debido a sus beneficios a la salud, seguridad y una fuerte demanda del consumidor por alimentos más naturales, por ello se ha observado menor interés en el desarrollo de nuevos colorantes sintéticos y se han incrementado los esfuerzos para descubrir nuevos pigmentos naturales, y desarrollar procesos más eficientes de extracción y formulación de los colorantes naturales ya conocidos (Cai *et al.*, 2005; Socaciu, 2008).

El mercado para los colorantes alimenticios en el 2002 se estimó en mil millones de dólares, del cual, los colorantes naturales sólo representaron una tercera parte; con una tendencia al alza, es necesaria una inversión considerable en investigación y desarrollo tecnológico para mejorar la extracción y formulación de colorantes naturales (Socaciu, 2008).

El mercado de los colorantes naturales ha crecido mucho. Se estima que los requerimientos de colorantes exentos de certificación representan el 58 % del mercado global de los colorantes alimenticios (Downham y Collins, 2000), a un ritmo de crecimiento del 5 % anual, en 2016 se puede estimar un mercado de 986 millones de dólares.

Al día de hoy, el uso de productos químicos en la producción de alimentos es indeseable lo cual al reforzado el uso de productos naturales y generado la disminución del mercado de los colorantes sintéticos.

La FDA y la UE han sacado de la lista de colorantes aprobados para alimentos algunos colorantes sintéticos rojos (Rojo No 9 y No 4) (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002; FDA, 2015); lo cual ha propiciado un mayor interés en la investigación de fuentes naturales de pigmentos rojos como las antocianinas y betalaínas que son pigmentos hidrosolubles; las betalaínas son aún más hidrofílicas que las antocianinas y son capaces de mantener su color al ser sometidas a cambios de pH (Delgado *et al.*, 2000).

2.1.2 Color.

El color puede definirse como:

- 1) Impresión que producen en la retina los rayos de luz reflejados y absorbidos por un cuerpo, según la longitud de onda de estos rayos.
- 2) Atributo visual que se compone de una combinación cualquiera de componentes cromáticos y acromáticos (CIE, 2004).
- 3) Es una percepción humana de la luz reflejada por un objeto (Delmoro *et al.*, 2010).

De acuerdo con Wyszecki y Stiles (1982) el color percibido es: el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir diferencias entre dos campos de visión del mismo tamaño, forma y estructura, causada por diferencias en la composición espectral de la radiación incidente, de la capacidad del objeto para transformarla y de la fisiología del observador.

El mismo estímulo físico producirá diferentes respuestas en diferentes detectores (observadores), así la percepción del color se lleva a cabo en dos etapas. La primera incluye el proceso físico que requiere de tres elementos: una fuente de luz, un objeto, y el detector. La segunda es un proceso complicado y poco conocido donde los receptores del ojo transmiten la información que el cerebro interpretará como color (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

El color es un atributo de la apariencia de los productos que permite detectar ciertas anomalías y defectos (Abdullah *et al.*, 2004). Sin embargo existen

diferencias en la percepción del color incluso para un ojo entrenado, por ello la medición de color debe realizarse con equipos que permiten cuantificar la percepción humana del color, para ello, cada componente de la percepción del color debe ser representado numéricamente (Hunterlab 2015).

2.1.2.1 Atributos de color.

Cada color tiene tres elementos que lo caracterizan y distinguen de cualquier otro (Figura 1): (1) Hue (tono o matiz) es la forma en que normalmente identificamos el color de un objeto, rojo, verde, azul, los valores van de 0 – 360°. (2) Croma (saturación) es la claridad o pureza del color, describe lo llamativo o apagado de un color, puede entenderse como la intensidad de hue, los valores van de 0% (ninguna saturación del color) a 100% (máxima saturación). Un color saturado luce claro y brillante, mientras uno no saturado parece apagado. (3) Luminosidad es la luz reflejada por la superficie en comparación con una superficie blanca en condiciones de iluminación similares, indica el nivel de iluminación (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

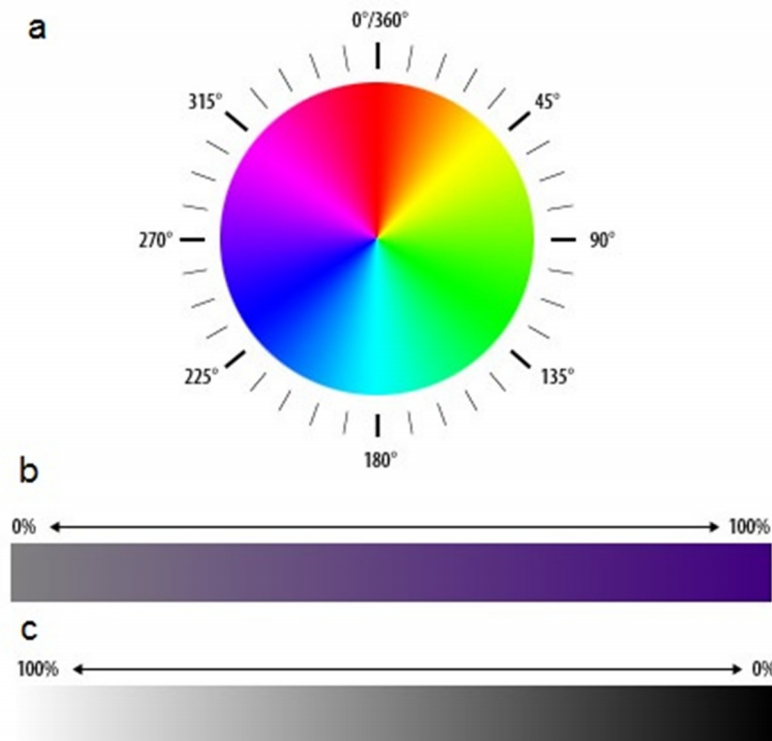


Figura 1. Atributos de color, a) hue, b) cromas, c) luminosidad (Adobe Systems Inc, 2000).

2.1.2.2 Sistemas de color.

La CIE o Commission Internationale de l'Eclairage (Comisión Internacional de la Iluminación) es la institución internacional responsable de las recomendaciones de fotometría y colorimetría. Los sistemas CIE usan tres coordenadas para ubicar un color en un espacio de color. Estos espacios de color incluyen CIE XYZ, CIE $L^*a^*b^*$ y CIE $L^*C^*h^\circ$.

La escala CIE $L^*a^*b^*$ o CIELAB es la más comúnmente utilizada, esta basada en la teoría de los colores opuestos. Esta teoría establece que los receptores en el ojo humano perciben los colores como pares opuestos (Figura 1).

Escala L: Luz contra oscuridad donde un número bajo (0-50) indica oscuridad y un número alto (51-100) indica luz.

Escala a: Rojo vs verde donde un número positivo indica rojo y uno negativo indica verde.

Escala b: Amarillo vs azul donde un número positivo indica amarillo y uno negativo indica azul (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002; Hunter y Harold, 1987; Saeed *et al.*, 2014).

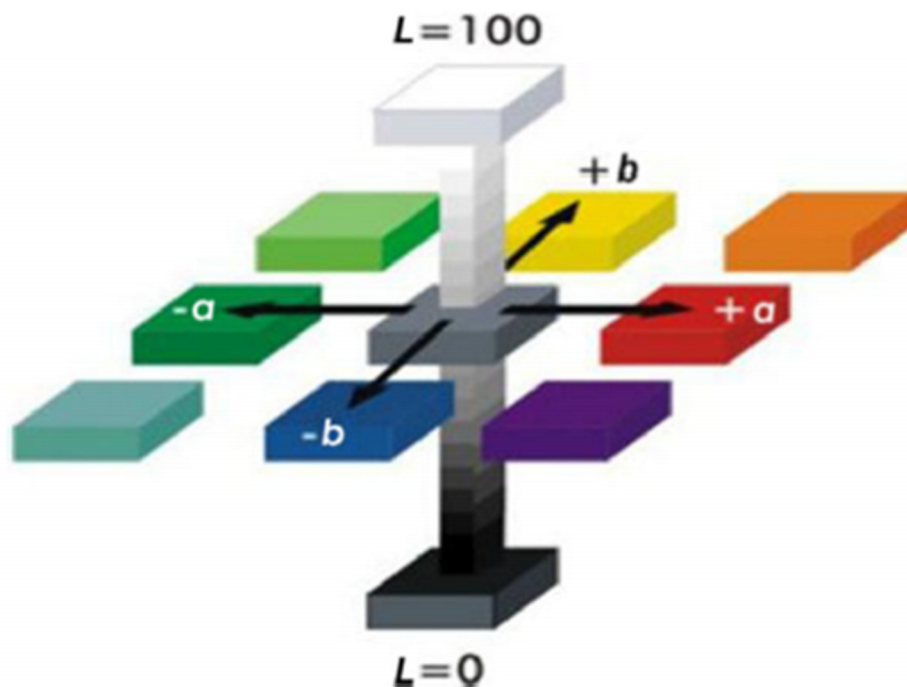


Figura 2. Espacio de color CIE Lab (Saeed *et al.*, 2014).

2.2 Betalaínas.

Las betalaínas reemplazan a las antocianinas en flores y frutas de muchas familias del orden *Caryophyllales* y se han encontrado también en algunos hongos mayores, son usadas en diferentes aplicaciones alimenticias debido a sus propiedades colorantes (Strack *et al.*, 2003). Las antocianinas y betalaínas son pigmentos hidrofílicos que no se encuentran presentes en las mismas fuentes vegetales; hasta el momento no se ha establecido si existe alguna ventaja en el proceso de biosíntesis de las betalaínas sobre las antocianinas o si existe alguna razón específica que explique la ausencia de las betalaínas en plantas productoras de antocianinas (Khan y Giridhar, 2015).

2.2.1 Fuentes de betalaínas.

Investigaciones recientes en filogenia molecular del orden *Caryophyllales* han propiciado la inclusión de 5 familias más que pueden considerarse fuentes de estos pigmentos aumentando el número a 17; las cuales son: *Achatocarpaceae*, *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Anacampserotaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didieraceae*, *Gisekiaceae*, *Halophytaceae*, *Lophiocarpaceae*, *Montiaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* y *Portulacaceae*, *Sarcobataceae*, *Stegnopermataceae* y *Talinaceae* (Khan y Giridhar, 2015). Se han estudiado muchos aspectos de estos pigmentos en los géneros *Beta*, *Amaranthus*, *Opuntia* e *Hylocereus* (Cai *et al.*, 2003; Ravichandran *et al.*, 2013; Schweiggert *et al.*, 2009; Stintzing *et al.*, 2005). En la Figura 3, se ilustran algunas fuentes de betalaínas.

Los frutos de cactáceas son consideradas una fuente de compuestos bioactivos y pigmentos, por ello se han realizado diferentes estudios sobre las betalaínas y sus propiedades para establecer las mejores condiciones para su extracción y aplicación; los frutos más estudiados son del género *Hylocereus* (Herbach *et al.*, 2007; Naderi *et al.*, 2010; Schweiggert *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006) y *Opuntia* (Cejudo-Bastante *et al.*, 2015; Moßhammer *et al.*, 2005a; Osorio-Esquivel *et al.*, 2011; Otálora *et al.*, 2015; Prakash y Manikandan, 2012). El género *Stenocereus* ha sido poco estudiado, no obstante que se caracteriza, al igual que *Opuntia* e *Hylocereus*, por la presencia de betalaínas.

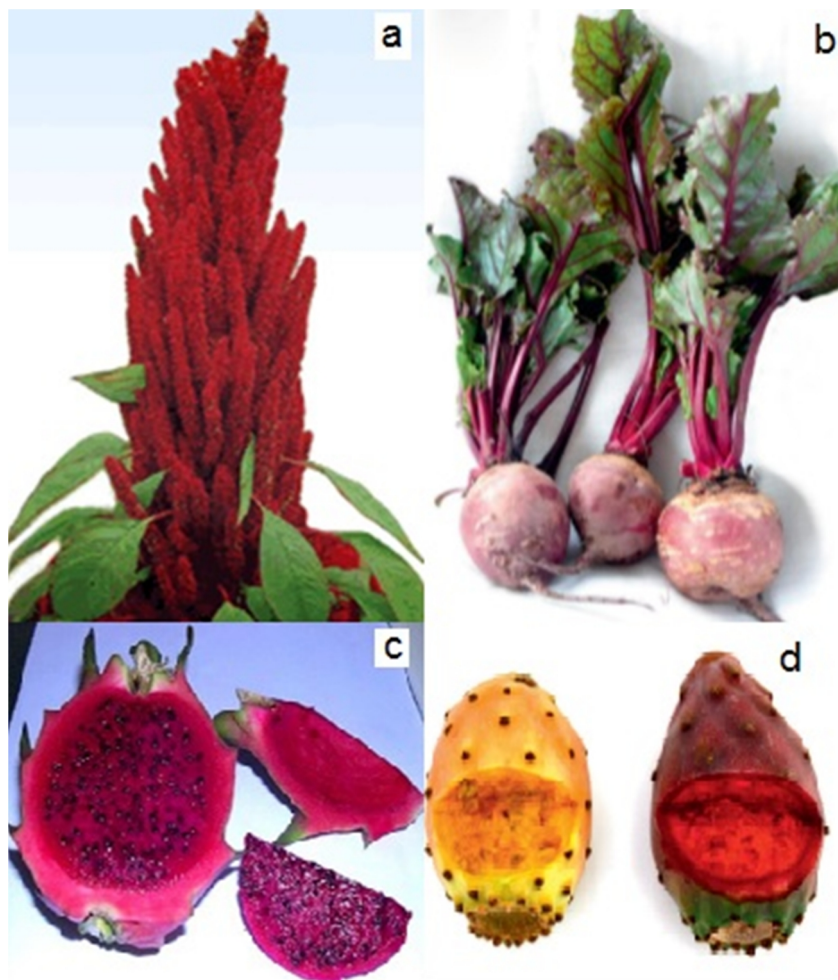


Figura 3. Diferentes fuentes de betalinas; a) amaranto, b) betabel (*Beta vulgaris*), c) pitahaya *Hylocereus* sp, d) tunas *Opuntia ficus-indica*.

Fuente: AMA, 2003; Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013; Esquivel y Araya, 2013.

2.2.2 Estructura química de las betalinas.

Las betalinas son pigmentos naturales hidrosolubles con nitrógeno en su estructura que se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. Las betalinas se dividen en dos grupos: betacianinas, que brindan tonalidades rojas y betaxantinas que proporcionan coloraciones amarillas (Strack *et al.*, 2003; Gandía-Herrero *et al.*, 2010).

El término betalina fue acuñado en 1968 para los pigmentos N- heterocíclicos amarillos y rojos de la tuna y el betabel. La betanina e indicaxantina fueron la primera betalina y betaxantina caracterizadas estructuralmente a partir del

betabel y tuna respectivamente. Posteriormente el término ácido betalámico (Figura 4a) fue propuesto para el compuesto cromóforo precursor de las betalainas (Stintzing y Carle, 2007).

Las betacianinas (Bc) son conjugados imonio del ácido betalámico y *ciclo*-dopa, que al condensarse dan origen a la betanidida (Figura 4b); la cual es la aglicona antecesora más común entre las Bc. La betanidida puede sufrir glicosilación y/o acilación de uno de los grupos hidroxilo (OH) del *ciclo*-dopa (Figura 4b) dando origen a diferentes Bc; como la betanina (Figura 5a) o la filocactina (Figura 5b).

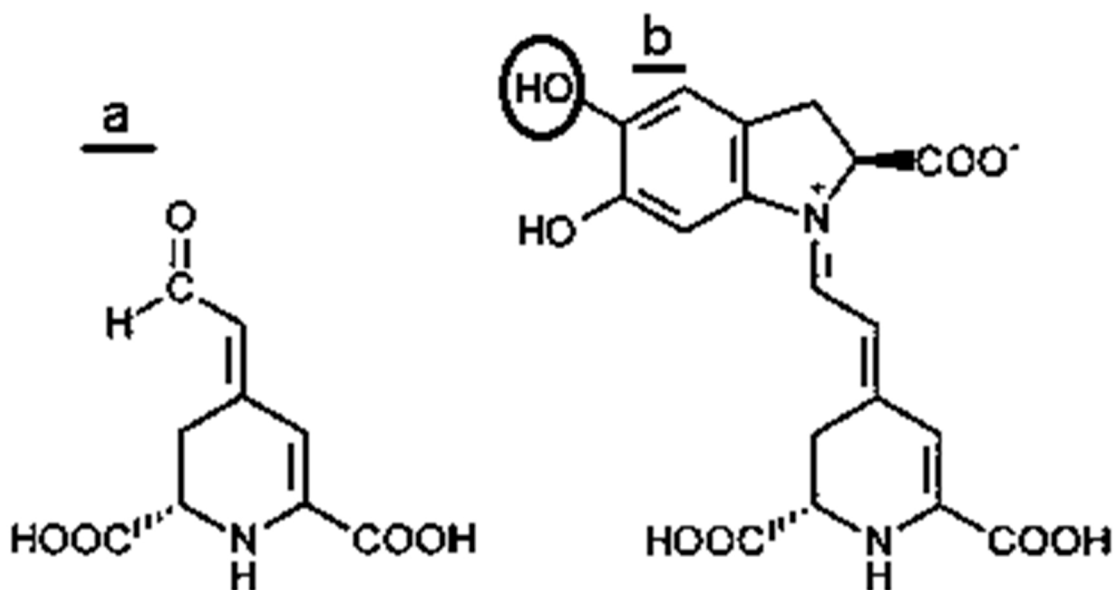


Figura 4. Ácido betalámico (a), betanidina (b).

Fuente: Strack *et al.*, 2003

La unidad de azúcar más común es la glucosa; también pueden estar aciladas con grupos sulfúrico, malónico, cítrico, *p*-cumárico, ferúlico, cafeíco y sinápico.

La betanidina es la unidad básica estructural de la mayoría de la betacianinas, seguida por su epímero C₁₅, la isobetanidina. Un considerable número de Bc pueden obtenerse mediante la glicosilación de uno de los grupos hidroxilo de la betanidina (Figura 4b) (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Strack *et al.*, 2003).

En la Figura 5 aparece la estructura básica de las Bc y se ilustran algunos sustituyentes (Strack *et al.*, 2003).

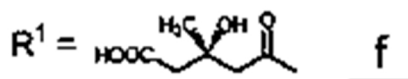
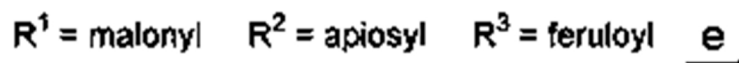
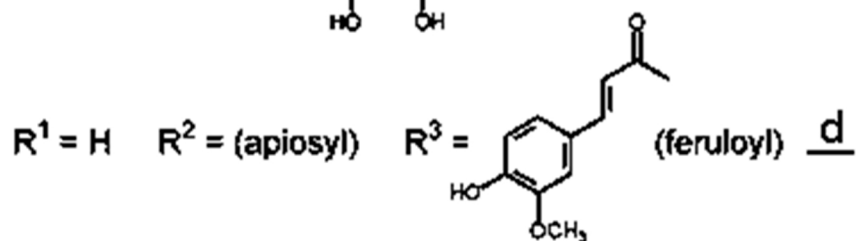
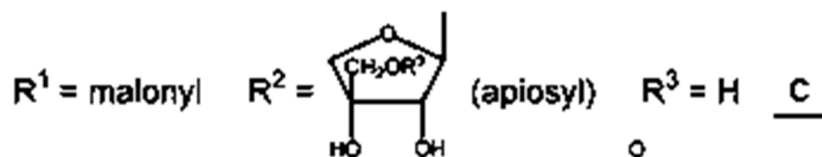
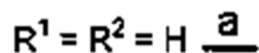
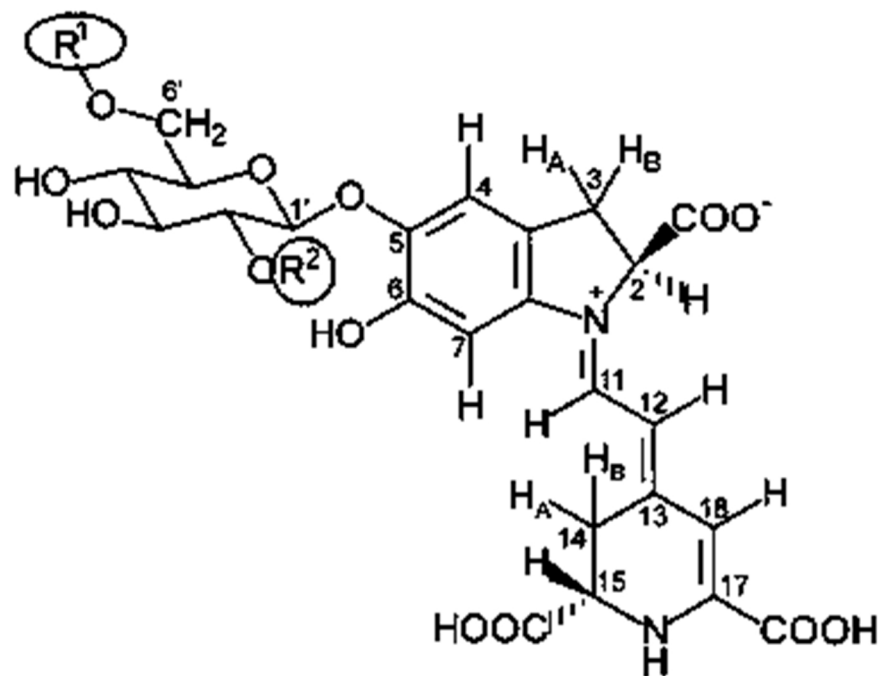


Figura 5. Betanina (a), filocactina (b), 2'-O-apiosil-filocactina (c), 2'-(5''-O-E-feruloilapiosil)betanina (d), 2'-(5''-O-E-Feruloilapiosil)filocactina (e), Hilocerényl (f).

Fuente: Strack *et al.*, 2003

Las betaxantinas (Bx) se forman mediante la condensación del ácido betalámico con aminoácidos proteínogénicos y no proteínogénicos, así como restos de aminas biogénicas conjugadas. Más de 200 aminoácidos presentes en plantas pueden formar Bx. En la Figura 6b se muestra la estructura de la indicaxantina, una de las Bx más comunes en los frutos de cactáceas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Las Bx tienen una estructura básica (Figura 6a) con dos sustituyentes, uno de ellos es usualmente un hidrógeno y R' es un amino o aminoácido. La indicaxantina (Figura 6b), contiene prolina y es la más representativa de este grupo (Strack *et al.*, 2003).

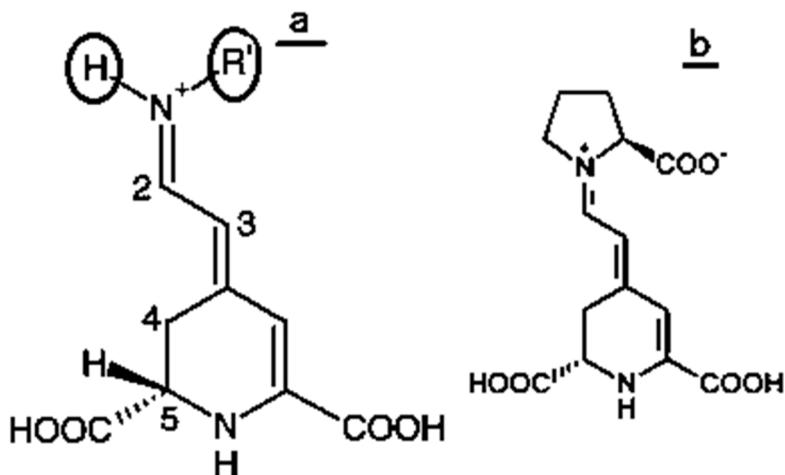


Figura 6. Estructura básica de las betaxantinas (a), indicaxantina (b).
Fuente: Strack *et al.*, 2003; Khan y Giridhar, 2015

2.2.3 Estabilidad de las betalainas.

Una limitante en la obtención, almacenamiento y aplicación de pigmentos naturales es su baja estabilidad en comparación con los sintéticos; esta depende de diferentes factores como la madurez de la fuente vegetal, su manejo post-cosecha, el proceso de extracción, la concentración del compuesto y otras. Dentro de los factores que afectan la estabilidad de las betalainas, tanto los internos como los externos deben tomarse en consideración (Manchali *et al.*, 2012).

Después de su extracción la estabilidad de las betalainas es afectada principalmente por factores como: pH, actividad de agua, exposición a la luz y oxígeno, iones metálicos, temperatura y actividad enzimática. Sin embargo, el pH

y la temperatura son los factores decisivos en la degradación de las betalaínas (Cai *et al.*, 2001; Ravichandran *et al.*, 2013; Güneser, 2016).

Se han realizado diversos estudios con soluciones de betalaínas purificadas, no purificadas y jugos para conocer la estabilidad del color en presencia de calor, luz, actividad de agua, iones metálicos y oxígeno (Harivaindaran *et al.*, 2008; Mobhammer *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2011; Naselli *et al.*, 2014).

Las betalaínas tienen mayor estabilidad a bajas temperaturas, en la oscuridad, con bajas actividades de agua (pigmento seco) y con ausencia de aire (Cai *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 2012), se ha reportado, una estabilidad de las betaxantinas (Bx) ligeramente mayor que en las betacianinas (Bc) en algunos casos (Cai *et al.*, 2001).

La Figura 7 muestra los factores que afectan la estabilidad de las betalaínas (Socaciu, 2008).

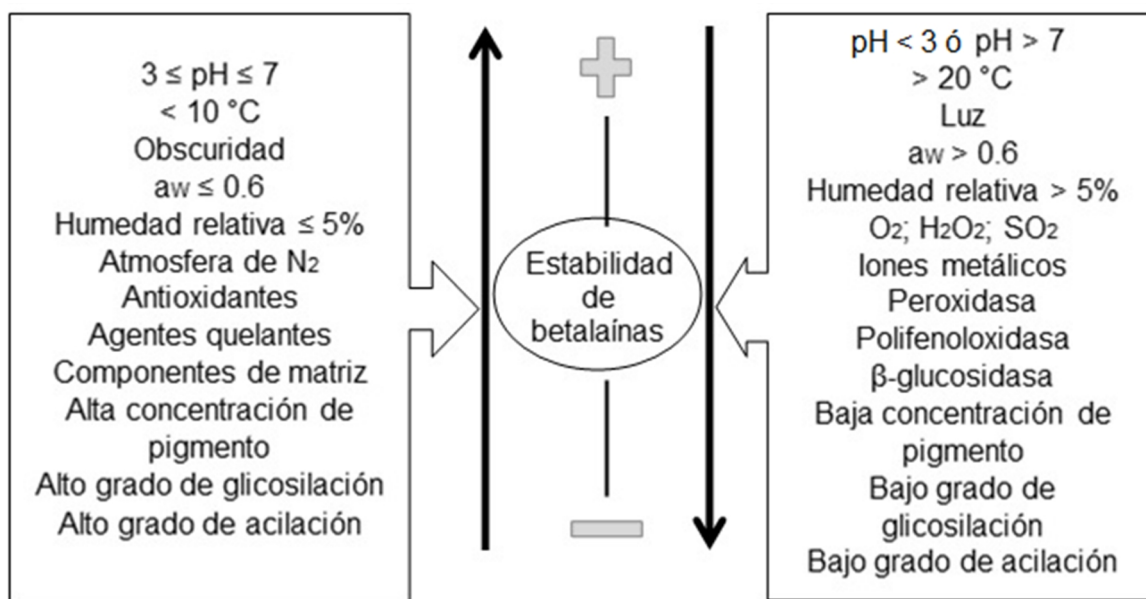


Figura 7. Factores que afectan estabilidad de las betalaínas.

Fuente: Socaciu, 2008.

La estabilidad es la mayor preocupación al utilizar betalaínas como colorante. Los cambios en el pH afectan la intensidad del color y se ha demostrado que las betalaínas en solución muestran mayor estabilidad a valores de pH cercanos al de la matriz de origen. La termoestabilidad también depende del pH, es parcialmente

reversible y sigue una cinética de reacción de primer orden; además se ha propuesto que el primer paso de la degradación térmica es el ataque nucleofílico en la estructura >N+=CH- de la betanina (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

2.2.4 Actividad biológica de las betalaínas.

El consumo de betalaínas es seguro para el ser humano, además de actuar como micronutrientes en el organismo por lo cual las betalaínas, son considerados potentes antioxidantes (Cai *et al.*, 2003), diversos estudios *in vitro* resaltan su actividad contra radicales libres y muestran su capacidad citotóxica en diversos cultivos celulares (Khan, 2016) también son reconocidas por otras importantes actividades biológicas, tales como la inducción de la quinona reductasa, potente enzima de detoxificación en la quimio prevención del cáncer (Azeredo, 2009) y su actividad antiproliferativa de células de melanoma maligno (Wu *et al.*, 2006).

Otros efectos benéficos a la salud vinculados al consumo de cactaceas, son sus propiedades anti-cancerígenas, anti-virales, anti-microbianas, anti-inflamatorias, anti-diabéticas, diurético, hepatotrotector, neuroprotector, radioprotector, alivio del dolor osteoartrítico además de efectos en la reducción de colesterol y triglicéridos en la sangre (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Feugang, 2006; Khan, 2016).

2.2.5 Métodos de análisis de betalaínas.

2.2.5.1 Extracción.

El proceso de extracción de cualquier metabolito de interés es siempre un proceso complejo y de vital importancia en los estudios científicos.

Las betalaínas se obtienen generalmente a partir de los frutos macerados, realizando extracciones con agua y/o soluciones de metanol o etanol, para realizar una extracción completa (20-50%) (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Castellar *et al.*, (2006) han reportado que los extractos acuosos presentan mayor extracción de pigmentos de tunas que los extraídos con etanol: agua (80:20 v·v⁻¹). Por otro lado, Strack *et al.*, (2003) reportan que con una ligera acidificación del medio de extracción mediante la adición de ácido ascórbico (50mM) mejora la estabilidad de las betalaínas y evita la oxidación por efecto de la polifenoloxidasas.

Los extractos obtenidos, contienen una gran cantidad de azúcares y su poder tintóreo es bajo. En algunos casos se recomienda realizar un calentamiento (70 °C, 2 min) para la inactivación de enzimas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

2.2.5.2 Separación y purificación de betalaínas.

Las metodologías comúnmente utilizadas para la separación y purificación de betalaínas aparecen en el Cuadro 2.

Las separaciones analíticas incluyen electroforesis, cromatografía de capa fina, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta resolución.

Cuadro 2. Metodologías de separación y purificación de betalaínas.

Metodología	Características
Electroforesis	Soporte: papel Solventes: piridina, ácido fórmico o acético Voltaje: $5.6V \cdot cm^{-1}$ Temperatura: 4°C
Electroforesis capilar de zona	Soporte: sílice fundida Voltaje: 22kV Temperatura: 18°C Se obtiene la separación de formas isoméricas como betanina e isobetanina además de agliconas
Cromatografía de capa fina	Soporte: celulosa Solventes: isopropanol-etanol-agua-ácido acético 6:7:6:1 $v \cdot v^{-1}$ y 11:4:4:1 $v \cdot v^{-1}$ Los acidos facilitan la separación de las betalaínas.
Cromatografía de intercambio iónico	Soporte: dietilaminoetil celulosa Solventes: isopropanol-agua-ácido acético 13:4:1 $v \cdot v^{-1}$ Buena separación de betaxantinas
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Soporte: Fase reversa C_8 o C_{18} Solventes: agua-metanol, agua-acetonitrilo, acidificadas con ácido acético, fórmico o fosfórico.

Fuente: Delgado-Vargas *et al.*, 2000, Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002.

Las propiedades cromatográficas y electroforéticas de los compuestos aislados pueden compararse con la literatura para obtener su identificación tentativa (Steglich y Strack, 1991).

El análisis por HPLC en fase reversa ha sido el método más utilizado para la separación de betalaínas (Trezza y Zrýd, 1991); se ha observado gran concordancia entre los resultados obtenidos de la cuantificación de betalaínas por electroforesis capilar de zona y la determinación por HPLC (Stuppner y Egger, 1996)

2.2.5.3 Caracterización de betalaínas.

Las betalaínas al igual que otros pigmentos presentan un valor de absorción máxima en la región visible del espectro ultravioleta y esto las caracteriza, por lo cual las modificaciones estructurales pueden estudiarse con espectroscopia UV-vis. Además, la cuantificación de pigmentos se ha realizado aplicando modelos matemáticos asociados con espectroscopia Uv-vis. Este procedimiento es rápido, preciso y no es necesario realizar la separación de las betalaínas (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

Las técnicas analíticas han avanzado mucho, actualmente es posible realizar prácticamente al mismo tiempo la separación y caracterización de las betalaínas gracias al acoplamiento de los análisis por HPLC con detector de arreglo de diodos (DAD), espectroscopia de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (NMR) (Nemzer *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2015). El Cuadro 3 muestra algunas técnicas aplicadas en la caracterización de betalaínas.

2.2.6 Obtención de betalaínas para su aplicación como colorante.

Las preparaciones comerciales de betanina de betabel usada como colorante en alimentos están disponibles como jugo concentrado o polvos. Estas preparaciones contienen de 0.3 a 1 % de pigmento. Muestran variación de color dependiendo de la cantidad de betaxantinas presentes y pueden aportar olor y sabor a betabel (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002).

A escala de laboratorio las betalaínas pueden extraerse mediante extracción sólido-líquido, osmosis inversa o ultra-filtración (Azeredo, 2009).

Cuadro 3. Pruebas químicas y metodologías para la caracterización de betalaínas.

Método	Resultados obtenidos
Espectroscopia UV-Visible	Betacianinas rojo-violeta: λ_{\max} cercana a 540 nm Betaxantinas amarillo: λ_{\max} cercana a 480 nm
Hidrólisis de betacianinas	
Ácida: 22 % HCl, 80 °C, 5 min	Se obtienen mezclas de agliconas en dos formas isoméricas, epímeros 15R y 15S (betanidina e isobetanidina)
Enzimática: Regulador acetato de sodio pH 5, β -glucosidasa 1 mg / mL	Se produce el isómero 15S (betanidina)
Hidrólisis de betaxantinas HCl 1N o amoníaco 0.6 N acuoso	Se produce ácido betalámico y aminoácidos libres
Calentamiento (85 °C con KOH a pH 10.5)	La betanina se divide en ácido betalámico y <i>cyclo</i> -DOPA 5-O-glucósido
Fusión alcalina (KOH al 5 % en solución acuosa)	La betanidina se divide en 4-metilpiridina-2,6-ácido dicarboxílico, 5,6-dihidroxi-2,3-dihidroxi indol y ácido fórmico; estos fragmentos revelan la estructura de carbono. La betanidina produce betanina-isobetanina en relación 3:2, mientras con isobetanina la relación es 2:3.
Parametros de color CIELAB	En algunos cultivares de betabel, los valores de b* pueden utilizarse para obtener una estimación de la relación betaxantina-betacianina.

Fuente: Delgado-Vargas *et al.*, 2000, Delgado-Vargas y Paredes-López, 2002.

2.2.6.1 Métodos de extracción.

La extracción de compuestos naturales debe realizarse bajo condiciones que permitan obtenerlos conservando sus características bioactivas. El método de extracción ideal debería ser cuantitativo, no destructivo y rápido (Yang *et al.*, 2011).

Existe un bajo nivel de extracción comercial de betalaínas, esto puede deberse al hecho de que las betalaínas tienen poca estabilidad por lo cual se presentan pérdidas significativas durante el procesamiento; además solo las betacianinas se

consideran económicamente viables porque la pérdida de betaxantinas durante la extracción es mayor que la de betacianinas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Herbach *et al.*, 2006). Esto muestra la necesidad de mejoras tecnológicas en la extracción y procesamiento de las betalaínas para minimizar la pérdida de pigmentos (Khan *et al.*, 2015).

2.2.6.1.1 Métodos convencionales.

Es la forma tradicional de extracción de compuestos bioactivos de tejidos vegetales; (maceración, reflujo, extractor soxhlet, destilación) usualmente requieren tiempos de extracción entre 8 – 24h, tienen bajos rendimientos y alto consumo energético, pero siguen siendo populares debido a que es fácil ejecutarlos y tienen un bajo costo inicial de operación (Yang *et al.*, 2011). Los métodos de extracción no convencionales son más amigables con el medio ambiente debido a que reducen el uso de químicos y tiempos de extracción, además mejoran el rendimiento y la calidad del extracto.

2.2.6.1.2 Métodos no convencionales.

Durante los últimos años se han desarrollado nuevas metodologías con la finalidad de mejorar el rendimiento y la selectividad de la extracción de compuestos bioactivos tales como ultrasonido, altas presiones, pulsos eléctricos, digestión enzimática, extrusión (Freitas *et al.*, 1997) calentamiento por microondas y fluidos supercríticos (Azmir *et al.*, 2013).

2.2.6.1.2.1 Ultrasonido.

El ultrasonido es un tipo especial de onda sonora. Su frecuencia se encuentra entre 20 – 100 MHz, más allá de la audición humana. Al pasar por un medio genera compresión y expansión, dando lugar al fenómeno de cavitación que significa creación, crecimiento y colapso de burbujas. Al aplicar ultrasonido, se presentan dos fenómenos: (1) difusión a través de la pared celular y (2) lavado del contenido celular una vez que las células se han roto (Azmir *et al.*, 2013). El ultrasonido se ha estudiado para extraer pigmentos naturales de betabel y otras

fuentes vegetales (Sivakumar *et al.*, 2009; Sivakumar *et al.*, 2011) además de antocianinas y compuestos fenólicos de uvas (Ghafoor *et al.*, 2011).

2.2.6.1.2.2 Microondas.

Las microondas son campos electromagnéticos en un intervalo de frecuencia de 300 MHz a 300GHz. El principio de calentamiento con microondas se basa en su impacto directo sobre materiales polares (Letellier y Budzinski, 1999). Se supone que la extracción asistida por microondas se desarrolla en tres etapas secuenciales descritas por Alupului *et al.*, (2012): La primera etapa consiste en la separación de los solutos de los sitios activos de la matriz debido al incremento de temperatura y presión; en la segunda, ocurre la difusión del disolvente a través de la matriz; y tercera, la liberación de solutos de la matriz al disolvente. La extracción con microondas se ha aplicado para obtener polifenoles en cítricos, granos de arroz (Nayak *et al.*, 2015; Setyaningsih *et al.*, 2015); pigmentos de microalgas (Pasquet *et al.*, 2011), como pretratamiento en la extracción de astaxantina de *Phaffia rhodozyma* (Villalobos-Castillejos *et al.*, 2013) y en la extracción de betalaínas de betabel (Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

2.2.6.1.2.3 Hidrólisis enzimática.

Hay compuestos que no pueden obtenerse mediante una extracción con disolventes porque son retenidos en la red polisacáridos-lignina, por lo que el pretratamiento enzimático se ha considerado una forma efectiva de liberarlos. La adición de celulasa, α -amilasa y pectinasa, mejora la extracción al romper las paredes celulares e hidrolizar estructuras de polisacáridos y cuerpos lipídicos (Rosenthal *et al.*, 1996; Puri *et al.*, 2012). Factores como: la composición y la concentración de la enzima, el tamaño de partícula de los materiales vegetales, la relación sólido-agua y el tiempo de hidrólisis, son claves en la extracción (Azmir *et al.*, 2013).

Las cactáceas se caracterizan por contener altas cantidades de mucílago, por lo cual, su procesamiento es particularmente difícil, generando bajos rendimiento en la extracción de jugos o pulpa. Se han aplicado enzimas pectinolíticas y celulolíticas en la degradación parcial del mucilago para obtener buenos

rendimientos en jugos de frutas de los géneros *Hylocereus sp.*, y *Opuntia spp.* Además, se ha propuesto el uso de enzimas en el procesamiento de pulpas para reducir la viscosidad y aumentar la retención de betalaínas (Schweiggert *et al.*, 2009).

La hidrólisis enzimática se ha estudiado para extraer compuestos fenólicos a partir de desperdicios de uva (Gómez-García *et al.*, 2012), residuos sólidos de frambuesa (Laroze *et al.*, 2010) y betalaínas en frutas del género *Hylocereus* (Naderi *et al.*, 2010; Schweiggert *et al.*, 2009).

2.2.6.1.2.4 Aplicación de pretratamientos.

Se ha aplicado la hidrólisis enzimática como tratamiento previo a la extracción con disolventes para mejorar los rendimientos de extracción de licopeno, polifenoles y antocianinas (Puri *et al.*, 2012), pero no así para la obtención de betalaínas.

La fermentación de jugo de tunas con *Sccharomyces cerevisiae*, permite obtener un líquido concentrado con baja viscosidad, sin azúcares libres y con incrementó del rendimiento de extracción (Castellar *et al.*, 2008).

2.3 Fenoles.

Los compuestos polifenólicos son un grupo complejo de sustancias y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son compuestos orgánicos aromáticos que contienen el grupo hidroxilo como su grupo funcional (Hounsome *et al.* 2008). Son el grupo más grande de metabolitos secundarios presentes en el reino vegetal, con diferentes subclases y gran variedad de compuestos en cada clase. Esta gran variedad se debe a los procesos de glicosilación de los esqueletos de aglicona y la acilación de los glucósidos (Cuyckens y Claeys, 2004). Los compuestos más reconocidos son los ácidos fenólicos, flavonoides y flavonoides polimerizados (Erdman *et al.*, 2007).

En las plantas, los compuestos fenólicos están presentes en diferentes tejidos vegetales; en general, solo una pequeña fracción de ácidos fenólicos se encuentran de forma libre, mientras la mayor parte se encuentra unido a celulosa, lignina, proteínas o conjugados con azúcar, flavonoides, entre otras sustancias (Stalikas 2007).

Cuadro 4. Clasificación de compuestos fenólicos.

Clasificación		Ejemplos
Clase	Subclase	
Fenoles simples		Catecol, resorcinol, hidroquinona
Ácidos fenólicos		
	Ácidos hidroxibenzoicos	Ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido protocatéquico
	Ácidos hidroxicinámicos	Ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico
Cumarinas		Umbeliferona
Flavonoides		
	Flavonoles	Quercetina, kaempferol, miricetina, rutina
	Isoflavonas	Genisteína
	Flavononas	Hesperidina, naringenina
	Flavanonoles	Taxifolina
	Flavan-3-oles	Epicatequina, catequina
	Flavonas	Apigenina, luteolina
Chalconas		Buteina, xanthohumol
Antocianinas		Cianidina 3-O-glucósido
	Antocianidinas	Cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina
Quinonas		
	Ubiquinonas	Coenzima Q10
	Antraquinonas	Emodin
Xantonas		Mangostin, alfa-mangostin, gama-mangostin
Estilbenos		Resveratrol

Harnly *et al.*, 2007; Haminiuk *et al.*, 2012; Peñarrieta *et al.*, 2014

Fukuji *et al.*, (2010), evaluaron el contenido de fenoles en 3 frutas y encontraron que solo se presentan pequeñas cantidades en forma de ácidos fenólicos libres. La baja prevalencia de fenoles libres ha propiciado el desarrollo de diferentes procedimientos de hidrólisis; sin embargo, estos generan pérdidas de ácidos fenólicos, especialmente los hidroxibenzoicos (Nardini *et al.*, 2002).

El análisis de compuestos fenólicos es complicado debido a que se encuentran presentes en todos los vegetales en una gran variedad de formas. Por lo cual, existen cientos de métodos analíticos publicados (De Rijke *et al.*, 2006); solo para flavonoides se han realizado más de 300 papers en 5 años. En casi todas las investigaciones se plantean estrategias para el tratamiento, extracción, y limpieza

de muestras; las condiciones para el análisis instrumental por cromatografía de líquidos, cromatografía de gases y/o cromatografía en capa fina y la aplicación de detector UV con arreglo de diodos, espectrometro de masas y/o resonancia magnética nuclear para separar, identificar, cuantificar y finalmente caracterizar estructuralmente los compuestos de interés (De Rijke *et al.*, 2006; Ignat *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011).

La cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos presenta diferentes complicaciones asociadas con las técnicas de determinación. En primer lugar, debido al proceso de extracción y los disolventes utilizados para la extracción, después por la selección del reactivo y/o longitud de onda. Estos y otros factores generalmente llevan a una sobreestimación del contenido de fenoles (Robards y Antolovich, 1997). Que se debe a compuestos no fenólicos presentes en el extracto que interfieren con el análisis espectrofotométrico, principalmente proteínas y azúcares. Por ello se han realizado estudios de las interferencias y modificaciones a las técnicas de análisis (Escarpa y González 2001).

Por otro lado, la caracterización de compuestos fenólicos requiere de métodos integrales, rápidos y con adecuada información espectral; este tipo de métodos pueden describirse como métodos de “perfilado”. El método de perfilado ideal; debe ser simple, detectar todos los compuestos presentes, proveer la mayor cantidad de información posible para cada pico del cromatograma; con el propósito de identificación, evaluación estructural y cuantificación, además que debe conseguirse todo en una corrida cromatográfica. En un método de perfilamiento, el tiempo de preparación adicional y la potencial pérdida de componentes son indeseables (Harnly *et al.*, 2007).

Sakakibara *et al.*, (2003) desarrollaron un método de cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos para la identificación de fenoles (100 compuestos de 11 subclases de fenoles) en vegetales, frutas y té; basado en tiempos de retención y espectro UV/vis. La cuantificación se realizó con hidrólisis ácida y agliconas como estándar externo.

La Figura 8, muestra un cromatograma para la elución de diferentes compuestos fenólicos en una columna C-18, realizado con gradiente de elución realizado con:

Solución A, regulador fosfato de sodio – metanol 10% y solución B, metanol 70% (Sakakibara *et al.*, 2003). Existe traslape en la elución de las diferentes subclases de fenoles, lo cual hace imposible obtener un orden de elución simple; pero es posible realizar algunas generalizaciones.

Los ácidos fenólicos generalmente eluyen primero y las agliconas y flavonoides polimetoxilados al final. El sitio de unión del enlace glicosídico afecta los tiempos de retención. El tipo de glicósido afecta el tiempo de retención para la misma aglicona y el mismo sitio de unión. Con los mismos glicosidos en la misma posición, el orden de elución es flavanonas, flavonoles y flavonas. El tiempo de retención para los flavonoides esta inversamente relacionado con el grado de glicosilación (Cuyckens y Claeys, 2004; Schieber *et al.*, 2001).

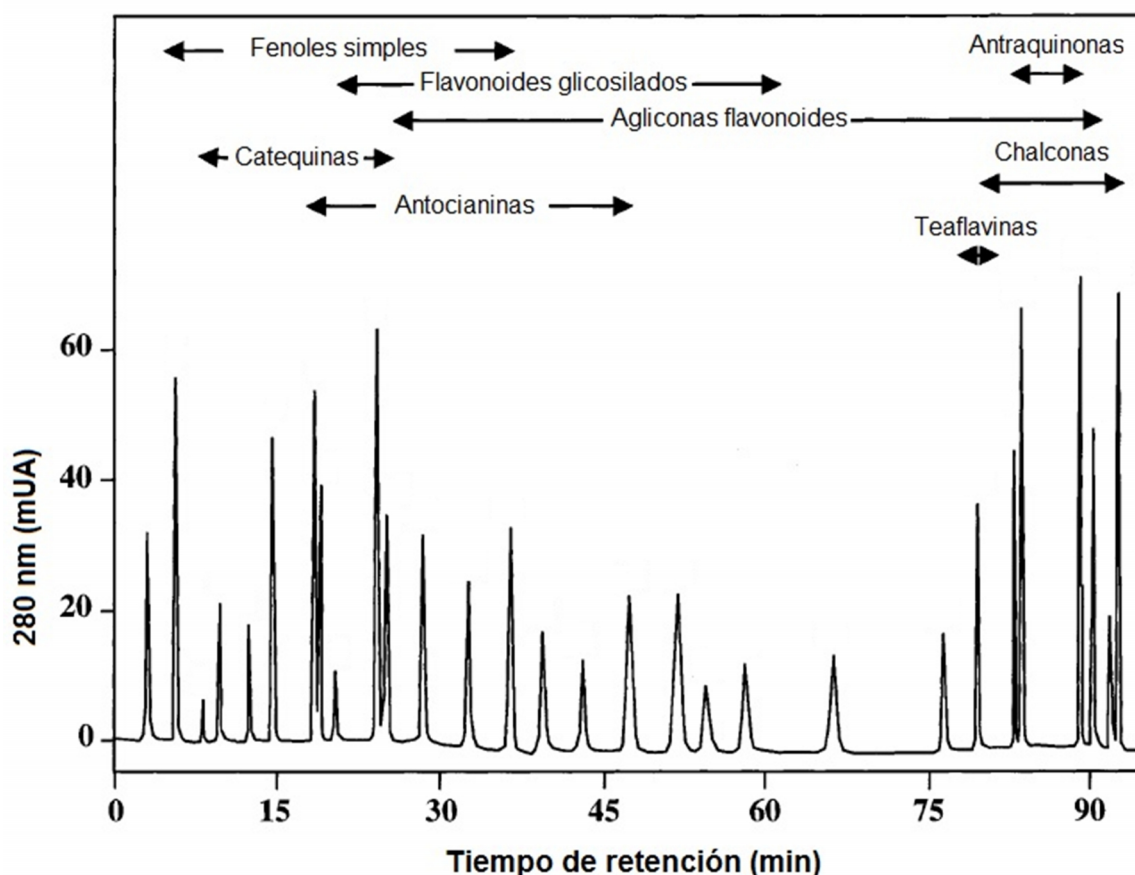


Figura 8. Perfil típico de elución de fenoles a 280 nm mediante cromatografía líquida de alta resolución, detector UV con arreglo de diodos en columna C-18 y gradiente de elución. El orden general de elución se presenta en la imagen.

Fuente: Sakakibara *et al.*, 2003

Las propiedades de absorción UV/vis pueden ser utilizados para distinguir las diferentes subclases de fenoles. En muchas ocasiones, los coeficientes de absorción de los compuestos y la máxima longitud de absorción no cambian significativamente con la glicosilación (Harnly *et al.*, 2007).

Entre los compuestos fenólicos de los productos vegetales se ha identificado un gran abanico de sustancias con un amplio espectro de actividades funcionales. Existe interés por sus potenciales efectos benéficos para la salud, otorgados por su actividad antioxidante y capacidad antimicrobiana (Lizada, 1993; Hobson, 1993). Esta bioactividad está relacionada con la capacidad de quelar metales, la inhibición de la lipoxigenasa y neutralización de radicales libres. La concentración de estos compuestos es más alta en las frutas, en donde han sido identificados más de 8000 polifenoles y el número sigue en aumento (Harborne *et al.*, 1999).

2.4 Antioxidantes.

Los antioxidantes son moléculas que tienen la capacidad de estabilizar a los radicales libres, neutralizando sus efectos dañinos; pueden ser de origen endógeno (sintetizados por el organismo) y exógeno (provenientes de fuentes externas) (Uttara, *et al.*, 2009).

Un antioxidante dietético o exógeno es una sustancia que forma parte de los alimentos y que puede prevenir los efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales del organismo humano (Patthamakanokporn *et al.*, 2008).

Los antioxidantes exógenos y endógenos (enzimáticos y no enzimáticos) forman el sistema de defensa antioxidante; su función es retrasar o prevenir significativamente la oxidación de proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. El antioxidante actúa sacrificando su propia identidad molecular para evitar las alteraciones de otras moléculas o compuestos (Venéreo, 2002).

2.4.1 Radicales libres.

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo. Son muy reactivos, tienen una vida media corta (de microsegundos), por lo que actúan cercano al sitio en que se

forman. Un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante la reacción en cadena (Cheesman y Slater, 1998; Coronado *et al.*, 2015).

Se producen en la cadena respiratoria, la cadena de transporte de electrones, en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación del metabolismo humano, y también por contaminantes ambientales, radiaciones, consumo de sustancias tóxicas (Coronado *et al.*, 2015).

Muchas enfermedades son resultado de la activación de radicales libres, considerado un mecanismo de destrucción de la membrana celular. La inducción de radicales libres ocurren durante el proceso inflamatorio, problemas cardiovasculares, cáncer, reacciones alérgicas entre otras (Urias-Orona *et al.*, 2010).

2.4.2 Estrés oxidativo.

El oxígeno es esencial para la vida humana; paradójicamente este elemento también está involucrado en reacciones tóxicas siendo una amenaza para la salud humana. Se cree que los efectos más dañinos del oxígeno provocan la formación y actividad de especies reactivas de oxígeno (Roberfroid, 1996).

El estrés oxidativo es un término asociado a las células y a la acción de un radical libre que le afecta, (Reyes *et al.*, 2011) en condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno). Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. Cuando se rompe el equilibrio, éste se podrá asociar con un déficit del sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de radicales libres (Quintanar y Calderón, 2009; Coronado *et al.*, 2015).

2.5 Estudios sobre compuestos bioactivos en cactáceas.

La investigación sobre los frutos de cactáceas se debe a su potencial como fuente de diversos fitoquímicos y pigmentos (betalaínas) para la industria alimentaria (Hounscome *et al.*, 2008; Tenore *et al.*, 2012).

Se han atribuido diversas e importantes funciones biológicas a los compuestos bioactivos presentes en los frutos de cactáceas, los cuales varían en cuanto a su composición y concentración, además de su actividad. En los Cuadros siguientes

se muestran algunos estudios realizados *Opuntia* (Cuadro 5), *Hylocereus* (Cuadro 6) y *Stenocereus* (Cuadro 7).

En el caso del género *Opuntia*, las investigaciones están muy encaminadas a la caracterización de pigmentos y otros compuestos bioactivos, así como a procesos encaminados a mejorar su estabilidad.

El número de estudios referentes al género *Stenocereus* es más escaso, respecto a los géneros anteriormente mencionados; sin embargo, en años recientes se ha incrementado el número de investigaciones relativas a dicho género.

2.5.1 Pitaya.

Las especies del género *Stenocereus* producen en su mayoría frutos comestibles conocidos como “pitayas” voz de origen quechua que significa fruta escamosa, son cactáceas columnares que crecen en zonas áridas y semiáridas del país.

Las pitayas son originarias del continente americano; el género *Stenocereus* incluye 24 especies distribuidas desde el suroeste de los Estados Unidos hasta Venezuela y Perú, en México se encuentra la mayor cantidad de especies, reportándose 19 de las 24 especies reportadas del género *Stenocereus* (Bravo y Sánchez, 1991).

Las pitayas son apreciadas en los lugares de producción debido a su delicioso sabor y la variedad de atractivos colores. La distribución geográfica del género *Stenocereus* está restringida al continente americano, con una gran diversidad de especies; algunas de ellas endémicas del centro de México (Ceballos 2003; Casas *et al.*, 1999).

Stenocereus stellatus es un cactus columnar endémico del centro de México; crece de manera silvestre o cultivada en jardines caseros y áreas productivas. Durante los meses de agosto y septiembre es la temporada de cosecha de estas frutas, que crecen en altitudes de 600 a 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y con precipitaciones entre 300 a 800 mm/año (Casas *et al.*, 1997; Casas *et al.*, 1999).

Cuadro 5. Investigaciones en cactáceas del género *Opuntia*.

Autor y año	Tema del estudio	Principales resultados
Naselli <i>et al.</i> , 2014	Actividad del extracto crudo e indicaxantina aislada de <i>Opuntia ficus-indica</i> amarilla en células de cáncer colorectal.	El extracto crudo y la indicaxantina presentes en la tuna causaron una apoptosis dosis dependiente de células cancerosas con una IC ₅₀ de 400mg de pulpa fresca mL ⁻¹ y 115µM respectivamente. La indicaxantina es responsable del 80 % del efecto del extracto crudo.
Prakash y Manikandan, 2012	Optimización de la extracción acuosa de pigmentos de tunas (<i>Opuntia ficus-indica</i>).	Las condiciones óptimas para la extracción acuosa de betalaínas; fueron 40°C, 115min, 1.44g de muestra. Con dichas condiciones se obtuvo un contenido de betacianinas y betaxantinas de 13.43 y 24.29 mg·100 g ⁻¹ respectivamente.
Yahia y Mondragón-Jacobo, 2011	Componentes nutricionales y capacidad antioxidante de diez cultivares de tunas (<i>Opuntia</i> spp).	Se determinó el contenido de betalaínas totales entre 1000–6000 µg·100g ⁻¹ _{PF} , carotenoides totales de 0.1-5mg·100g ⁻¹ _{PF} , ácido ascórbico de 1200-4000µg·100g ⁻¹ _{PF} , contenido de fenoles totales de 10-130mg de ácido gálico·g ⁻¹ _{PF} y capacidad antioxidante de 1000-2500mM Fe ⁺² ·g ⁻¹ _{PS} . La variedad 'Camuesa' presentó el mayor contenido en betalaínas, β-caroteno, carotenoides totales y ácido ascórbico; 'Naranjona' y 'Camuesa' el más alto contenido de fenoles totales. 'Roja Pelota' y Camuesa la mayor capacidad antioxidante.
Osorio-Esquivel <i>et al.</i> , 2011	Fenoles, betacianinas y actividad antioxidante en frutas de <i>Opuntia joconostle</i> .	Se analizó el contenido de fenoles y pigmentos de diferentes partes del fruto; el pericarpio presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides 2.07mg de ácido galico·g ⁻¹ _{PF} y 0.46mg de catequina·g ⁻¹ _{PF} respectivamente; se identificaron siete fenoles; los ácidos protocateico, 4-hidroxibenzoico, cafeico, vanílico y siríngico además de rutina y quercetina. El endocarpio presentó la más alta concentración de betacianinas (23.03mgEB·100g ⁻¹ _{PF}); se identificaron betanina, isobetanina, betanidina, isobetanidina y filocactina.

Cuadro 5. Investigaciones en cactáceas del género *Opuntia* (continuación).

Autor y año	Tema del estudio	Principales resultados
Coria <i>et al.</i> , 2011	Substancias promotoras de la salud y propiedades antioxidantes de frutas <i>Opuntia</i> sp.	Se encontró un contenido de ácido ascórbico de 0.26 – 0.48mg·g ⁻¹ _{PF} compuestos fenólicos totales entre 0.54 – 1.2mg de AG·g ⁻¹ _{PF} , betalainas totales de 3.9 – 484µg·g ⁻¹ _{PF} y capacidad antioxidante de 0.25 – 0.57mg·g ⁻¹ _{PF} . Se evidenció el incremento en el contenido de betalainas durante el proceso de maduración de tunas <i>O. megacantha</i> amarilla y anaranjada.
Figuroa-Cares <i>et al.</i> , 2010	Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (<i>Opuntia</i> spp.) de México.	En las variedades de tuna se encontró una capacidad antioxidante similar, con concentraciones entre 6.12 – 9.58µmol ET·g ⁻¹ _{PF} . El más alto contenido de ácido ascórbico fue de 25mg·100g ⁻¹ en Cacalote. El mayor contenido de betacianinas y betaxantinas se encontró en Tapón Aguanoso y Cacalote con 681.94 y 428.96mg·L ⁻¹ de betanina y 276.10 y 249.55 mg/L de indicaxantina. El contenido de fenoles fue de entre 14.24 – 420.66mg·L ⁻¹ .
Fernández-López <i>et al.</i> , 2010	Determinación de compuestos antioxidantes en frutas de cactus.	Se evaluaron tres especies de frutas de cactus de piel roja, el contenido de ácido ascórbico fue de entre 14.5 – 23.3mg·100g ⁻¹ _{PF} , las betalainas totales de 40.6 – 80.1mg·100g ⁻¹ _{PF} , los fenoles totales de 164.6 – 218.8mg·100g ⁻¹ _{PF} y la capacidad antioxidante de 1.58 – 6.70µmol ET·g ⁻¹ _{PF} . <i>Opuntia ficus-indica</i> presentó la mayor capacidad antioxidante. <i>O. stricta</i> fue la más rica en ácido ascórbico y fenoles totales.
Moßhammer <i>et al.</i> , 2007	Estabilidad de betalainas amarillo-naranja de tuna (<i>Opuntia ficus-indica</i> [L.] Mill. cv. 'Gialla') es afectada por la matriz del jugo y aditivos seleccionados.	La mayor retención de betaxantinas fue del 79 % y se obtuvo a pH de 6 con 0.1% de ácido cítrico, mientras la máxima retención de betacianinas fue a pH de 4 con 0.1% de ácido isoascórbico. Los efectos de los aditivos fueron menos evidentes en el jugo que en el pigmento purificado. Además, a pH 4 se observó mayor formación de 2-descarboxi-betanina y epimerización del C ₁₅ de la betanina.

Cuadro 6. Investigaciones en cactáceas del género *Hylocereus*.

Autor y año	Tema del estudio	Principales resultados
Foong <i>et al.</i> , 2012	Determinación de compuestos bioactivos en líquido fermentado de pitahaya (<i>Hylocereus polyrhizus</i>).	Se evaluó el contenido de ácidos grasos, fitoesteroles, betacianinas, fenoles y flavonoides totales además de la capacidad antioxidante en líquido fermentado de pitaya sin pasteurización y con pasteurización. La muestra pasteurizada mostró un mayor contenido de fitoesteroles ($7.29\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), betacianinas ($26.96\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido acético ($6.52\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), fenoles totales ($396.12\text{mg EAG}\cdot 100\text{mL}^{-1}$), flavonoides totales ($140.51\text{mg ECT}\cdot 100\text{mL}^{-1}$), flavanoles totales ($100.91\text{mg ECT}\cdot 100\text{mL}^{-1}$) y capacidad antioxidante (0.59 mM ET).
Woo <i>et al.</i> , 2011	Estabilidad de betalaínas de pitahaya roja (<i>Hylocereus polyrhizus</i>).	En muestras almacenadas a 25°C y protegidas de la luz se obtuvo una retención de betacianinas del 70%; mientras que, a 4°C tras 3 semanas de almacenamiento no presentaron cambios significativos. Por otro lado, durante el almacenamiento por 3 semanas a 4°C , pH 7, y protegidas de la luz se pierden el 25 % de los pigmentos. La mejor condición para preservar las betalaínas de pitahaya fue a 4°C , pH 5 y protegidas de la luz.
Rebecca <i>et al.</i> , 2010	Identificación de pigmentos y propiedades antioxidantes de pitahaya (<i>Hylocereus polyrhizus</i>).	Se confirmó la presencia de betanina mediante HPLC, con un tiempo de retención de 11.5 min, un contenido de fenoles de 86.10mg EAG en 0.5 g_{ES} , taninos condensados de $2.39\text{mg CT}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{ES}}$ y la determinación de capacidad antioxidante por DPPH mostró una EC_{50} con $2.90\text{mM EVC}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{ES}}$.
Naderi <i>et al.</i> , 2010	Extracción de betalaínas de <i>Hylocereus polyrhizus</i> mediante aplicación de enzimas	La mayor extracción de pigmentos (550 mg/ L) se obtuvo con una dosis de 0.3 % de enzima Pectinex Ultra SP-L. Betanina, filolactina, hilocerenina y sus respectivos isómeros se identificaron como componentes mayoritarios en los extractos obtenidos con hidrólisis enzimática, los isómeros parecen ser resultado del tratamiento enzimático, ya que al incrementar la dosis de enzima fue mayor el área relativa de los isómeros en análisis por HPLC.

Cuadro 6. Investigaciones en cactáceas del género *Hylocereus* (continuación).

Autor y año	Tema del estudio	Principales resultados
Schweiggert <i>et al.</i> , 2009	Optimización de un proceso de hidrólisis enzimática a baja temperatura para la producción de colorantes de pitahaya (<i>Hylocereus</i> sp.)	Se seleccionó la Pectinasa 62L, para optimizar el proceso de hidrólisis de pulpa de pitahaya entre 4-12°C, entre uno y 3 días; ya que se obtuvo una reducción de la viscosidad del cerca de 50% y retención de betalaínas de aproximadamente 80%. Se establecieron las condiciones óptimas de extracción a 7.9°C, 3 días, 0.92% p·p ⁻¹ de ácido ascórbico y 1% p·v ⁻¹ de enzima: Bajo estas condiciones se obtuvo una viscosidad relativa de 49.9%, retención de betalaínas de 80.4% y retención betanina-isobetanina de 25.4%.
Harivaindaran <i>et al.</i> , 2008	Temperatura, pH y estabilidad de extractos de piel de pitahaya (<i>Hylocereus polyrhizus</i>) para su posible uso como colorante natural.	Las mejores condiciones para la extracción de betacianinas de la piel de pitahaya fueron 100°C, 5min, agua destilada a pH 5 (ácido cítrico). El extracto se secó y resuspendió en agua destilada; el contenido de betacianinas disminuyó de 40mg·L ⁻¹ a 3.12 mg·L ⁻¹ después de siete días expuesto a la luz.
Esquivel <i>et al.</i> , 2007	Perfil de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de pitahayas purpura (<i>Hylocereus</i> sp.)	El contenido de betalaínas se determinó entre 43.2 – 75.1mg·100 mL ⁻¹ , fenoles totales de 9.2 – 13.3 mg·100 mL ⁻¹ y capacidad antioxidante de 24.5 – 36.1mg EVC·100 mL ⁻¹ . El genotipo 'Lisa' presentó mayor capacidad antioxidante, fenoles totales y betalaínas. Las betalaínas son los principales responsables de la capacidad antioxidante del fruto.
Wu <i>et al.</i> , 2006	Actividad antioxidante y anti proliferativa de pitahaya roja. (<i>Hylocereus polyrhizus</i>)	El contenido de fenoles totales fue de 39.7 y 42.4mg EAG·100 g ⁻¹ _{PF} , flavonoides de 8.3 y 7.2mg de ECT·100 g ⁻¹ _{PF} , betacianinas de 13.8 y 10.3mg EB·100 g ⁻¹ _{PF} y capacidad antioxidante de 175 y 28.3 μmol ET·g ⁻¹ ES en piel y pulpa respectivamente. La piel presentó mayor inhibición del desarrollo de células cancerosas.

Cuadro 7. Investigaciones en cactáceas del género *Stenocereus*.

Autor y año	Tema del estudio	Principales resultados
García-Cruz <i>et al.</i> , 2013	Caracterización física, química y actividad antioxidante de frutas de pitaya (<i>Stenocereus pruinosus</i>).	El contenido de betacianinas, betaxantinas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$) y fenoles solubles totales ($\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{PF}}$) fueron 2860, 3210 y 1.6 en frutas rojas; 470, 2670 y 1.2 en frutas anaranjadas. Las frutas rojas presentaron mayor capacidad antioxidante (1090.6 y $7.84 \mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{PF}}$) con las técnicas de ABTS y ORAC.
Ochoa-Velasco y Guerrero, 2013	Efecto de la luz ultravioleta-C en jugo de pitaya (<i>Stenocereus griseus</i>).	Se presentó un cambio de color conforme aumenta el tiempo de tratamiento ($3.9 \Delta\text{E}$). También presentó reducción de compuestos fenólicos (11.6%), betalaínas (14.6%) y actividad antioxidante (37.0%) en jugo tratado por 30 min.
García-Cruz <i>et al.</i> , 2012	Betalaínas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (<i>Stenocereus griseus</i> H.).	Se obtuvo un contenido de BT de 347.3 y $215\text{mg}\cdot 100 \text{g}^{-1}_{\text{PS}}$, fenoles solubles totales de 166.5 y $52.8\text{mg EAG}\cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$ y capacidad antioxidante (IC_{50}) de 59.8 y $161.7\mu\text{M}$ con radical DPPH en fruta roja y anaranjada respectivamente. Se encontró una mayor proporción de ácidos fenólicos libres (AFL), que glicosilados y esterificados.
Beltrán <i>et al.</i> 2009	Ácido ascórbico, contenido fenólico y capacidad antioxidante de pitayas (<i>Stenocereus stellatus</i>).	El contenido de ácido ascórbico es de $8 - 14\text{mg}\cdot 100 \text{g}^{-1}$, el contenido de fenoles corregido por ácido ascórbico fue de $1384 - 2395\text{mg EAG}\cdot 100 \text{g}^{-1}$ y la capacidad antioxidante entre $11 - 17.3\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$. Se encontró una correlación lineal entre la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales y ácido ascórbico.
Almaraz-Abarca <i>et al.</i> , 2007	Fenoles del polen de <i>Stenocactus</i> , <i>Echinocereus</i> y <i>Mammillaria</i> (Cactaceae).	Se identificaron derivados de ácidos fenólicos y flavonoides encontrando que cada grupo taxonómico tiene un perfil fenólico particular. Se identificaron 39 derivados de kaemferol (20) y quercetina (11) y glicosidos derivados de herbacetina (7). Los derivados 3-O-glicosidos fueron los más abundantes.

2.5.2 Producción.

El volumen de producción de frutos del género *Stenocereus* en el 2012 fue de 3,570.95 toneladas 7.9 veces la obtenida en el 2000 (448 toneladas). La producción por estado entre el 2008 y el 2012 se presenta en el Cuadro 8. En México los principales estados productores son Oaxaca, Jalisco y Puebla.

Cuadro 8. Producción de pitaya por estado.

Estado	2008	2009	2010	2011	2012
	Volumen de producción (Toneladas)				
Oaxaca	1,617.19	1604.14	1,758.25	1,369.50	1,626.50
Jalisco	1,112.25	1,090.60	1,118.75	1,262.33	1,249.00
Puebla	395.50	425.50	405.05	377.45	446.50
Nayarit	73.20	66.70	51.15	54.82	112.80
Morelos	44.00	82.50	83.60	90.75	93.50
Otros	33.00	1.50	11.50	38.20	42.65
Total	3,275.14	3,270.94	3,428.30	3,193.05	3,570.95

Fuente: SAGARPA, 2013.

3. Justificación.

El color es una característica física muy importante para la aceptación de los alimentos por parte del consumidor; por esta razón, en prácticamente todos los alimentos, es necesario realizar la adición de colorantes para restituir la pérdida de color provocada por el procesamiento de los alimentos o mejorarla para hacerlos más atractivos.

Debido a los posibles efectos tóxicos de algunos colorantes sintéticos, los compuestos naturales han tomado importancia en los últimos años para su aplicación en alimentos. Los colorantes FD&C Rojo 40 y el Rojo 3 son los colorantes sintéticos de mayor uso en alimentos y entre los pigmentos naturales más estudiados como posibles sustitutos de estos colorantes son las antocianinas y betalaínas. La presencia de betalaínas está restringida a ciertas especies vegetales entre las cuales podemos mencionar los géneros *Beta*, *Amaranthus*, *Opuntia*, *Hylocereus* y *Stenocereus*. El betabel (*Beta vulgaris*) es el único vegetal autorizado como fuente de betalaínas para aplicaciones en alimentos, aunque presenta sabor a tierra y altas concentraciones de nitratos; razón por lo cual se han incrementado los estudios de las betalaínas presentes en cactáceas especialmente de los géneros *Opuntia* e *Hylocereus*.

La demanda de frutos de cactáceas se ha incrementado a nivel mundial debido a sus deliciosos sabores y propiedades nutricionales. No obstante, muchas de ellas son consumidas de manera regional, lo que ha limitado su caracterización. Existen varias especies de pitayas del género *Stenocereus*, que crecen en zonas áridas y semiáridas de nuestro país principalmente en los estados de Oaxaca, Jalisco y Puebla, su producción es de temporal y su comercialización es muy limitada; principalmente a localidades cercanas a la zona de producción por lo cual se considera un cultivo subutilizado.

Las pitayas de *S. stellatus* son cultivares cuya importancia económica es alta en las regiones semiáridas del Estado de Puebla, su composición nutrimental y propiedades de estas frutas es poco conocida, por ello es importante profundizar en el conocimiento de estas frutas para promover su producción y consumo en beneficio de las comunidades productoras.

Aun son escasos los estudios sobre frutos de *S. stellatus*, por lo que, debido al interés por el estudio de productos con alto contenido de compuestos antioxidantes y con el fin de promover el aprovechamiento de este cultivo como fuente de pigmentos naturales; en el presente trabajo se propuso extraer y caracterizar los pigmentos presentes en pitayas *S. stellatus* producidas en Puebla para seleccionar una de ellas como potencial fuente de pigmentos.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Optimizar el proceso de extracción de los pigmentos y capacidad antioxidante de una variedad de pitaya *Stenocereus stellatus* y determinar su estabilidad para promover su aplicación como colorante natural.

4.2 Objetivos particulares.

1. Colectar frutos de cuatro variedades (roja, amarilla, violeta y blanca) de pitaya de agosto (*Stenocereus stellatus*) para realizar su caracterización física, fisicoquímica y análisis proximal.
2. Cuantificar compuestos fenólicos totales, ácido ascórbico, capacidad antioxidante y betalaínas totales de las cuatro variedades de pitaya para comparar las características de las cuatro variedades.
3. Analizar los compuestos fenólicos y pigmentos de pitaya por HPLC-DAD para conocer los perfiles de las cuatro variedades de pitaya.
4. Seleccionar la variedad de pitaya que presente la mayor concentración de betalaínas para utilizarla como fuente de pigmentos.
5. Evaluar el efecto de diferentes pretratamientos en la extracción de betalaínas, compuestos fenólicos y valores de capacidad antioxidante y seleccionar la más adecuada.
6. Optimizar el proceso de extracción de betalaínas, compuestos fenolicos y capacidad antioxidante mediante la metodología de superficie de respuesta por medio de un diseño central compuesto.
7. Evaluar la estabilidad de los compuestos bioactivos obtenidos de la pitaya a cambios de pH y temperatura para establecer los parámetros cinéticos.
8. Analizar las betalaínas presentes en la pitaya mediante HPLC-DAD-MS para dilucidar el tipo de betalaínas presentes.

5. Materiales y métodos.

5.1 Material biológico.

Las frutas de *S. stellatus* se colectaron en Santiago Tonahuixtla Puebla (18° 12' 5.35" latitud norte, 97° 53' 50.75" longitud este) durante la temporada de cosecha de agosto a septiembre de 2013. La Figura 9 muestra la planta de pitaya (*S. stellatus*) y los cuatro tipos de frutas analizadas en este trabajo. Las frutas colectadas presentaron un peso entre 76.22 y 100.58 g y entre 5.05 a 6.08 cm de longitud, con diámetro de 5.04 a 5.77 cm. Adicionalmente, con fines de comparación se colectaron frutas de *S. prinosus* con pulpa roja y amarilla para el análisis de betalaínas, en la misma área de producción en mayo de 2014.

La clasificación taxonómica de las muestras la realizó el biólogo Luis Enrique Ruiz Molina en el lugar de recolección.

Se seleccionaron frutas sanas sin daños o manchas, se eliminaron las espinas y posteriormente, las frutas fueron empacadas en bolsas de polietileno al vacío y almacenadas a -20 °C hasta su análisis.

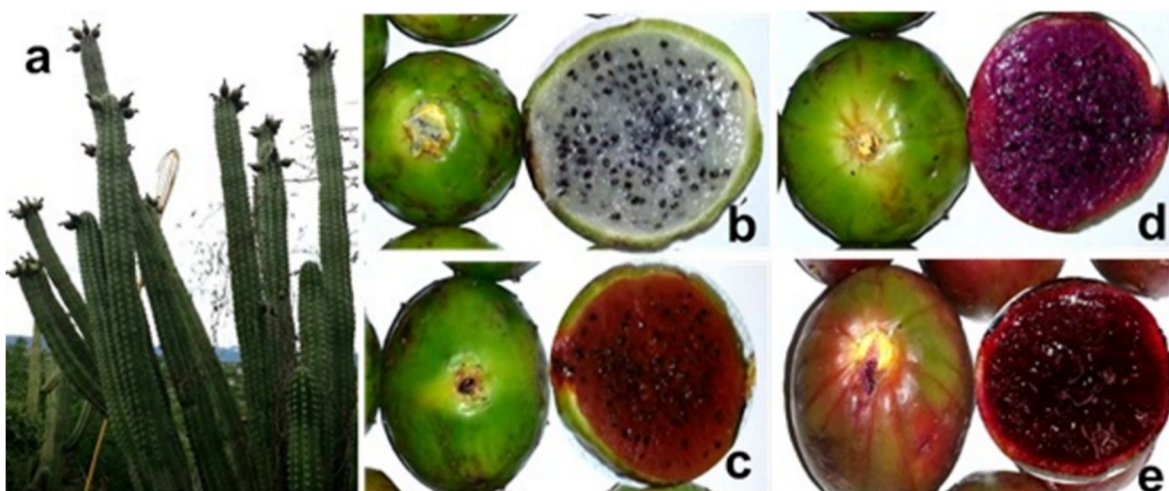


Figura 9. Cactus de *S. stellatus* (a) y sus frutas: pitaya blanca (b), amarilla (c), violeta (d), y roja (e).

Fuente: Imagenes propias tomada en el lugar de recolección.

5.2 Reactivos.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. 2,6 diclorofenol indofenol (D1878, Sigma-Aldrich); 3-acetilcumarina (214671, Sigma-Aldrich); ABTS [2,2-

azinobis-(3-ethylbenzothiazolina 6-ácido sulfónico)] (A1888, Sigma-Aldrich); Acetato de sodio, Productos Químicos Monterrey, México, Acetonitrilo grado HPLC, LiChrosolv, Alemania; Ácido 2,5-dihidroxibenzóico (78069, Sigma-Aldrich); Ácido 3,4-dihidroxibenzóico (08992, Sigma-Aldrich); Ácido 4-hidroxibenzóico (H20059, Sigma-Aldrich); Ácido acético glacial, Reasol, México; Ácido acético grado HPLC. J. T. Baker, México; Ácido ascórbico (A92902, Sigma-Aldrich); Ácido cafeico, (C0625, Sigma-Aldrich); Ácido cítrico (C0759, Sigma-Aldrich); Ácido clorogénico (C3878, Sigma-Aldrich); Ácido ferúlico (128708, Sigma-Aldrich); Ácido fórmico grado HPLC. LiChrosolv, Alemania; Ácido fosfórico (P5811, Sigma-Aldrich); Ácido gálico (398225, Sigma-Aldrich); Ácido p-cumárico (C9008, Sigma-Aldrich); Ácido sinápico (D7927, Sigma-Aldrich); Ácido siríngico (S6881, Sigma-Aldrich); Ácido trans-cinámico (C80857, Sigma-Aldrich); Ácido vanílico (94770, Fluka); Agua destilada, MiliQ; Agua grado HPLC, J. T. Baker, México; Carbonato de sodio anhidro, Reasol, México; Cloruro de sodio, Reasol, México; Cloruro de potasio, Reasol, México; Cloruro férrico, Fermont, México; DMPD (N,N-dimetil-p-fenilenediamina) (D4139, Sigma-Aldrich); Etanol, Conquimex, México; Eugenol (E51791, Sigma-Aldrich); Folin Ciocalteu 2N, HYCEL, México; Fosfato de potasio monobásico, Tecsiquim, México; Fosfato de sodio dibásico anhidro, Golden Bell, México; Fosfato de sodio dibásico heptahidratado, Fermot, México; Hesperidina (50162, Sigma-Aldrich); Kaempferol (K0133, Sigma-Aldrich); Metanol HPLC, J. T. Baker, México; Naringenina (N5893, Sigma-Aldrich); Naringina (71162, Sigma-Aldrich); Persulfato de potasio (216224, Sigma-Aldrich); Quercetina (Q4951, Sigma-Aldrich); Rutina (R5143, Sigma-Aldrich); TROLOX (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), (238813, Sigma-Aldrich); Xileno. Reasol, Mexico; Enzimas grado alimenticio: celulasa, proteasa y pectinasa, ENMEX, México.

5.3 Material de laboratorio.

Batidora de inmersión, 2609 Oster, EE.UU.; Bolsas para vacío, FoodSaver ROL20 Oster, EE.UU.; Cristalería de uso común en el laboratorio; Empacadora a vacío, FoodSaver V2240 Oster, EE.UU.; Tamiz malla # 25 (710 µm) Daigger EE.UU.

5.4 Equipo de laboratorio.

Balanza analítica, Precisa XR305A, Suiza; Baño de ultrasonido, Branson CPX5800H, México; Bomba de alto vacío ½ HP, Vacuubrand M2 2C, Alemania; Bomba de recirculación, McMillan PG3000, México; Centrifuga refrigerada, Dynamica Velocity 14R, Londres, Reino Unido; Colorímetro, Hunter Lab CFEZ1005, Virginia, EE.UU.; Equipo HPLC-DAD, Agilent Technologies Infinity 1260 Series, EE.UU.; Espectrofotómetro UV-Vis. Hach DR5000; Evaporador rotatorio al vacío, Büchi R-200, Suiza; Horno de microondas, Acros AM1007Q, China; Incubadora, Lab-Line Instruments 3525, EE.UU.; Parrillas con agitación magnética y calentamiento IKA C-MAG HS7, EE.UU.; Vortex Mixer, Kk VM-300, Taiwán; Potenciómetro, Denver Instrument-UltraBasic UB10; Micropipetas, High Tech Lab 4604, Polonia; Refractómetro ABBE.

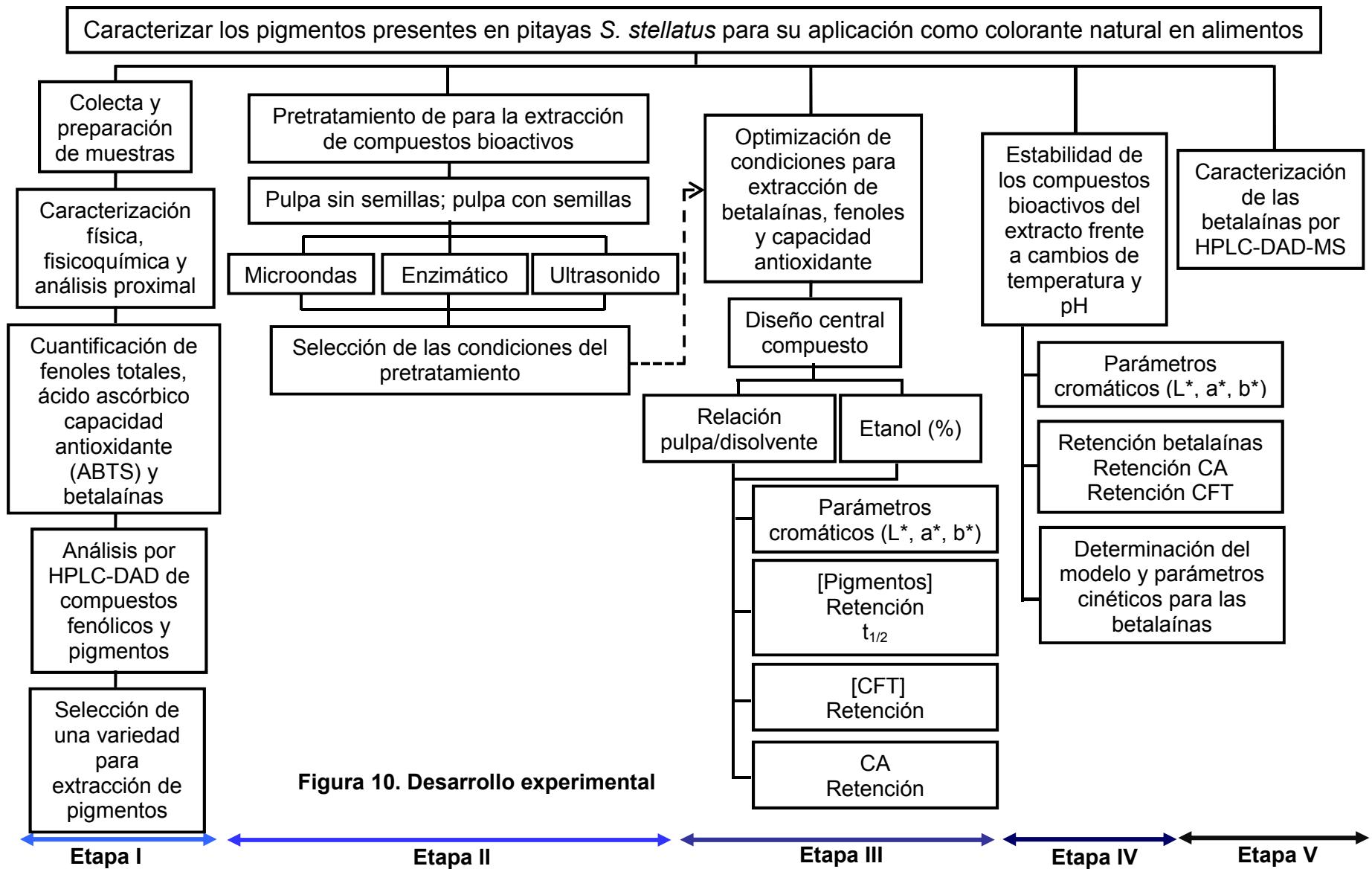
5.5 Desarrollo experimental.

La metodología experimental de este estudio se dividió en cinco etapas: (I) Caracterización de cuatro variedades de pitaya *S. stellatus* y selección de una de ellas como potencial fuente de pigmentos; (II) aplicación de pretratamientos por microondas, ultrasonido y enzimáticos; (III) optimización de la extracción; (IV) evaluación de la estabilidad y (V) caracterización de los pigmentos presentes, estas etapas se describen en la Figura 10.

5.6 Preparación de muestras de pitaya.

Las muestras se descongelaron por 24h en refrigeración (4-10°C) previo a su análisis; se realizaron los ensayos en pulpa sin semillas y con semillas, para lo cual se separó la piel de las frutas y la muestra obtenida se mezcló en un recipiente con ayuda de un agitador. Para obtener la pulpa sin semillas, se tamizó con una malla de 710-µm (No. 25) para separar las semillas y posteriormente se homogeneizó con un procesador de alimentos. En el caso de la pulpa con semillas la muestra se homogeneizó con un procesador de alimentos y se tamizó con una malla de 710-µm (No. 25).

Durante el desarrollo del trabajo experimental, se utilizó pulpa con o sin semillas, según se especifique.



5.7 Obtención de extractos de pitaya.

Una muestra (6.2g) de pulpa sin semillas o con semillas y con o sin pretratamiento (microondas, ultrasonido y enzimático), se colocó en tubos de 50mL con tapa de rosca y se le añadieron 10mL de disolvente. La mezcla se agitó en vortex (GEMMY VM-300 Taipei, Taiwan) por 1min a velocidad máxima (3500rpm) y posteriormente se centrifugó (Dynamica Velocity 14R, Londres, Reino Unido) a $10576\times g$ por 20min. Se separó el sobrenadante y los sólidos remanentes se utilizaron para realizar una segunda extracción bajo las mismas condiciones, adicionando 5mL de disolvente. Los extractos obtenidos de la primera y la segunda extracción se colocaron en un matraz volumétrico de 25mL y se aforó. Se mantuvo una relación solido-disolvente de $0.41g\cdot mL^{-1}$ a menos que se indique lo contrario. Se utilizó diferente cantidad de muestra y disolvente dependiendo de las evaluaciones realizadas durante el trabajo experimental.

5.7.1 Obtención de extractos de pitaya para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).

La extracción se realizó de acuerdo al método modificado de Xu *et al.*, (2008). Se pesaron 20g de pulpa sin semillas y sin pretratamiento y la muestra se colocó en un recipiente con tapa de rosca de 500mL, se le adicionó 200mL de metanol al 80% y se colocaron en un baño de ultrasonido por 60min a $20 \pm 2^{\circ}C$; la mezcla se filtró a vacío y se evaporó el disolvente (evaporador rotatorio a vacío, Büchi R-200, Suiza) a $40^{\circ}C$ hasta un volumen cercano a 40mL, obteniendo así el extracto crudo (EC). Se tomó una alícuota de 10mL del EC, se evaporó a sequedad, se re-suspendió en agua grado HPLC y se filtró ($45 \mu m$) para realizar el análisis por HPLC-DAD.

5.7.1.1 Hidrólisis de los extractos de pitaya para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).

La identificación de fenoles se realiza mediante su comparación con estándares comerciales y estos se comercializan como fenoles libres (en su mayoría); por ello, es necesario obtenerlos en forma libre y uno de los procedimientos más utilizados es la hidrólisis acida y/o alcalina.

Para complementar y mejorar la identificación de compuestos fenólicos, fue necesario realizar un proceso de hidrólisis secuencial del extracto crudo (EC); para ello el primer paso fue obtener la fracción de fenoles libres (FL). Se tomaron 10mL del EC y se ajustó el pH a 2 usando ácido clorhídrico 6M, se realizó la extracción líquido-líquido (3 veces) con 10mL de acetato de etilo y se separó la fase acuosa de la orgánica. La primera fue desechada y la fase orgánica se evaporó a sequedad, se re-suspendió en agua grado HPLC y se filtró (45 μ m) para realizar el análisis por HPLC-DAD.

Para hidrolizar los fenoles unidos a azúcares o fenoles glicosilados (FG) y obtenerlos en forma libre. A 20mL del EC se le adicionaron 10mL de ácido clorhídrico 6M y se realizó la hidrólisis a 85°C por 30min; se ajustó a 2 el pH del extracto usando hidróxido de sodio 8M, se realizó la extracción líquido-líquido (3 veces) con 20mL de acetato de etilo y se separó la fase acuosa de la orgánica. La primera fue desechada y se separaron 30mL de la fase orgánica, la cual se evaporó a sequedad, se re-suspendió en agua grado HPLC y se filtró (45 μ m) para realizar el análisis por HPLC-DAD.

En el caso de la hidrólisis de los fenoles unidos a ésteres o fenoles esterificados (FE); 30mL de extracto de FG, se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 10mL de agua HPLC. Se adicionaron 10mL de hidróxido de sodio 4M y se realizó la hidrólisis en agitación durante 60min a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, se ajustó el pH a 2 usando ácido clorhídrico 6M, para realizar la extracción líquido-líquido (3 veces) con 10mL de acetato de etilo. Se separó la fase acuosa de la orgánica. La primera fue desechada y la segunda se evaporó a sequedad, se re-suspendió en agua grado HPLC y se filtró (45 μ m) para realizar el análisis por HPLC-DAD (Hayat *et al.*, 2010).

5.7.2 Extracción de betalaínas para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD) y cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC-MS).

Una porción de 5g de pulpa sin semillas y sin pretratamiento se centrifugó a 10576xg durante 20min, el sobrenadante fue separado de los sólidos y se guardó protegido de la luz entre 4 – 10°C previo al proceso de limpieza de muestra.

5.7.2.1 Limpieza del extracto de betalaínas.

Previo a su análisis por HPLC-DAD y UPLC-MS, se limpió el extracto mediante filtración en columnas preparativas C-18 de 500mg (Supelco, Sigma Aldrich) acondicionadas con metanol y agua. De este proceso fueron obtenidas diferentes fracciones de betalaínas: (1) no retenidas (amarillas) y (2) retenidas (rojas). Estas fracciones fueron analizadas por HPLC-DAD y las fracciones con el mismo perfil fueron secadas a vacío a 40°C y almacenadas protegidas de la luz entre 4 – 10°C hasta su análisis por UPLC-MS.

5.8 Aplicación de pretratamientos en muestras de pitaya.

Se evaluaron tres tipos de pretratamientos: microondas, ultrasonido e hidrólisis enzimática en pulpa sin y con semillas. Porciones de 6.2g de muestra se colocaron en tubos de ensayo de 20mL con tapa de rosca y se sometieron a los diversos pretratamientos. En todos los casos se analizó una muestra sin pretratamiento o muestra control (C), que se utilizó para evaluar el efecto del pretratamiento.

Microondas: Se utilizó un horno de microondas de uso doméstico (Acros AM1007Q, China, 1050W), la muestra se colocó en el centro del equipo y se aplicó el pretratamiento a 105W (10% de la potencia máxima) por 1 y 2min (M1, M2). Después del tratamiento la temperatura fue de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ para M1 y $45 \pm 1^\circ\text{C}$ para M2.

Ultrasonido: Se usó un baño de ultrasonido de 10L con control de temperatura (Branson CPX5800H, EE.UU., 40 KHz). Las muestras se mantuvieron dentro del baño a 20°C durante 5 (U1), 10 (U2), 15 (U3), 20 (U4), 25 (U5), 30 (U6) y 35min (U7).

Hidrólisis enzimática: Previo al tratamiento, se midió el pH de las muestras que correspondió a 4.0 ± 0.5 para asegurar que este parámetro corresponde con el intervalo recomendado para la hidrólisis enzimática. Las muestras de pulpa con y sin semillas se mezclaron por separado con las preparaciones enzimáticas de proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL) y las 3 enzimas juntas (PPC) en una proporción de 0.5% p·p⁻¹.

Las mezclas se incubaron en un baño de calentamiento con agitación (Aquatherm G-86, New Brunswick Scientific, EE.UU.), por 2 (†) y 24h (††) a 150rpm y $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Al terminar la incubación, la reacción enzimática se detuvo calentando la mezcla en un baño maría a 95°C durante 5min seguido del enfriamiento con baño de hielo a $2 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10min (Naderi *et al.*, 2010).

Después de la aplicación de los pretratamientos, se realizó la extracción de los compuestos bioactivos de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.7 utilizando agua destilada como disolvente y se realizaron las determinaciones de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalaínas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA).

5.8.1 Evaluación del efecto de pretratamientos combinados.

Para determinar el efecto de la combinación de dos pretratamientos, se realizó un experimento factorial 2^2 con: ultrasonido 15min (factor A) y pectinasa 0.5%, 2h de incubación a 40°C y agitación a 150rpm (factor B).

Muestras de 6.2g de pulpa sin semillas se colocaron en tubos de ensayo de 20mL con tapa de rosca y fueron tratadas de acuerdo al diseño factorial 2^2 completo de un bloque con tres repeticiones (Cuadro 9); se realizó la extracción de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.7 utilizando agua como disolvente y se realizaron mediciones de Bc, Bx, BT, CFT y CA.

Cuadro 9. Experimento factorial 2^2

Experimento	Factor A (Ultrasonido)	Factor B (Pectinasa)	Clave
1	(-1)	(-1)	C
2	(1)	(-1)	U15
3	(-1)	(1)	PC
4	(1)	(1)	UPC

(-1) tratamiento no aplicado y (1) tratamiento aplicado; C: control, U15: ultrasonido 15 min, PC: pectinasa y UPC: Ultrasonido + pectinasa.

5.8.2 Selección del tiempo de incubación para aplicar el pretratamiento.

Después de seleccionar el pretratamiento, fue necesario definir el tiempo de incubación para el tratamiento enzimático; se realizó un experimento con diferentes tiempos de incubación. Se utilizaron 6.2 g de pulpa sin semillas a la cual se le agregó pectinasa al 0.5% p·p⁻¹. Se sometió al tratamiento por ultrasonido 15 min y se incubaron durante 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5h a 40 °C y agitación a 150rpm.

Una vez terminado el pretratamiento de las muestras se realizó la extracción (Sección 5.7) utilizando agua como disolvente y a los extractos obtenidos se les midió Bc, Bx, BT, CFT y CA. El tiempo de incubación seleccionado fue aquel en el que se obtuvo la más alta concentración de compuestos bioactivos en los extractos.

5.9 Optimización del proceso de extracción de betalaínas.

Se llevó a cabo en muestras de pulpa sin semillas a las cuales se aplicó el pretratamiento combinado de ultrasonido 15 min y pectinasa al 0.5% p·p⁻¹, 3h de incubación a 40°C y agitación a 150rpm.

La optimización se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). Un diseño central compuesto ortogonal de dos factores se utilizó para determinar el nivel óptimo para la relación pulpa–disolvente (RPD) 0.16 – 0.83 g·mL⁻¹ (Factor A) y proporción de etanol 15 – 85% (Factor B). Este diseño central compuesto esta formado por; un punto central, cuatro factoriales y cuatro axiales o estrella. El valor de α para el DCC fue de 1.41421; los niveles de los factores experimentales aparecen en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Rangos de las variables independientes usadas en la optimización.

Variables	- α	-1	0	+1	+ α
Relación pulpa-disolvente (g·mL ⁻¹)	0.03	0.16	0.5	0.83	0.96
Proporción de etanol (%)	0.5	15	50	85	99.5

De acuerdo con la matriz de diseño, se requieren 29 experimentos; los puntos factoriales y estrella (experimentos 1 al 8), se realizaron por triplicado y del punto central (experimento 9) se hicieron cinco repeticiones (Cuadro 11).

Cuadro 11. Diseño experimental central compuesto.

Experimento	Relación pulpa-disolvente (g·mL ⁻¹)	Etanol (%)
1	0.16	15
2	0.83	15
3	0.16	85
4	0.83	85
5	0.03	50
6	0.96	50
7	0.5	0.5
8	0.5	99.5
9	0.5	50

Para la obtención de extractos; se utilizó pulpa pretratada sin semillas, en diferentes cantidades (0.5–14.5g) y como disolvente mezclas de etanol-agua (0.5–99.5% v·v⁻¹).

La extracción se realizó con el procedimiento descrito en la Sección 5.7 y se les evaluó; parámetros cromáticos (L*, a* y b*), el contenido inicial de Bc, Bx, BT, CFT y CA, cinética de degradación a 60°C de Bc, Bx, BT (con el procedimiento descrito en la Sección 5.9.1) y el contenido final de Bc, Bx, BT, CFT y CA. Con los valores del contenido inicial y final se calculó la retención de Bc, Bx, BT, CFT y CA (Ecuación 1).

$$\% \text{ de retención} = \left(\frac{C_{\text{final}}}{C_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde: C_{final} es, contenido final Bc, Bx, BT, CFT o CA y C_{inicial} es, contenido inicial Bc, Bx, BT, CFT o CA.

5.9.1 Cinética de degradación.

Para determinar los parámetros cinéticos de los extractos obtenidos durante la optimización, se realizó un estudio de vida acelerada mediante su incubación a 60 ± 2°C, por 5h, con agitación a 150rpm, protegidos de la luz.

Se tomaron muestras cada 30 min y se determinó el contenido de Bc, Bx y BT. Con los datos obtenidos se evaluaron las constantes de degradación (k) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las Bc, Bx y BT aplicando el modelo para la cinética de reacción de primer orden de acuerdo a las ecuaciones (2) y (3) descritas en el apartado 5.10 (Sun *et al.*, 2010); k se calculó como la pendiente negativa de la línea recta.

5.10 Evaluación de la estabilidad del extracto.

Se determinó la estabilidad de Bc, Bx y BT a condiciones de pH entre 2.9 – 7.1 y temperatura entre 50 – 80°C.

Una muestra de 13.8g de pulpa pretratada sin semillas se colocó en tubos con tapa de rosca de 50mL y se adicionaron 20mL de regulador citrato-fosfato 0.1M como disolvente. Se realizó la extracción de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 5.7. Para la segunda extracción se adicionaron 10mL del disolvente y se aforó a 50mL.

Se obtuvieron las constantes de degradación (k) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las Bc, Bx y BT aplicando el modelo para la cinética de reacción de primer orden de acuerdo a las ecuaciones (2) y (3) (Sun *et al.*, 2010); k se calculó como la pendiente negativa de la línea recta.

$$\ln \left[\left(\frac{C}{C_0} \right) \times 100 \right] = -kt \quad (2)$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k} \quad (3)$$

Las mismas ecuaciones fueron utilizadas para evaluar el efecto del pH y la temperatura en la estabilidad de los pigmentos.

Para evaluar la E_a se utilizó la Ecuación 4 (Sun *et al.*, 2010); k se calculó como la pendiente negativa de la línea recta.

$$k = k_0 e^{-E_a/RT} \quad (4)$$

5.10.1 Efecto del pH.

Una muestra de 13.8g de pulpa pretratada sin semillas se colocó en tubos con tapa de rosca de 50mL y se adicionó como disolvente 20mL de regulador citrato-fosfato 0.1M a pH de 2.9, 3.4, 3.9, 4.5, 5.1, 6.3, 6.9 y 7.1, se realizó la extracción de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 5.7. Para la segunda extracción se adicionaron 10mL del disolvente y se aforó a 50mL. Se realizó la evaluación inicial de color, contenido de pigmentos (Bc, Bx, BT), CFT y CA. Dichos extractos se incubaron por 5h a 60°C con agitación a 150rpm en oscuridad. Se tomó una muestra cada 30 min y se enfriaron para determinar el contenido de pigmentos en cada punto.

Se calcularon los parámetros cinéticos k y $t_{1/2}$ mediante las Ecuaciones 2 y 3 (Sección 5.10). A la muestra final se le determinó además CFT y CA y se calculó la retención (%) (Ecuación 1)

5.10.2 Efecto de la temperatura.

Una muestra de 13.8g de pulpa pretratada sin semillas se colocó en tubos con tapa de rosca de 50mL y se adicionó como disolvente 20mL de regulador citrato-fosfato 0.1M a pH de 4.5, se realizó la extracción de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 5.7. Para la segunda extracción se adicionaron 10mL del disolvente y se aforó a 50mL. Se realizó la evaluación inicial de color, contenido de pigmentos (Bc, Bx, BT), CFT y CA. Se incubaron por 5h a 50, 60, 65, 70, 75 y 80°C con agitación a 150rpm, en oscuridad. Se tomo una muestra cada 30 min y se enfriaron para determinar el contenido de pigmentos en cada punto.

Se calcularon los parámetros cinéticos k , $t_{1/2}$ y E_a con las ecuaciones 2, 3 y 4 (Sección 5.10). A la muestra final se le determinó además CFT y CA y se calculó la retención (%) (Ecuación 1).

5.11 Técnicas analíticas.

5.11.1 Análisis proximal.

El análisis proximal se realizó con muestras de pulpa con semillas. Se utilizó el método Kjeldahl para cuantificar nitrógeno total (método AOAC 920.152). La concentración de proteína fue estimada usando el factor de 6.25. La grasa se

determinó mediante la extracción con éter de petróleo utilizando un aparato Soxhlet (método AOAC 920.39). El contenido de agua fue determinado mediante la pérdida de peso de la muestra después de secarse en horno a 110 °C (método AOAC 934.06); el contenido de cenizas fue obtenido mediante el calentamiento de la muestra a 550 °C hasta peso constante (método AOAC 942.05). La fibra cruda se determinó mediante digestión ácido-base (método AOAC 962.09). Los azúcares reductores (AR) se cuantificaron con el método volumétrico de Lane-Eynon; los carbohidratos se determinaron como azúcares reductores totales, después de hidrolizar la muestra (método AOAC 923.09) (AOAC, 1990). Todos los ensayos se realizaron por triplicado, los resultados se expresaron como porcentaje de peso fresco (PF).

5.11.2 Análisis fisicoquímico.

Los análisis se realizaron en pulpa con semillas siguiendo los métodos oficiales del AOAC (1990). Los sólidos solubles (SS) se cuantificaron usando un refractómetro ABBE (método AOAC 932.12) y se expresaron como °Brix. La acidez se midió por titulación (método AOAC 942.15) y se expresaron como contenido de ácido málico. El pH se midió en una solución acuosa de muestra al 10% usando un potenciómetro (Denver Instrument UB-10 Colorado, EE. UU.; método AOAC 981.12).

5.11.3 Determinación de color.

Una muestra de 25g de pulpa sin semillas o 25mL de extracto se colocaron en el contenedor de muestra del colorímetro. Los parámetros de color L*, a* y b* se midieron usando el colorímetro Color Flex EZ 45/0 con geometría especular excluida (CFEZ1005, Hunter Lab, Reston Virginia, EE.UU.), con un área de medición de 8mm, iluminante D65 y 10° del ángulo del observador contra un fondo blanco.

Los valores del ángulo Hue que especifica el tono o matiz de la muestra (H°) y Cromo que define la pureza o saturación del color (C*), fueron calculados utilizando las Ecuaciones 4 y 5 (Kha *et al.*, 2010):

$$H^{\circ} = \tan^{-1} \left[\frac{b^*}{a^*} \right] \quad (4)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (5)$$

5.11.4 Espectros de absorción de extractos metanólicos.

Porciones de 6.2 g de pulpa sin semillas se colocaron en tubos de ensayo de 20mL con tapa de rosca y se realizó la extracción de acuerdo al procedimiento ya descrito (Sección 5.7) utilizando metanol:agua (80:20) como disolvente. Se realizó un barrido de los extractos (EM) de las cuatro variedades de pitaya en la región UV-Vis del espectro entre 190 a 700nm usando un espectrofotómetro HACH DR 5000 (México, México).

5.11.5 Cuantificación de pigmentos.

El contenido de Bc y Bx se cuantificó midiendo la absorbancia a 538 y 483nm, respectivamente, (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008) en un espectrofotómetro UV-Vis (HACH DR5000, México, México). Las concentraciones de cada pigmento se calcularon usando la Ecuación 6. Las BT se calcularon sumando Bc y Bx.

$$B = \frac{(A \times FD \times PM \times V)}{(\epsilon \times P \times L)} \quad (6)$$

Donde: B = Bx o Bc expresadas en mg de indicaxantina o betanina por 100g de muestra en peso seco (P_S); A= absorbancia a 483nm para Bx y a 538nm para Bc; FD = factor de dilución; PM = peso molecular (indicaxantina $308\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ y betanina $550\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); V = volumen del extracto (mL); ϵ = coeficiente de extinción molar (indicaxantina = $48\ 000\text{L}\cdot[\text{mol}\cdot\text{cm}]^{-1}$ y betanina = $60\ 000\text{L}\cdot[\text{mol}\cdot\text{cm}]^{-1}$); P = cantidad de muestra (g); L = la longitud de la celda (1cm).

5.11.6 Compuestos fenólicos totales (CFT).

400 μ L de extracto se mezclaron con 3mL de agua destilada, 200 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 μ L de solución de carbonato de sodio al 20% (Singleton *et*

al., 1999). La mezcla se agitó en vortex por 30s y se mantuvo en la obscuridad por 30min a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, se midió la absorbancia a 765nm. Los valores de CFT se presentaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de muestra PS . La curva de calibración de ácido gálico se construyó de $0 - 10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y los resultados obtenidos se interpolaron con la Ecuación 7.

$$\text{Absorbancia}_{765\text{ nm}} = (0.0954)(\text{Concentración de ácido gálico}) + 0.0097 \quad (7)$$

5.11.7 Capacidad antioxidante (CA) con el ensayo ABTS.

El radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se preparó mezclando la solución de ABTS (7mM) con persulfato de potasio (2.45mM) (Re *et al.*, 1999); manteniéndola en la obscuridad por 16h antes de usarlo. Un mililitro del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se diluyó con 100mL de regulador fosfato de sodio (PBS) 0.01M pH 7.4, hasta obtener una absorbancia de aproximadamente 0.7 ± 0.02 a 734nm. Se tomó una alícuota de 200 μL del extracto y se le adicionó 3.8mL de la solución del radical ABTS; la mezcla se agitó en vortex por 10s y se mantuvo en obscuridad por 7min a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Su absorbancia se midió a 734nm (A_r). Para cada muestra se realizó un blanco con 200 μL de metanol (A_0). Los resultados se expresaron como μmoles equivalentes de Trolox (ET) por gramo de muestra PS .

La curva de calibración de Trolox se construyó de 3-20 μM . Se calcularon los porcentajes de inhibición y se interpolaron con la Ecuación 8.

$$\text{Inhibición (\%)} = (4.7114) (\text{Concentración de Trolox}) - 0.5012 \quad (8)$$

5.11.8 Ácido ascórbico (AA).

Se aplicó el método de extracción con xileno (Ranganna, 1986). A 1g de muestra se le adicionaron 10mL de H_3PO_3 al 3%, la suspensión se agitó en vortex por 1min y se centrifugó a $10576\times\text{g}$ por 20min. Una alícuota de 400 μL del sobrenadante se adicionó a 400 μL de regulador de acetatos 3.04M pH 4.0, 600 μL de solución 0.0007M 2,6-diclorofenolindofenol y 3mL de xileno, la mezcla se agitó por 10-15s; después de lo cual, la fase de xileno fue separada y se midió la absorbancia a 520nm usando xileno como blanco. Los resultados se expresaron en mg de AA

por g de pulpa _{PS}. Se realizó una curva de calibración de ácido ascórbico de 0–0.1 mg·mL⁻¹. Los resultados se interpolaron con la ecuación 9.

$$\text{Absorbancia}_{520\text{ nm}} = (-3.1246)(\text{Concentración de ácido ascórbico}) + 0.7859 \quad (9)$$

5.12 Análisis de compuestos fenólicos y pigmentos de pitaya por HPLC-DAD.

5.12.1 Análisis de extractos crudos por HPLC-DAD.

Los análisis de los extractos crudos se realizaron mediante HPLC-DAD (Agilent 3600 series) usando una columna Zorbax Eclipse Plus C-18 (150 × 4.6mm, 5µm), operando a 25°C. Se inyectaron 20µL de muestra con flujo de 1mL·min⁻¹ y se aplicó un gradiente de elución (Cuadro 12) con 2.5% de ácido acético en agua (fase móvil A) y acetonitrilo (fase móvil B). El detector de arreglo de diodos se programó entre 200 y 600nm, con resolución de 4nm y se obtuvieron los cromatogramas a 260, 483 y 538nm.

Cuadro 12. Gradiente para el análisis de extractos crudos por HPLC.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
15 – 35	76	24
36 – 50	55	45
57 – 69	0	100
70 – 73	100	0

Se prepararon soluciones de los estándares de: ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido clorogénico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, rutina, ácido ferúlico, naringina, hespiridina, quercetina, ácido transcinámico, narangenina, kaempferol, eugenol a una concentración de 1mg·mL⁻¹ disueltos en metanol, excepto quercetina y kaempferol que se disolvieron previamente en 100µL de dimetilsulfoxido y se completó el volumen con 900µL de metanol y se analizaron por HPLC con el programa descrito.

Los espectros de absorción y tiempos de retención de las señales obtenidas al evaluar los extractos crudos a 260 nm fueron comparados con los estándares.

5.13 Análisis de betalaínas por HPLC-DAD y UPLC-DAD.

5.13.1 Análisis de fracciones de betalaínas por HPLC-DAD.

Los análisis de las diferentes fracciones de betalaínas obtenidas después del proceso de limpieza se analizaron bajo las mismas condiciones descritas en la Sección 5.12.1; sin embargo, se utilizó un gradiente de elución diferente (Cuadro 13).

Cuadro 13. Gradiente para el análisis de betalaínas por HPLC.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
15 – 16	76	24
17 – 19	0	100
20 – 22	100	0

5.13.2 Análisis de betalaínas por UPLC-MS.

Las fracciones de betalaínas previamente seleccionadas fueron analizadas por UPLC-MS en un cromatógrafo Waters Acquity UPLC Clase H acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo ACQUITY QDa equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo de ionización positiva. Se utilizó una columna Acquity UPLC BEH-C18 (2.1 × 50mm, 1.7µm), nitrógeno como gas de secado con un flujo de 0.61mL·min⁻¹. Los espectros se analizaron en presencia de ácido fórmico (voltaje de electrospray de 1.0kV), con una temperatura de 500°C.

Para analizar la composición de las diferentes fracciones, se utilizó un gradiente de elución (Cuadro 14) con ácido fórmico al 0.1% en agua (Fase A) y acetonitrilo (Fase B) e inyectando 10µL de muestra.

Cuadro 14. Gradiente para el análisis de betalaínas por UPLC.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
1.7 – 2.7	76	24
3.2 – 5.2	0	100
5.2 – 6.2	100	0

5.14 Análisis estadístico.

Todos los análisis se realizaron por triplicado y se reportaron como el promedio \pm desviación estándar (DE). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias con el método de Fisher ($p \leq 0.05$).

En la primera etapa; se realizó el análisis de componentes principales (ACP) para explorar las relaciones entre los cuatro tipos de pitayas con respecto a sus propiedades fisicoquímicas y químicas (pH, acidez, parámetros de color [L^* , a^* , b^*] CA [ABTS] y concentraciones de Bc, Bx, BT, CFT, AA, carbohidratos [CHO] y azúcares reductores [AR]).

Los valores del contenido de Bc, Bx y BT reportados en la literatura (2006–2013) para 35 tipos de frutas de los géneros *Opuntia*, *Hylocereus* y *Stenocereus* de diferentes países, se reunieron y compararon con los obtenidos para *S. stellatus* y *S. pruinosus* usando ACP. Para estandarizar el contenido de pigmentos en base seca se consideró, un contenido de humedad promedio de 84.47% para *Opuntia* y de 89.99% para *Hylocereus*. Adicionalmente se realizó el agrupamiento de las muestras en base al contenido de Bc, Bx y BT con el fin de proponer intervalos de confianza en el contenido de pigmentos (Kara, 2009).

En la segunda etapa; para evaluar el efecto de los pretratamientos en pulpa y pulpa con semilla y durante la cinética de incubación, se realizó un análisis de dos vías para comparar el efecto de: muestras (2) y pretratamientos (28).

Posteriormente se evaluó la posible interacción de los pretratamientos seleccionados mediante un diseño experimental 2^2 .

En la tercera etapa, para la optimización de la extracción se aplicó la metodología de superficie de respuesta mediante un diseño central compuesto (DCC).

El procesamiento de datos se realizó con Minitab 16 (Minitab Inc., Pennsylvania EU), Unscrambler X software (CAMO Software AS, Oslo, Noruega) y Desing-Expert Versión 6.0.10 (Stat-Ease Inc., Minneapolis EU).

5.14.1 Análisis de componentes principales.

El ACP es una herramienta estadística que permite agrupar las variables en subgrupos que son relativamente independientes uno del otro. Las variables

obtenidas, llamadas componentes principales (CPs), representan los procesos responsables de las relaciones entre las variables de los datos originales (Sainani, 2014). Esta metodología se ha aplicado para la diferenciación de productos alimenticios con base en su distribución geográfica (de Andrade *et al.*, 2013), niveles de compuestos bioactivos (Koley *et al.*, 2014) y para identificación de adulteraciones alimenticias (Santos *et al.*, 2013).

El ACP es una herramienta para analizar datos con un gran número de variables; permite reducir un grupo de variables de predicción muy grande a uno pequeño con una pérdida de información mínima. Puede aplicarse: antes de realizar un análisis de regresión, con propósitos exploratorios para entender las relaciones entre las variables y/o para describir patrones en los datos. Durante el ACP los valores de las variables son estandarizadas a unidades de desviación estándar (Sainani, 2014).

Los CPs se construyen de tal forma que pocas contienen la mayor parte de la información de los datos originales, cuantos CPs retener para el análisis de resultados depende de cada caso. Cada CP es la suma ponderada de las variables originales, el valor de sus coeficientes se encuentran entre -1 y +1; los valores más altos tienen mayor efecto en un componente que los que están más cercanos a 0 (Sainani, 2014).

Los “loadings” o cargas representan la contribución relativa de las variables originales en el CP; estos valores representan la correlación entre cada variable y el CP. Durante el análisis es importante considerar el signo y la magnitud de las mismas.

Los “scores” o puntuaciones son obtenidos mediante el ACP para cada muestra, con base en los valores de las variables evaluadas originalmente y contienen la información de como están relacionadas unas con otras (Braga *et al.*, 2013); se expresan en unidades de desviación estándar; esto implica, que una puntuación de 1.6 para una muestra significa que la muestra esta 1.6 desviaciones estándar encima del promedio, en el CP que corresponda (Sainani, 2014).

5.14.1.1 Pasos para realizar el análisis de componentes principales en Minitab.

A continuación se describen e ilustran los pasos a seguir para realizar ACP utilizando Minitab

- 1.- Es necesario tener los datos a analizar dentro de una hoja de trabajo.
- 2.- Seleccionar el análisis de componentes principales, que se encuentran en las opciones de Estadísticas / Análisis multivariado / Componentes principales (Figura 11a). Al momento de seleccionar la opción de componentes principales, se despliega la ventana donde se definen las condiciones del análisis (Figura 11b).

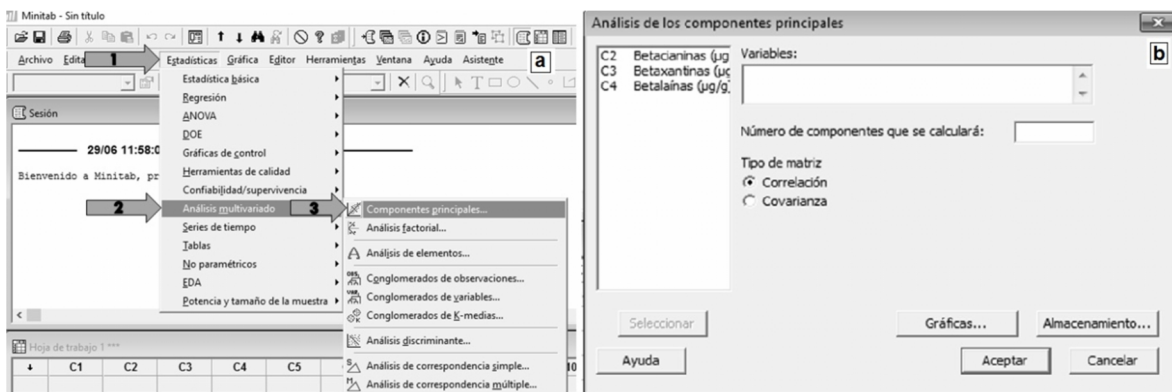


Figura 11. Paso 2 del análisis de componentes principales en Minitab a) selección del análisis, b) pantalla para definición de condiciones.

- 3.- Se seleccionan las variables (Figura 12a), se escribe el número de componentes que quieren obtenerse (el máximo de componentes esta limitado por el número de variables analizadas) y se selecciona el tipo de matriz a resolver (Figura 12b).

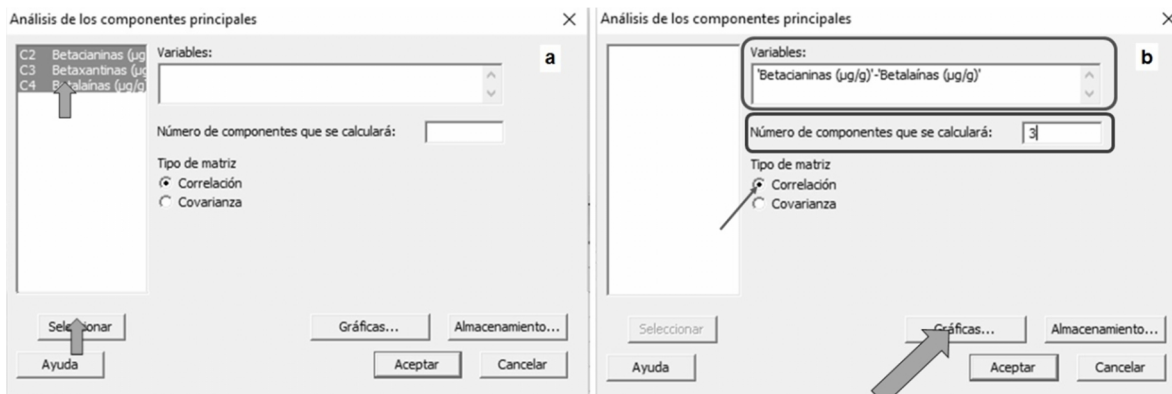


Figura 12. Paso 3 del análisis de componentes principales en Minitab. a) Selección de las variables, b) numero de CP, tipo de matriz y acceso a selección de gráficas.

En la misma ventana se selecciona el menú para las gráficas predeterminadas disponibles (Figura 12b).

El menú de las gráficas abre una ventana con las gráficas predeterminadas disponibles; generalmente se recomienda seleccionar todas para observar el comportamiento de los resultados; aunque muchas veces es necesario rehacer las gráficas.

4.- Al abrirse la ventana de las gráficas es posible seleccionar los graficos requeridos y presionar aceptar (Figura 13a); el programa solo gráficas dos CP (CP1 y CP2), por ello es necesario almacenar los resultados (en la hoja de trabajo). Para recoger los resultados se selecciona la opción de almacenamiento (Figura 13b); en la ventana correspondiente se define en que columnas deben aparecer los resultados de los coeficientes (cargas), puntuaciones, valores propios y distancia (Figura 13c).

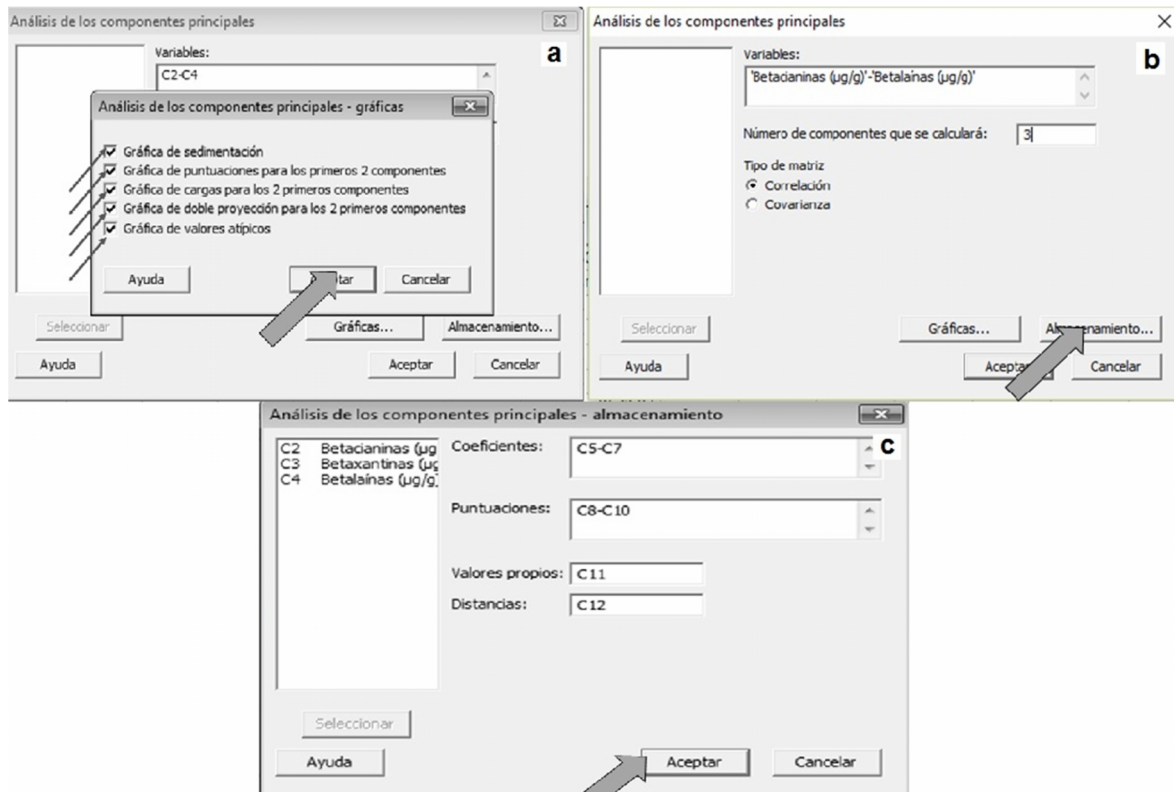


Figura 13. Paso 4 del análisis de componentes principales en Minitab. a) Selección de gráficas, b) opción de almacenamiento, c) asignación de columnas para los datos.

Finalmente se presiona aceptar, esta acción nos regresa al menú principal del ACP; si no es necesario modificar nada, se presiona aceptar y el programa inicia el análisis de datos y los resultados aparecen en la hoja de sesión (Figura 14a) junto al listado de los graficos obtenidos (Figura 14c) mientras en la hoja de datos aparecen los resultados almacenados (Figura 14b) (es importante identificar las columnas antes de guardar el archivo para evitar confusiones).

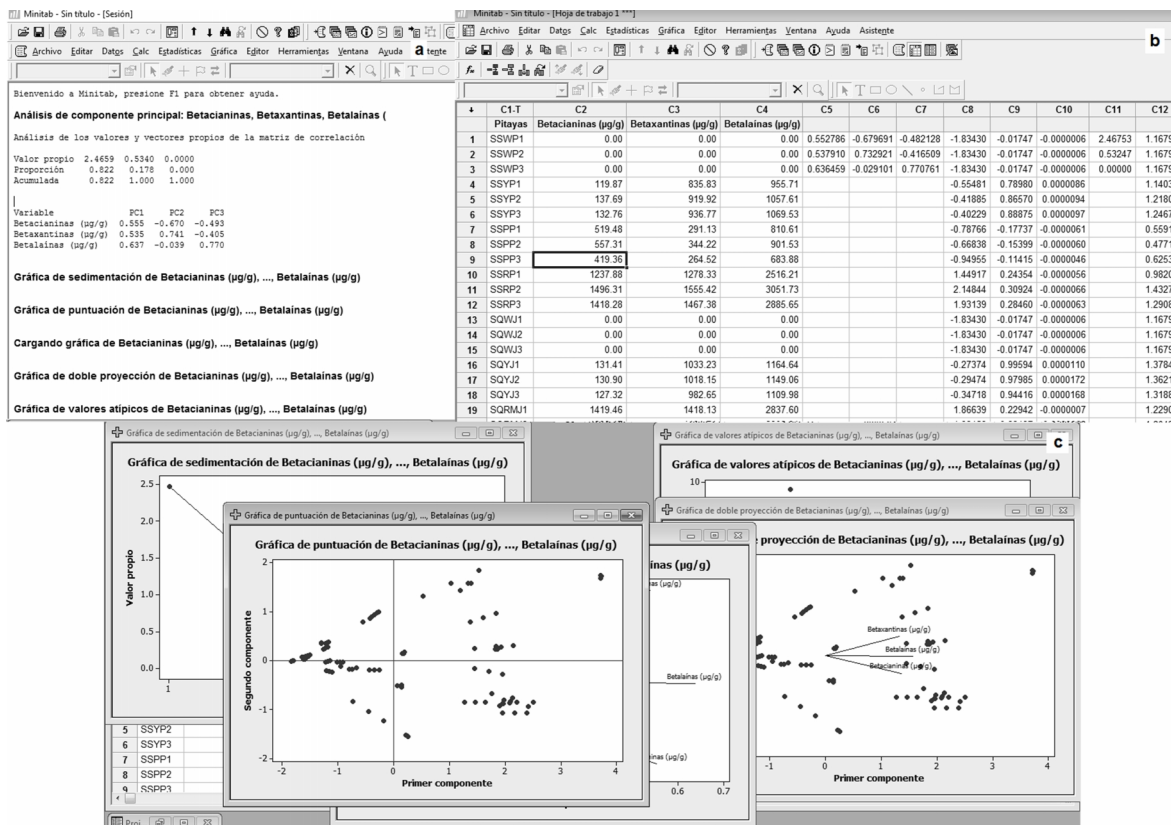


Figura 14. Resultados del análisis de componentes principales, a) hoja de trabajo con resultados y lista de gráficas, b) Hoja de datos con resultados almacenados, c) gráficas predeterminadas.

6. Resultados y discusión.

6.1 Análisis proximal de frutas *S. stellatus*.

En este trabajo, se determinó la composición de la pitaya blanca, amarilla, violeta y roja (Cuadro 15) con la finalidad de determinar la contribución de estas frutas a la ingesta diaria del consumidor de diferentes nutrientes y promover así su consumo y utilización.

Los resultados obtenidos muestran que el agua representa un 85.39 – 86.65% del peso total del fruto y que los carbohidratos totales son los segundos componentes más abundantes (9.65–10.85%), su concentración fue similar a los de otros frutos del género *Stenocereus* (Campos-Rojas *et al.*, 2011; García-Cruz *et al.*, 2013) y frutas de otras plantas, como manzanas, duraznos, naranjas y tunas (USDA 2014).

6.2 Caracterización fisicoquímica.

Las propiedades fisicoquímicas de las frutas, como los sólidos solubles y acidez están relacionadas con su madurez y pueden convertirse en un índice de cosecha o calidad (Wanitchang *et al.*, 2010). Un buen balance entre pH, azúcares y acidez titulable (Cuadro 15) es necesaria para un óptimo sabor. Se ha sugerido que una relación azúcar:ácido entre 10:1 y 18:1, es indicativo de buen sabor y aceptabilidad de una fruta (Stintzing *et al.*, 2003).

En el presente estudio, la relación azúcar:ácido para frutas de *S. stellatus* estuvo entre 12:1–20:1; esto clasifica a las pitayas con agradable sabor agridulce. Los valores de acidez titulable fueron mayores que los reportados para frutas de *S. pruinosus*, *S. queretaroensis* u *O. ficus-indica* (García-Cruz *et al.*, 2013; Stintzing *et al.*, 2003). El pH de las muestras de pulpa fue ácido (3.37–3.64); lo cual, puede influenciar la estabilidad de los pigmentos presentes en la pulpa. Estos valores fueron más altos que los reportados para frutas de *Opuntia* e *Hylocereus* (Stintzing *et al.*, 2003). El pH es un factor que afecta la estabilidad de los pigmentos (Herbach *et al.*, 2007), y debido al pH de la pulpa de pitaya, es muy probable que los pigmentos sean más estables en condiciones similares.

Cuadro 15. Análisis proximal, características fisicoquímicas, y propiedades de color de frutas *S. stellatus* blanca, amarilla, violeta y roja.

Variable	SSBM	SSAM	SSVM	SSRM
Análisis Proximal (PF)				
Humedad (%)	86.58 ± 0.02 ^{AB}	85.39 ± 0.12 ^C	86.65 ± 0.13 ^A	86.43 ± 0.07 ^B
Carbohidratos (%)	9.82 ± 0.00 ^B	10.85 ± 0.00 ^A	9.65 ± 0.02 ^C	9.82 ± 0.00 ^B
Azúcares reductores (%)	6.46 ± 0.09 ^A	4.81 ± 0.15 ^C	5.31 ± 0.18 ^B	4.33 ± 0.27 ^D
Proteína (%)	1.08 ± 0.02 ^B	1.23 ± 0.14 ^A	1.30 ± 0.02 ^A	1.29 ± 0.06 ^A
Lípidos (%)	0.47 ± 0.03 ^A	0.49 ± 0.06 ^A	0.47 ± 0.08 ^A	0.39 ± 0.04 ^A
Fibra cruda (%)	1.63 ± 0.00 ^A	1.58 ± 0.06 ^A	1.39 ± 0.00 ^B	1.58 ± 0.00 ^A
Cenizas (%)	0.48 ± 0.01 ^D	0.58 ± 0.01 ^A	0.55 ± 0.00 ^B	0.53 ± 0.01 ^C
Análisis fisicoquímico				
Sólidos solubles (°Brix)	9.73 ± 0.30 ^A	9.53 ± 0.50 ^A	9.60 ± 0.20 ^A	9.67 ± 0.11 ^A
Acidez titulable (% ácido málico)	0.81 ± 0.06 ^A	0.57 ± 0.15 ^B	0.50 ± 0.09 ^B	0.48 ± 0.05 ^B
pH	3.37 ± 0.01 ^D	3.59 ± 0.02 ^B	3.64 ± 0.01 ^A	3.48 ± 0.02 ^C
Mediciones de Color				
Luminosidad (L*)	67.3 ± 0.9 ^A	26.8 ± 1.0 ^B	13.9 ± 1.9 ^C	12.6 ± 0.6 ^C
a* (valor (+) rojo; valor (-) verde)	2.2 ± 0.1 ^D	33.9 ± 1.1 ^A	29.9 ± 2.5 ^B	24.4 ± 2.2 ^C
b* (valor (+) amarillo; valor (-) azul)	22.0 ± 0.7 ^B	33.3 ± 3.1 ^A	-1.5 ± 0.4 ^D	8.7 ± 1.5 ^C
Angulo Hue° (H*)	84.3 ± 0.2 ^A	44.4 ± 1.9 ^B	2.9 ± 1.1 ^C	19.4 ± 1.6 ^D
Croma (C*)	22.1 ± 0.7 ^C	47.5 ± 2.9 ^A	30.0 ± 2.4 ^B	25.9 ± 2.6 ^{BC}

Los datos presentados son la media de 3 determinaciones ± DE ($p < 0.05$). Diferentes letras en superíndices indican diferencias significativas entre los tipos de frutas. Blanca (SSBM), amarilla (SSAM), Violeta (SSVM) y Roja (SSRM). PF: peso fresco

6.3 Propiedades de color.

Los parámetros cromáticos L*, a*, b*, H° y C* de la pulpa de frutas *S. stellatus* de Puebla, México, mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las frutas analizadas (Cuadro 15). Las pitayas violetas y rojas fueron más oscuras (menor valor de L*) que los otros tipos de frutas. Los valores H° en la pulpa de pitaya, se localizaron en la región del amarillo-rojizo; aunque la pitaya violeta tuvo el menor

valor de H° y mayor a^*/b^* , que indica una coloración más intensa (Voča *et al.*, 2014). Los valores de L^* , H° y C^* de las frutas rojas y amarillas de *S. stellatus*, fueron similares a lo reportado por García-Cruz *et al.* (2013) para frutas *S. pruinosus* naranjas ($L^* = 25.7$, $H^{\circ} = 28.9$, Croma = 35.0) y rojas ($L^* = 19.4$, $H^{\circ} = 19.8$, Croma = 24.7). En muchas frutas (climatéricas) el color de la piel es un índice de madurez que permite decidir el momento óptimo de la cosecha; sin embargo, en el caso particular de las frutas del género *Stenocereus* no se ha establecido la relación entre el color y la madurez del fruto. Las pitayas utilizadas en el presente estudio se colectaron en estado de madurez fisiológica; de acuerdo con el productor esto se verifica cuando se observa que las espinas se desprenden fácilmente de la superficie del fruto.

6.4 Espectros de absorción.

De acuerdo con los análisis espectrofotométricos y de espectrometría de masas realizados por Castellanos-Santiago y Yahia (2008), los frutos de cactáceas frecuentemente contienen mezclas de betacianinas y betaxantinas con diferentes estructuras. El análisis de las curvas de absorción mostró que los extractos de pitayas presentan diferencias entre las muestras en el perfil UV-Vis. (Figura 9). En la región ultravioleta (UV) se observa un pico máximo (λ_1) a 218, 220, 224 y 228nm para las muestras de fruta violeta, amarilla, blanca y roja respectivamente. Como era de esperarse, la pulpa de SSBM (variedad blanca) no muestra absorbancia en la región (Vis) visible del espectro. En contraste, las muestras de SSRM, SSAM y SSVM muestran un segundo pico (λ_2) a 484, 485 y 490nm, respectivamente, que son longitudes de onda características de betaxantinas. Adicionalmente, tanto SSRM y SSVM muestran un tercer pico (λ_3) a 536nm, que concuerda con betacianinas. Sin embargo, la relación λ_2/λ_3 fue indicativa de cambios en la coloración de cada tipo de fruta (Stintzing *et al.*, 2003).

Una alta relación λ_2/λ_3 (10.28) en SSAM sugirió que la coloración de la fruta fue amarillo-naranja que demuestra que las betaxantinas son predominantes en esta pulpa. En contraste la baja relación λ_2/λ_3 (0.90) en SSVM, muestra que en este caso las betacianinas son los pigmentos predominantes.

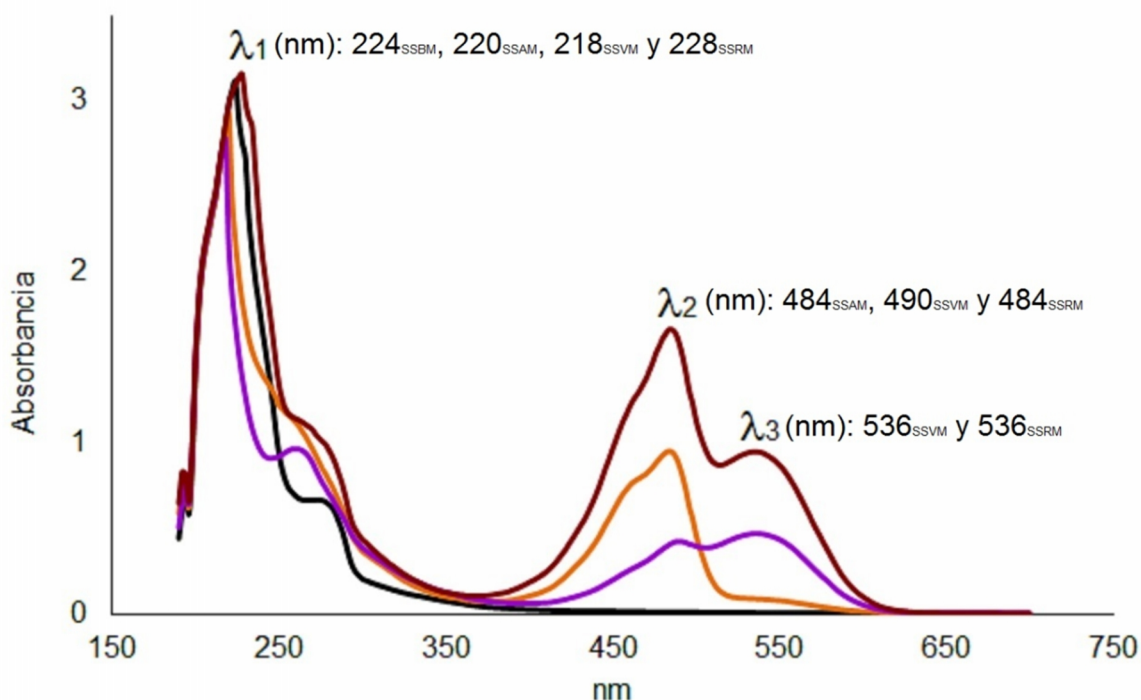


Figura 15. Espectros de absorción en extractos acuosos de frutas *S. stellatus* blanca (SSBM—), amarilla (SSAM—), violeta (SSVM—) y roja (SSRM—).

6.5 Compuestos fenólicos totales (CFT), Ácido ascórbico (AA), pigmentos (Bc, Bx, BT) y capacidad antioxidante (CA) en pulpa de *S. stellatus*.

Los resultados de compuestos bioactivos en pulpa de pitaya se muestran en el Cuadro 16. Se encontró diferencia significativa entre las frutas analizadas ($p \leq 0.05$) en la CA determinada por ABTS, el contenido de AA, Bc, Bx y BT.

Las frutas de este estudio presentaron un menor contenido de CFT que lo reportado para diferentes bayas, con valores entre 25 y 84.4 mg EAG g^{-1}_{PS} (Gorinstein *et al.*, 2013). Por otro lado, el contenido de CFT de las pitayas *S. stellatus* (Cuadro 16) fue mayor a lo reportado para frutas del género *Hylocereus*, *S. griseus* y tunas de EE.UU. (Wu *et al.*, 2006; García-Cruz *et al.*, 2012; Stintzing *et al.*, 2005). La capacidad antioxidante de las pitayas fue similar a lo reportado para diferentes bayas por Gorinstein *et al.*, (2013) (80–620 μM ET $\cdot g^{-1}_{PS}$) y mayor al compararse con tunas (Fernández-López *et al.*, 2010), con excepción de SSVM. Los mayores contenidos de AA se encontraron en frutas SSBM (4.11 mg $\cdot g^{-1}_{PS}$).

Los valores de AA para *S. stellatus* concuerdan con los reportado para frutas calafate (1.36–4.89 mg·g⁻¹) por Ruiz *et al.*, (2010).

Cuadro 16. Contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), capacidad antioxidante (CA), pigmentos, y ácido ascórbico (AA) de frutas *S. stellatus* blanca, amarilla, violeta y roja.

Variable (p _S)	SSBM	SSAM	SSVM	SSRM
CFT (mg EAG·g ⁻¹)	4.47 ± 0.96 ^A	3.72 ± 0.89 ^A	4.48 ± 0.59 ^A	5.79 ± 0.87 ^A
CA por ABTS (μmol ET·g ⁻¹)	128.69 ± 11.94 ^A	85.39 ± 3.29 ^B	57.20 ± 3.79 ^C	109.67 ± 15.00 ^{AB}
Bc (μg betanina·g ⁻¹)	nd	135.22 ± 3.5 ^C	538.39 ± 26.70 ^B	1457.29 ± 55.20 ^A
Bx (μg indicaxantina·g ⁻¹)	nd	928.34 ± 11.90 ^B	277.82 ± 18.80 ^C	1511.39 ± 62.20 ^A
BT (Bc + Bx) (μg·g ⁻¹)	nd	1063.57 ± 8.40 ^B	856.07 ± 64.20 ^C	2968.68 ± 117.40 ^A
AA (mg AA·g ⁻¹)	4.11 ± 0.17 ^A	3.05 ± 0.26 ^B	3.12 ± 0.27 ^B	2.61 ± 0.07 ^B

Los datos son el promedio de 3 determinaciones ± DE (p < 0.05). Diferentes letras significan diferencias entre los tipos de frutas. Blanca (SSBM), amarilla (SSAM), Violeta (SSVM) y Roja (SSRM) nd: no detectado; p_S: peso seco. Compuestos fenólicos totales (CFT), capacidad antioxidante (CA), betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalainas totales (BT), ácido ascórbico (AA).

6.6 Análisis de Componentes Principales (ACP) de propiedades físicas, fisicoquímicas y químicas de frutas de *S. stellatus*.

El ACP se ha utilizado en el campo de los alimentos para realizar estudios la clasificación de variables mediante la reducción estadística de los datos. Con esta metodología, los grupos de datos originales se transforman en nuevos grupos de variables no correlacionadas llamados componentes principales (CPs), con los cuales se elaboran gráficos que permiten evaluar visualmente similitudes entre las muestras y además determinar si esas muestras pueden ser agrupadas (Pérez-Loredo *et al.*, 2016).

Se aplicó ACP para identificar posibles agrupamientos entre cuatro variedades de frutas de *S. stellatus* (blanca, amarilla, violeta y roja) a partir del contenido de carbohidratos (CHO), azúcares reductores (AR), pH, acidez, parámetros cromáticos (L*, a*, b*), ácido ascórbico (AA), capacidad antioxidante (CA), compuestos fenólicos totales (CFT) y pigmentos (Bc, Bx, BT).

El ACP se realizó con los valores de la caracterización de 12 muestras de pitayas *S. stellatus* diferentes (3 por cada variedad, los valores promedio de estas mediciones aparecen en los Cuadros 15 y 16); se obtuvieron 12 CPs y se observó, que 3 explican el 95.7% de la variación total (CP1: 59.7%; CP2: 24.0%; CP3: 12.0%).

Las cargas de las variables (contribución por variable en el CP) y las puntuaciones de las muestras (calculado con las cargas de cada CP) de los CPs seleccionados se presentan en la Figura 16 (Anexo I).

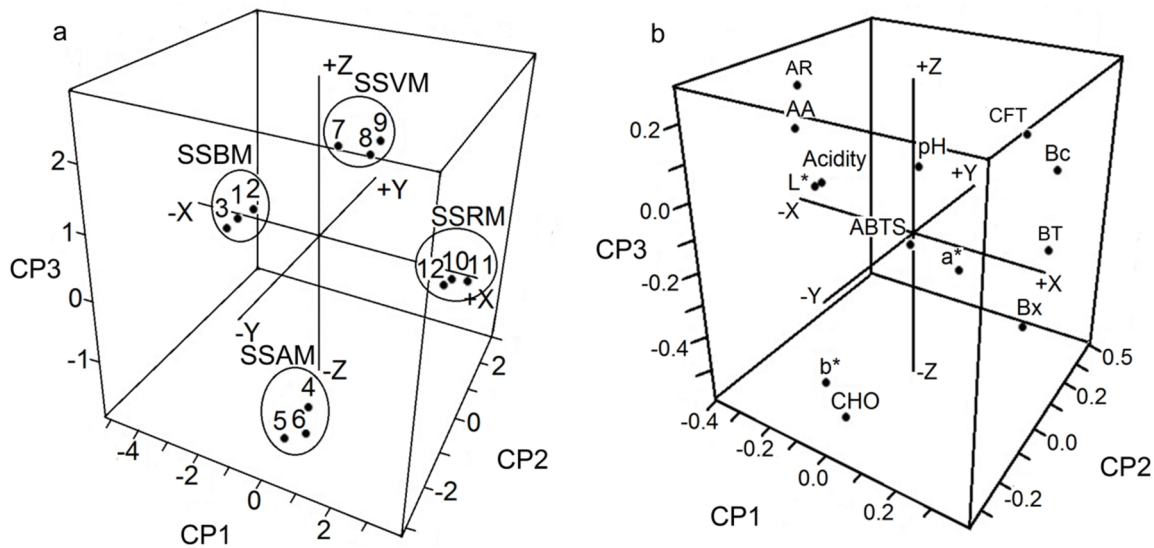


Figura 16. Componentes principales CP1, CP2 y CP3 para (a) puntuaciones de las muestras de pitaya, (b) cargas de las variables analizadas en pitayas *S. stellatus*. SS: *Stenocereus stellatus*; B: blanca; A: amarilla; V: violeta; R: roja; M: México.

En el grafico tridimensional de las puntuaciones (Figura 16a). Se observa la separación de cuatro grupos, correspondientes a pitaya blanca (1, 2, 3), amarilla (4, 5, 6), violeta (7, 8,9) y roja (10, 11, 12).

Las agrupaciones son resultado de pequeñas y medianas diferencias entre los factores analizados: pH, acidez, L *, a *, b *, Bc, Bx, BT, CFT, AA, CHO, AR, y CA. Por lo tanto, los 4 cultivares de pitaya fueron diferenciados efectivamente mediante el ACP. La Figura 16b muestra las cargas de cada variable en los CPs.

Tras analizar ambas gráficas conjuntamente es posible observar las relaciones entre las variables y los cultivares mexicanos.

En el gráfico de puntuaciones (Figura 16a) se discriminan claramente 2 grupos: muestras con pigmentos (SSRM, SSVM y SSAM) en el área positiva del CP1 y sin pigmentos (SSBM) en el área negativa del CP1; de igual manera en el gráfico de cargas (Figura 16b) se agrupan Bc, Bx y BT en el área positiva del CP1, igual que los CFT; como se esperaba SSRM quedó más cercano a Bc, Bx y BT que SSAM y SSVM indicando que SSRM presentó el mayor contenido de betalaínas.

Los frutos con pulpa blanca, SSBM fueron los más lejanos a estos puntos, pero cercanos a L*; además SSBM, quedó más cerca de AA, AR y acidez (CP1 negativo, CP2 positivo), lo que significa que las pitayas blancas son las frutas más dulces, más ácidas y que contienen una mayor concentración de ácido ascórbico entre los cuatro cultivares de *S. stellatus* de México analizados.

6.7 Agrupamiento de frutas de cactus por contenido de pigmentos mediante ACP.

Debido a las desventajas tecnológicas del betabel (*Beta vulgaris*) como fuente de betalaínas, principalmente debido al sabor a tierra y la alta concentración de nitratos presentes, se han propuesto las frutas de cactus de los géneros *Opuntia* e *Hylocereus* como fuente alternativa de pigmentos naturales. Como se ha demostrado en el presente estudio, las frutas de *S. stellatus* son ricas en pigmentos y antioxidantes y pueden utilizarse para obtener pigmentos rojos.

La concentración de los fitoquímicos presentes en las frutas (incluyendo pigmentos) depende principalmente del género, especie, madurez, cultivar (variedad), temporada y región de crecimiento de la planta (Azeredo, 2009; Coria *et al.*, 2011; Corral-Aguayo *et al.*, 2010).

La comparación de los datos reportados del contenido de pigmentos es una tarea difícil porque no existe un procedimiento de extracción, métodos de análisis o una forma estandarizada de presentar los resultados.

A pesar de esto; los datos de Bc, Bx y BT de 35 tipos de frutas de cactus de géneros y regiones del mundo diferentes se condensaron (Cuadro 17) y se evaluaron usando ACP con el objetivo de agruparlas con base en el contenido de pigmentos.

Cuadro 17. Betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalainas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT), y capacidad antioxidante (CA) de frutas de cactus de diferentes países.

ID	Fruta	Bc ^{PS} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Bx ^{PS} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	BT ^{PS} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	CFT ^{PS} (mg EAG g ⁻¹)	CA ^{PS} ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	Referencias
México							
1	SSAM	135.2 ± 3.5	928.7 ± 11.9	1063.6 ± 8.4	3.7 ± 0.9	85.4 ± 3.2	
2	SSVM	538.3 ± 26.7	277.8 ± 18.8	856.1 ± 64.2	4.5 ± 0.6	57.2 ± 3.7	
3	SSRM	1457.2 ± 55.2	1511.3 ± 62.2	2968.6 ± 117.4	5.8 ± 0.9	109.7 ± 15.0	Este trabajo
4	SPAM	377.8 ± 2.2	3195.5 ± 18.6	3573.4 ± 68.7	9.4 ± 0.2	74.1 ± 0.5	
5	SPRM	3448.9 ± 33.8	4646.1 ± 76.5	8095.0 ± 17.0	9.1 ± 0.2	117.9 ± 5.9	
6	SGOM	376.0 ± 75.4	1773.7 ± 301.8	2149.7 ± 377.2	0.5 ± 0.0	nr	García-Cruz <i>et al.</i> , 2012
7	SGRM	1996.0 ± 14.3	1476.1 ± 182.1	3473.0 ± 209.8	1.6 ± 0.1	nr	
8	SPAM	470.0 ± 222	2670.0 ± 270	3140.0 ± 492	1.2 ± 0.2	735.4 ± 111.6	García-Cruz <i>et al.</i> , 2013
9	SPRM	2860.0 ± 380	3210.0 ± 560	6070.0 ± 940	1.6 ± 0.2	1090.6 ± 152.8	
10	ORRM	5290.0 ± 350	2860.0 ± 240	8150.0 ± 590	nr	nr	
11	ORRM	2060.0 ± 60	990.0 ± 30	3050.0 ± 90	nr	nr	
12	OTRM	2040.0 ± 200	1040.0 ± 90	3080.0 ± 290	nr	nr	
13	OFRM	710.0 ± 40	440.0 ± 30	1150.0 ± 70	nr	nr	
14	OFPM	390.0 ± 30	140.0 ± 10	530.0 ± 40	nr	nr	Castellanos-Santiago y Yahia, 2008
15	OFRM	270.0 ± 10	230.0 ± 20	500.0 ± 30	nr	nr	
16	OMOM	65.0 ± 10	160.0 ± 20	225.0 ± 30	nr	nr	
17	OFAM	72.0 ± 1	140.0 ± 20	212.0 ± 21	nr	nr	
18	OFAM	71.0 ± 1	410.0 ± 20	481.0 ± 21	nr	nr	
19	OABM	50.0 ± 20	120.0 ± 10	170.0 ± 30	nr	nr	
España							
20 ^{a,c}	OFRS	978.7 ± 51.5	1635.5 ± 122.3	2614.3 ± 174.0	14.1 ± 0.2	43.1 ± 4.7	Fernández-López <i>et al.</i> , 2010
21 ^{a,c}	OSRS	5157.7 ± 360.6	nr	5157.7 ± 360.6	13.2 ± 0.3	38.5 ± 1.5	
22 ^{a,c}	OORS	1584.0 ± 135.2	1146.2 ± 58.0	2730.2 ± 193.2	10.6 ± 0.2	10.2 ± 2.6	
Argentina							
23 ^a	OMAA	70.8 ± 5.8	103.0 ± 6.4	173.7 ± 12.2	3.5 ± 0.6	nr	
24 ^a	OMOA	115.9 ± 6.4	341.3 ± 26.0	457.2 ± 32.0	6.4 ± 0.6	nr	
25 ^a	OPVA	2073.4 ± 115.6	965.9 ± 90.2	3039.3 ± 203.0	7.7 ± 0.4	nr	
26 ^a	OPIA	373.5 ± 19.3	302.6 ± 19.3	676.1 ± 38.6	5.1 ± 0.6	nr	Coria <i>et al.</i> , 2011
27 ^a	OFVA	2215.1 ± 90.2	901.5 ± 77.3	3116.5 ± 167.4	7.1 ± 0.6	nr	
28 ^a	OFVA	1802.1 ± 77.3	759.8 ± 64.4	2562.8 ± 141.7	5.8 ± 0.6	nr	
29 ^a	OFGA	5.1 ± 0.6	19.1 ± 1.9	25.1 ± 2.6	3.9 ± 0.6	nr	
Estados Unidos							
30 ^a	OFGU	0.4 ± 0.0	1.7 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	14.4 ± 0.6	
31 ^a	OFOU	31.9 ± 0.2	368.5 ± 1.8	400.3 ± 2.0	1.2 ± 0.1	14.9 ± 0.2	Stintzing <i>et al.</i> , 2005
32 ^a	OFRU	540.9 ± 2.0	306.0 ± 0.9	846.9 ± 2.8	1.5 ± 0.1	16.7 ± 2.1	
33 ^a	OFVU	2026.6 ± 4.9	920.4 ± 2.0	2946.1 ± 6.9	3.1 ± 0.2	23.4 ± 1.7	
Taiwán							
34 ^d	HPRT	1101.9 ± 219.8	nr	1101.9 ± 219.8	4.2 ± 0.0	nr	Wu <i>et al.</i> , 2006
Bélgica							
35 ^b	HPRB	1651.3 ± 17.0	nr	1651.34 ± 17.0	1.6 ± 0.0	nr	Liaotrakoon <i>et al.</i> , 2013

Los valores son el promedio ± DE. SS: *Stenocereus stellatus*; ID: Identificación de muestra; SP: *S. pruinosus*; SG: *S. griseus*; OR: *Opuntia robusta*; OT: *O. streptacantha*; OF: *O. ficus-indica*; OM: *O. megacantha*; OA: *O. albicarpa*; OS: *O. stricta*; OU: *O. undulata*; OP: *Opuntia spp.*; HP: *Hylocereus polyrhizus*; B: blanca; A: amarilla; V: violeta; R: rojo; O: naranja; I: rosa; G: verde; M: México; S: España; A: Argentina, U: Estados Unidos; T: Taiwán; B: Bélgica; ^{PS}: peso seco; nr: no reportado; ^avalores expresados en ^{PS} basados en un contenido de agua de 84.47%; ^bvalores expresados en ^{PS} basados en un contenido de agua de 89.99%; ^cfruto completo.

La Figura 17 muestra el gráfico bidimensional de 2 CPs (CP1: 82.2% y CP2: 17.8%) que explican el 100% de la variabilidad de los datos.

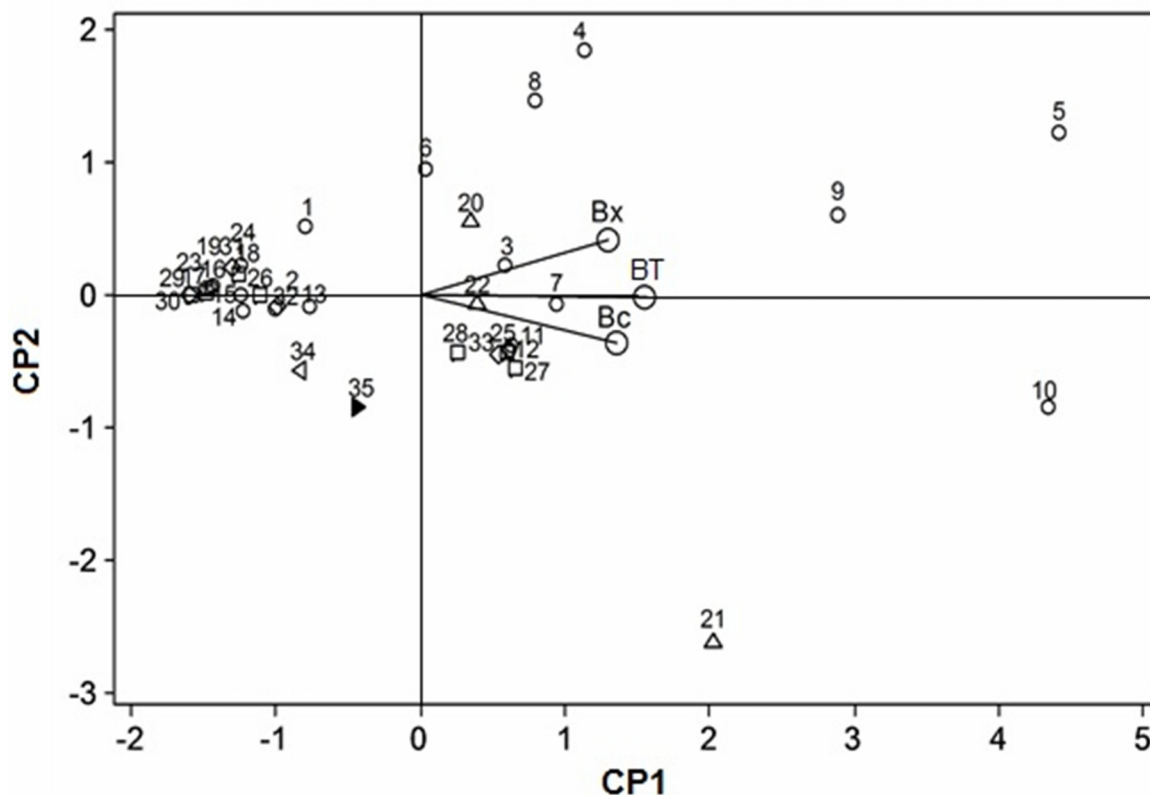


Figura 17. Puntuaciones y cargas de los componentes principales CP1 y CP2 para el contenido de pigmentos (Bx, Bc y BT) en frutas de cactus de México (○), España (△), Argentina (□), Estados Unidos (◇), Taiwán (◁) y Bélgica (▶). Las cargas de las variables están representadas con una línea que parte del punto (0, 0). Las puntuaciones de las muestras tienen diferentes símbolos de acuerdo al país de origen. Los números representan el ID de la muestra (Cuadro 17).

La agrupación con base en las puntuaciones muestran las frutas con el mayor contenido de Bc en la zona inferior derecha (CP1 positivo, CP2 negativo), correspondiente a las muestras ORRM y OSRS de México y España, respectivamente (Figura 17, Cuadro 17). Las muestras con más alto contenido de Bx fueron la SPAM, SPRM y SPRM de México (Figura 17, Cuadro 17) y se agruparon en el área superior derecha (CP1 positivo, CP2 positivo). Así mismo, las muestras con el mayor contenido de BT se observan en el área de la derecha

(CP1 positivo) encontrando las muestras ORRM, SPRM y SPRM de México y OSRS de España (Figura 17, Cuadro 17).

En el gráfico obtenido se observa la agrupación de las muestras de acuerdo al contenido de betalaínas; por lo cual, se analizó la posibilidad de establecer una clasificación con base en el contenido de Bc, Bx y BT para frutas de cactáceas. Para esto, se establecieron intervalos de confianza (IC) al 95% para el contenido de Bc, Bx y BT considerando tres niveles bajo, medio y alto (Cuadro 18).

Cuadro 18. Intervalos de confianza para el agrupamiento de frutas de cactáceas con base en el contenido de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx) y betalaínas totales.

Rango	Bc ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Bx ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	BT ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Bajo	<693.86	<615.98	<1208.98
Medio	1874.70–2686.00	1727.40–2742.20	2935.30–3288.3
Alto	5059.60–5388.10	2776.70–4591.10	4488.30–9248.10

Como resultado de este análisis, las frutas de cactus pueden clasificarse como pobres, buenas o excelentes fuentes de Bc, Bx o BT, o sea si el contenido de pigmentos es bajo, medio o alto, respectivamente.

El 83% de las muestras analizadas mediante el ACP (Cuadro 17) quedaron dentro de los intervalos propuestos para Bc y BT. Por otro lado, el 73% de las muestras fueron consistentes con los intervalos de Bx propuestos. Esta concordancia relativamente baja en los datos de Bx puede deberse a una sobreestimación de este tipo de pigmentos durante su análisis espectrofotométrico (Stintzing *et al.*, 2003).

En general existe buena concordancia entre los datos reportados y los intervalos de confianza propuestos, el 14% de las muestras quedaron entre los niveles bajo y medio de BT y el 3% estuvieron entre los niveles medio y alto de BT.

De acuerdo con esto, el contenido de betalaínas de frutos rojos de *S. stellatus* (Muestra 3) y amarillos de *S. pruinosus* (Muestra 4) de Puebla, México, pueden considerarse una *buen*a fuente de betalaínas, porque están cerca del nivel medio,

mientras que la fruta roja de *S. pruinosa* (Muestra 5) de la misma área de producción pueden considerarse una *excelente* fuente de betalaínas.

6.8 Análisis de compuestos fenólicos y pigmentos en extractos crudos de pulpa de pitaya *S. stellatus* por HPLC - DAD.

Para la implementación del método se ensayaron varios gradientes hasta obtener la mejor separación de la mezcla de los 17 estándares. Finalmente, bajo las condiciones de trabajo descritas en la sección 5.12.1 se obtuvo la separación de la mayoría de los estándares utilizados (Figura 18).

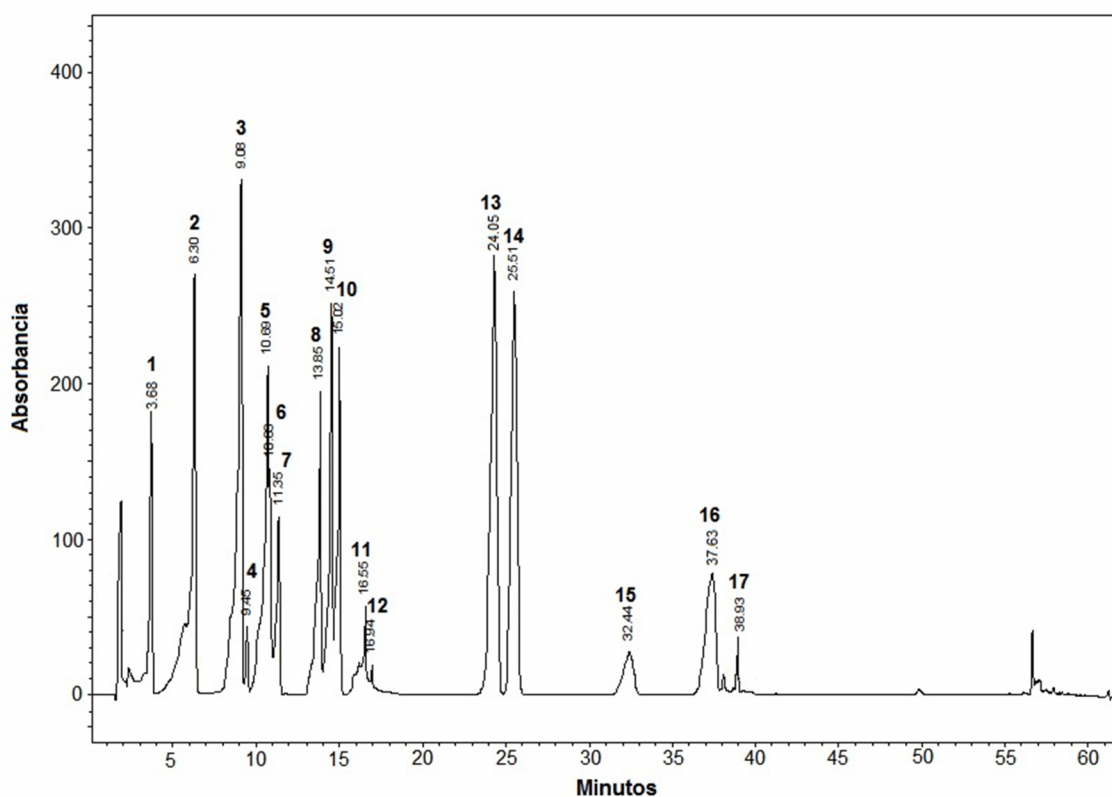


Figura 18. Cromatograma a 260nm obtenido por HPLC-DAD de la mezcla de 17 estándares de fenoles. Los números corresponden a diferentes fenoles: 1) Ácido gálico, 2) ácido 3,4-dihidroxibenzoico, 3) ácido 4-hidroxibenzoico, 4) ácido clorogénico, 5) ácido vanílico, 6) ácido cafeico, 7) ácido siríngico, 8) ácido *p*-cumárico, 9) rutina, 10) ácido ferúlico, 11) naringina, 12) hesperidina, 13) quercetina, 14) ácido transcinámico, 15) narangenina, 16) kaempferol, 17) eugenol. Mezcla con 100 μL de cada estándar ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Durante el proceso de identificación de los fenoles presentes en pulpa de pitaya *S. stellatus*, se realizó la comparación de los espectros de los estándares (Anexo II) con los espectros de las señales obtenidas en los extractos crudos.

6.8.1 Análisis de compuestos fenólicos por HPLC - DAD.

Tras analizar los extractos crudos de las cuatro variedades de pitayas en estudio, se obtuvo el perfil cromatográfico de las mismas a 260 nm.

Se observó que las pitayas *S. stellatus* de Puebla blancas (Figura 19), amarillas (Figura 20), violetas (Figura 21) y rojas (Figura 22) evaluadas presentan perfiles cromatográficos característicos con similitudes entre las cuatro variedades; además se observó que los extractos crudos tienen una gran cantidad de señales a la longitud de onda antes mencionada.

Mediante la comparación de los espectros de absorción de las señales obtenidas en las muestras (Anexo III) con los de los estándares (Anexo II), se obtuvo una identificación preliminar de algunos compuestos fenólicos presentes en las cuatro variedades de pitaya, sin embargo, ya que no coinciden los tiempos de retención se consideran derivados (Cuadro 19).

Cuadro 19. Fenoles derivados y otros antioxidantes identificados por HPLC-DAD en la pulpa de cuatro variedades de pitayas *S. stellatus*.

Muestra					
Tipo de fenol (derivado)	SSBM	SSAM	SSVM	SSRM	Identificación tentativa
	✓	✓	✓	✓	Ácido orgánico
Hidroxibenzoico	✓	✓	✓	✓	Ácido gálico
Hidroxibenzoico	✓				Ácido 3,4-dihidroxibenzóico
Hidroxibenzoico	✓	✓	✓	✓	Ácido 4-hidroxibenzóico
Hidroxicinámico		✓	✓	✓	Ácido cafeico
Hidroxibenzoico	✓	✓		✓	Ácido siríngico
Flavanona		✓	✓	✓	Naringina
Fenol simple	✓	✓	✓	✓	Eugenol

Pitaya blanca (SSBM), amarilla (SSAM), Violeta (SSVM) y Roja (SSRM).

A pesar de ser frutos del mismo género, variedad y lugar de origen se presentaron diferencias en los perfiles cromatográficos principalmente en la altura de las señales y en la presencia de algunos derivados de naringina, ácido sirigico o ácido cafeico que no aparecen en todas las muestras (Cuadro 19).

Si bien no se encontró diferencia significativa en el contenido de CFT (Cuadro 17) entre las cuatro variedades de pitaya, la identificación de fenoles libres por HPLC muestra que existen diferencias en el perfil de compuestos fenólicos de las pitayas *S. stellatus* de Puebla.

Los fenoles presentes en la pulpa de pitaya son derivados de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, fenoles simples y flavonoides; estas tres clases de compuestos fenólicos se encuentran universalmente distribuidos en las plantas (Dey y Harbone, 1989).

Escarpa y González, (2001) reportan que los ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles y flavonoles fueron los compuestos fenólicos predominantes en diferentes frutas y vegetales estudiados; al comparar entre variedades de manzana, se encontró que la pulpa contiene principalmente flavan-3-oles en diferentes concentraciones.

En las 4 variedades de pitayas *S. stellatus* se identificó la presencia de compuestos fenólicos en común como el ácido gálico y el ácido 4-hidroxibenzoico (Cuadro 19), pero existen diferencias en la cantidad contenida. Sin embargo, muchas señales presentes en los extractos crudos no pudieron ser identificadas por lo cual puede ser necesario hidrolizar los extractos para identificar los compuestos que se encuentren en forma glicosilada y/o esterificada.

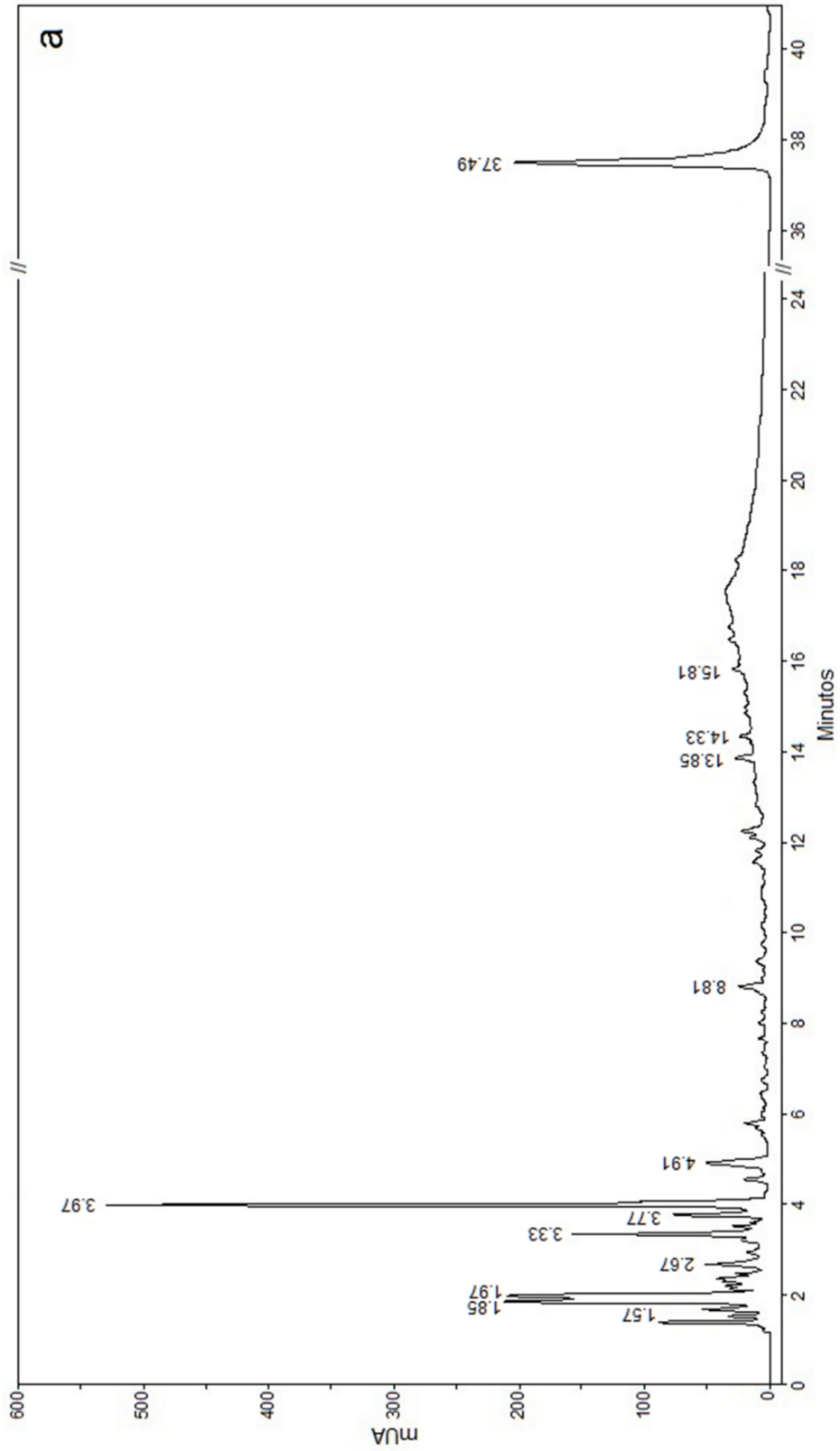


Figura 19. Cromatograma a 260nm del extracto crudo de pitaya *S. stellatus* blanca (SSBM) obtenido por HPLC-DAD.

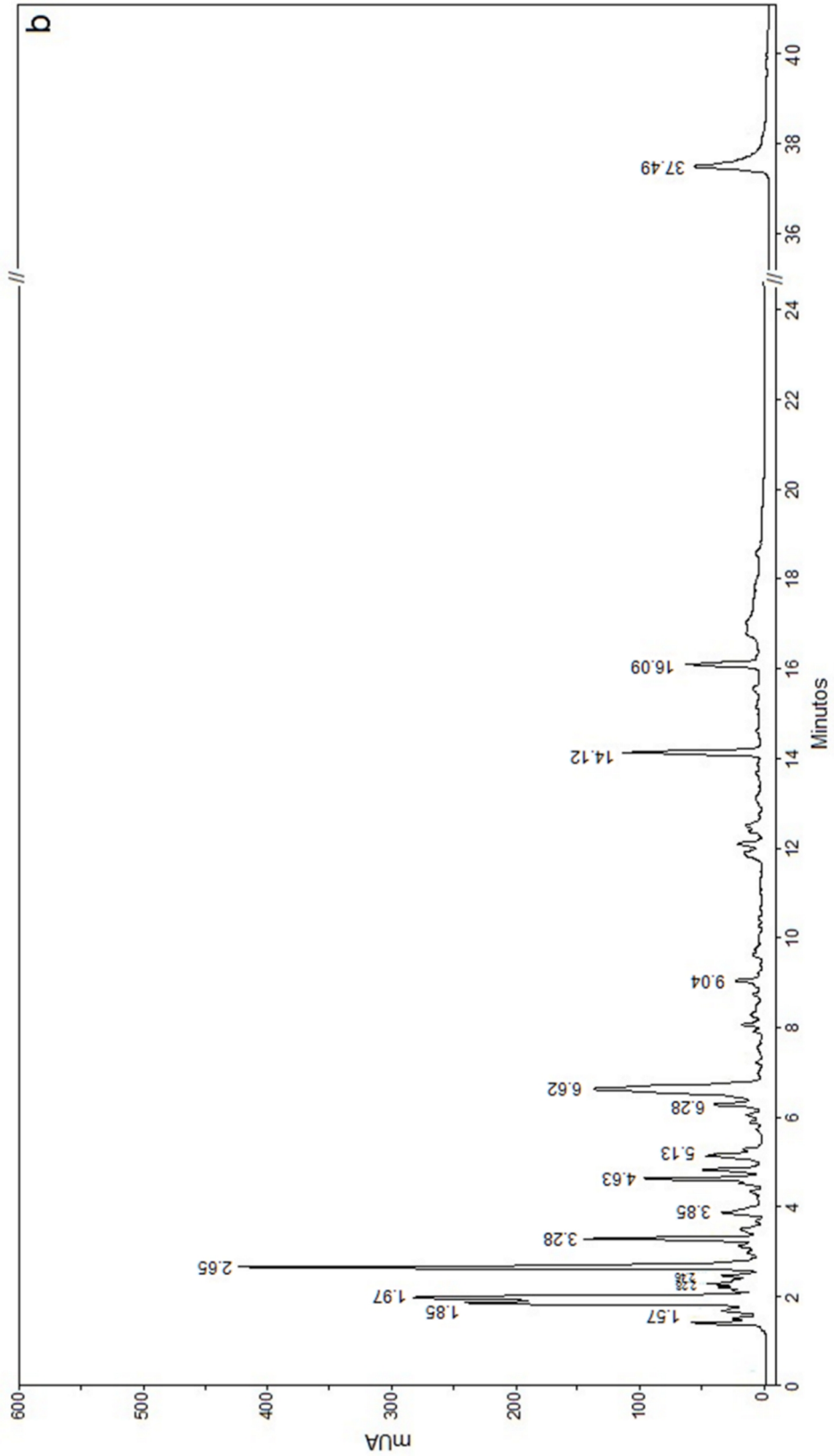


Figura 20. Cromatograma a 260nm del extracto crudo de pitaya *S. stellatus* amarilla (SSAM) obtenido por HPLC-DAD.

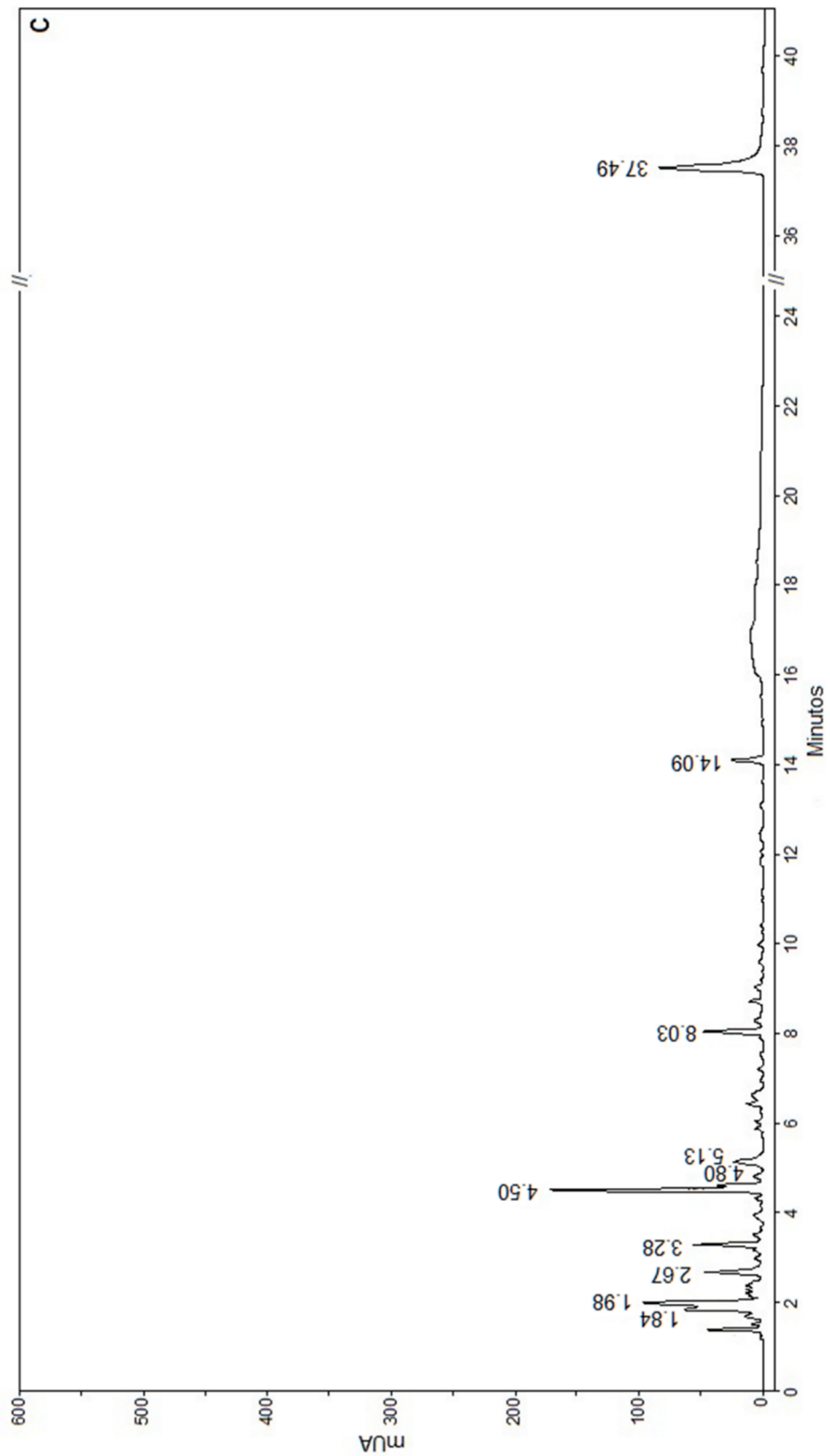


Figura 21. Cromatograma a 260nm del extracto crudo de pitaya *S. stellatus* violeta (SSVM) obtenido por HPLC-DAD.

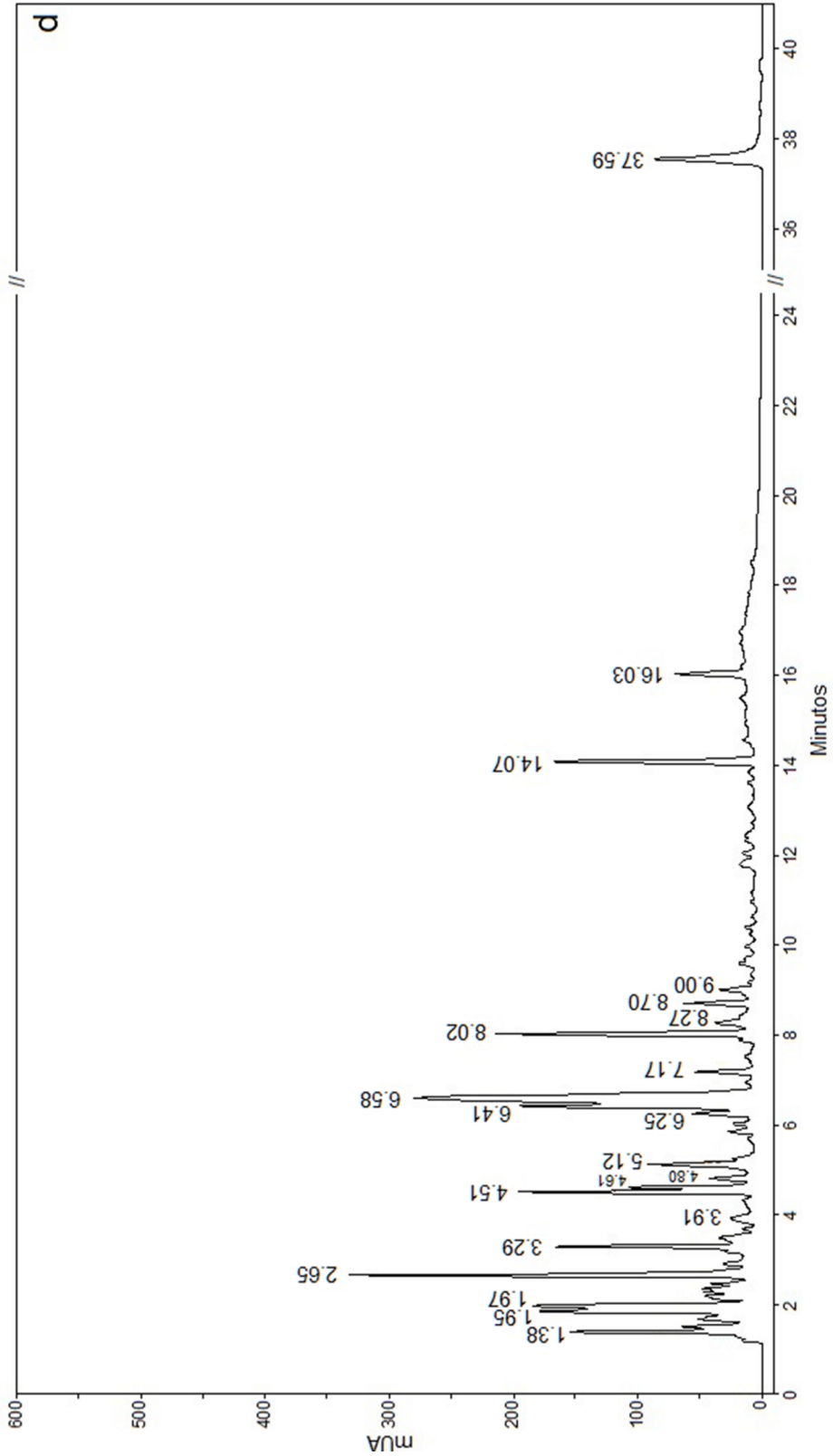


Figura 22. Cromatograma a 260 nm del extracto crudo de pitaya *S. stellatus* roja (SSRM) obtenido por HPLC-DAD.

6.8.1.1 Análisis de fenoles libres (FL), glicosilados (FG) y esterificados (FE) por HPLC-DAD.

El extracto de pitaya blanca *S. stellatus* se sometió al proceso de separación e hidrólisis secuencial para que los compuestos fenólicos unidos a un azúcar o ésteres pudieran identificarse. Se aprecia que la fracción de FL (Figura 23) es menos compleja que la del extracto crudo (Figura 19).

Después de realizar la hidrólisis ácida se observaron cambios en el perfil cromatográfico, por la aparición o aumento en la intensidad de las señales; lo cual es evidente en la señal a 5.7min (Figura 23).

Al comparar el perfil de los FG y FE; se observó que, después de aplicar la hidrólisis alcalina, disminuyó la intensidad de la señal a 5.7min (derivado de ácido siríngico), mientras que la señal a 7.2min (no identificado) no se modificó (Figura 23).

En las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo de pitaya blanca fue posible identificar diferentes fenoles gracias al análisis de los espectros de absorción y tiempos de retención (Cuadro 20).

Cuadro 20. Fenoles libres (FL), glicosilados (FG) y esterificados (FE) identificados por HPLC-DAD en extractos hidrolizados de pulpa de pitaya blanca *S. stellatus*.

#	Fracción Compuesto fenólico	tr (min)	FL	FG	FE	Grupo
1	Derivado de ácido gálico	5.1	✓	✓	✓	Hidroxibenzoico
2	Derivado de ácido siríngico	5.7	✓	✓	✓	Hidroxibenzoico
3	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	9.3			✓	Hidroxibenzoico
4	Ácido cafeico	10.9			✓	Hidroxicinámico
5	Ácido p-cumárico	13.4		✓		Hidroxicinámico
6	Rutina	14.2		✓		Flavonol
7	Naringina	16.6	✓	✓		Flavanona
8	Hesperidina	17.0		✓		Flavanona
9	Eugenol	38.4	✓	✓		Fenol simple

FL: fenoles libres, FG: fenoles glicosilados, FE: fenoles esterificados, tr: tiempo de retención.

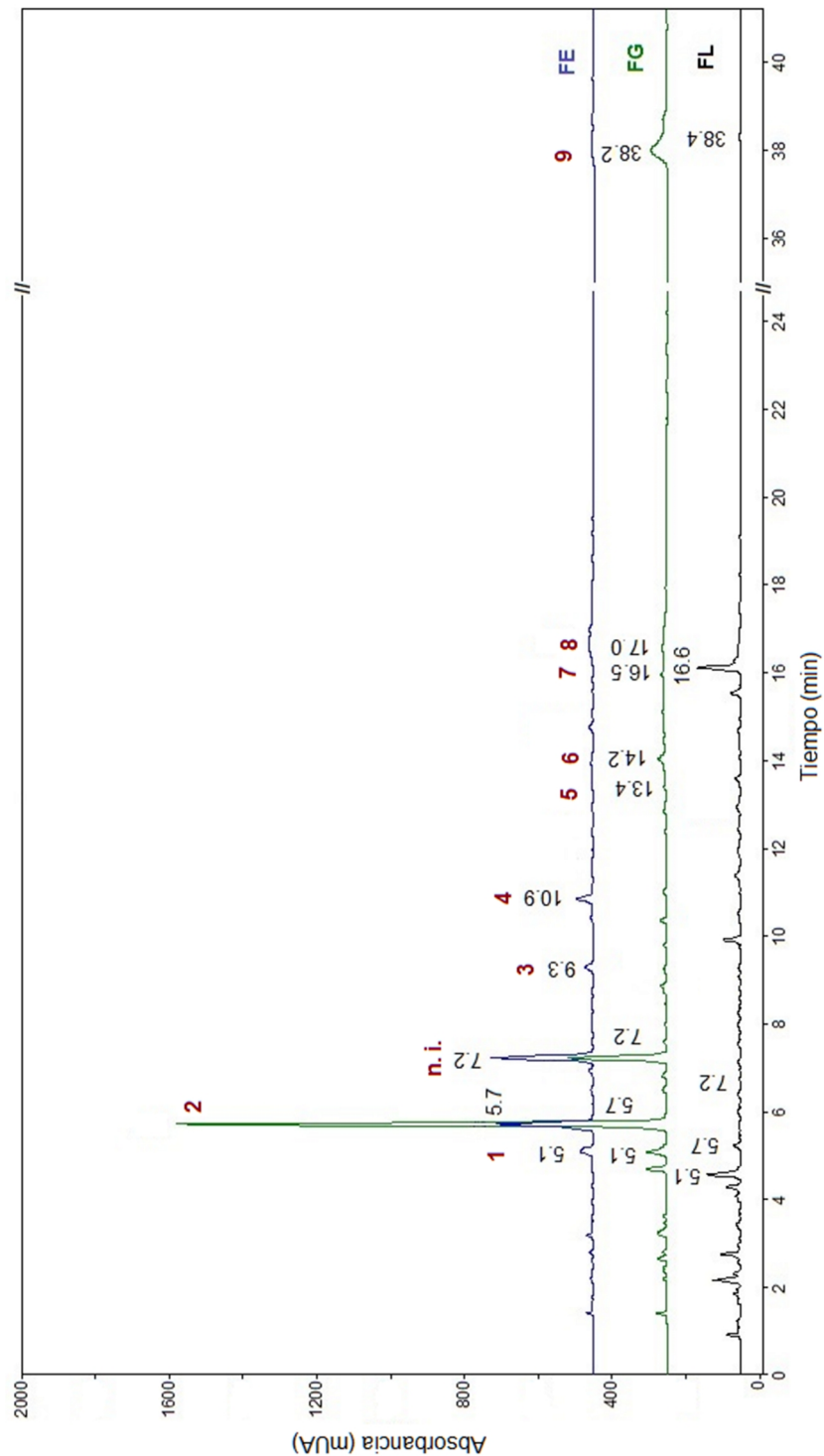


Figura 23. Cromatograma a 260nm de las fracciones de fenoles libres, glicosilados y esterificados de pitaya *S. stellatus* blanca (SSBM) obtenidos por HPLC-DAD. Fenoles libres (FL), glicosilados (FG), esterificados (FE) (1) derivado de ácido gálico, (2) derivado de ácido siríngico, (3) ácido 2,5-dihidroxibenzoico, (4) ácido cafeico, (5) ácido p-cumárico, (6) rutina, (7) naringina, (8) hespiridina, (9) eugenol, (n. i.) no identificado.

Estos resultados confirman la identificación preliminar realizada en los extractos crudos de las cuatro variedades de pitaya *S. stellatus* (Cuadro 19); porque después de realizar la hidrólisis en la pitaya blanca se identificaron compuestos fenólicos de las mismas familias químicas (hidroxibenzoicos, hidroxicinámico, flavonas y fenoles simples).

La importancia de la presencia de compuestos fenólicos en los alimentos, ya sea de manera natural o por su adición, se debe en gran medida a su capacidad antioxidante, por ello existe un extenso número de estudios relacionados con el efecto de los fenoles en diferentes enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo que han profundizado en sus efectos y mecanismos de acción (Agbo *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Mallick *et al.*, 2016; Amalan *et al.*, 2016).

El ácido ascórbico actúa como donador de electrones para enzimas humanas (Liu y Edwards, 2001), mostró efecto protector contra daño renal (Peyravi *et al.*, 2016), aumentó de la fertilidad de ratas macho (Sönmez *et al.*, 2005), y protección contra apoptosis neuronal inducida por plomo (Ebrahimzadeh-Bideskan *et al.*, 2016).

El ácido gálico y sus derivados (3,4,5 tri-O-metil ácido gálico y metil-3-O-metil galato) presentan una importante actividad antioxidante y existe gran interés en caracterizarlos por su capacidad para disminuir el daño oxidativo en las células (Agbo *et al.*, 2015). Latha y Daisy (2011) definieron que el ácido gálico es un agente antidiabético ya que está relacionado con la regeneración de células β y la normalización de los parámetros patológicos-bioquímicos de la diabetes mellitus; también presentó efecto radioprotector contra radiación gamma (Nair y Nair 2013). De igual forma que el ácido gálico, el ácido cafeico y otros fenoles han mostrado efectos hepatoprotectores (Pereira *et al.*, 2015).

Wang *et al.*, (2013) demostraron que el ácido cafeico esterificado es antiinflamatorio y antioxidante y estas propiedades se relacionan con el efecto protector contra la lesión pulmonar aguda inducida por químicos (fosgeno). También se ha demostrado que derivados del ácido cafeico pueden aliviar los daños por bifenilos policlorados en hígado (Li *et al.*, 2014).

La naringina y otros flavonoides han mostrado efectos anticoagulantes y antianémicos (Mallick *et al.*, 2016) además de hipolipidémicos (Gorinstein *et al.*, 2006) y actividad anticarcinogénica (Giovannucci *et al.*, 2002).

El eugenol inhibe la producción de enzimas intracelulares provocando el deterioro y lisis de la pared celular, por lo cual tiene una importante actividad antimicrobiana (Engels *et al.*, 2009).

El ácido *p*-cumárico mejoró el nivel de inulina en plasma y reguló los niveles de glucosa en ratas con diabetes inducida, además de los efectos antiinflamatorio, hepatoprotector, neuroprotector (Amalan *et al.*, 2016).

Hesperidina mostró efectos antiobesidad y antidiabético. En ratas Wistar inhibió la síntesis y absorción de colesterol y redujo los triglicéridos totales hepáticos y en suero además de reducir el peso corporal de ratones obesos (Jung *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011; Jack *et al.*, 2016).

El ácido 2,5-dihidroxibenzoico (ácido gentísico) ha mostrado efectos positivos en pacientes con artritis, actividad antimutagénica y antimicrobiana (Sharma *et al.*, 2004; Boaventura *et al.*, 2013).

6.8.2 Análisis de pigmentos por HPLC - DAD.

Al analizar los cromatogramas de los extractos crudos a 538 y 483nm, se observaron las señales correspondientes a los pigmentos presentes en la pulpa de las pitayas (Figura 24).

Se observaron 5 señales a 538nm cuyas principales diferencias fueron el tamaño de pico (Figura 24a). Por otro lado, a 483nm se observó mayor diversidad de señales en los extractos de pitaya amarilla (SSAM), violeta (SSVM) y roja (SSRM) correspondientes a betalaínas (Figura 24b).

Debido al tamaño de las señales, es evidente que la pitaya roja presentó una mayor concentración de pigmentos, seguida de la violeta y posteriormente la amarilla. Además, también el número de betalaínas presentes fue diferente presentando 9, 8 y 7 señales la roja, violeta y amarilla respectivamente.

Por otro lado, en la muestra roja y violeta; se presentó la elución de 3 diferentes compuestos del min 6 al 6.8, mientras que en el mismo periodo de tiempo en la

amarilla solo se observan dos señales, lo que indica la presencia de diferentes betalaínas.

6.9 Selección de una variedad para la extracción de compuestos bioactivos.

Los resultados obtenidos durante la caracterización de las diferentes variedades de pitaya *S. stellatus*; evidenciaron que la pitaya roja presentó el mayor contenido de betalaínas, un contenido de compuestos fenólicos en niveles similares a las otras variedades y solo la pitaya blanca la superó en capacidad antioxidante, debido a su mayor contenido de ácido ascórbico (Cuadro 16).

Al realizar el ACP del contenido de pigmentos en diferentes cactáceas la pitaya roja se localizó en el área central del gráfico de CP (Figura 17) y al establecer los intervalos de confianza se clasificó como una buena fuente de betalaínas, mientras que la amarilla y la violeta tuvieron un contenido bajo (Cuadros 16 y 17).

En relación a los resultados de HPLC-DAD la altura en las señales correspondientes a pigmentos, Bc y Bx (Figura 24) ponen en evidencia que la pitaya roja tiene el más alto contenido de pigmentos al compararla con las otras variedades de frutas *S. stellatus*.

Por lo anterior, se seleccionó la pitaya roja *S. stellatus* de Puebla como fuente de pigmentos para continuar con el desarrollo de las siguientes etapas del presente proyecto de investigación.

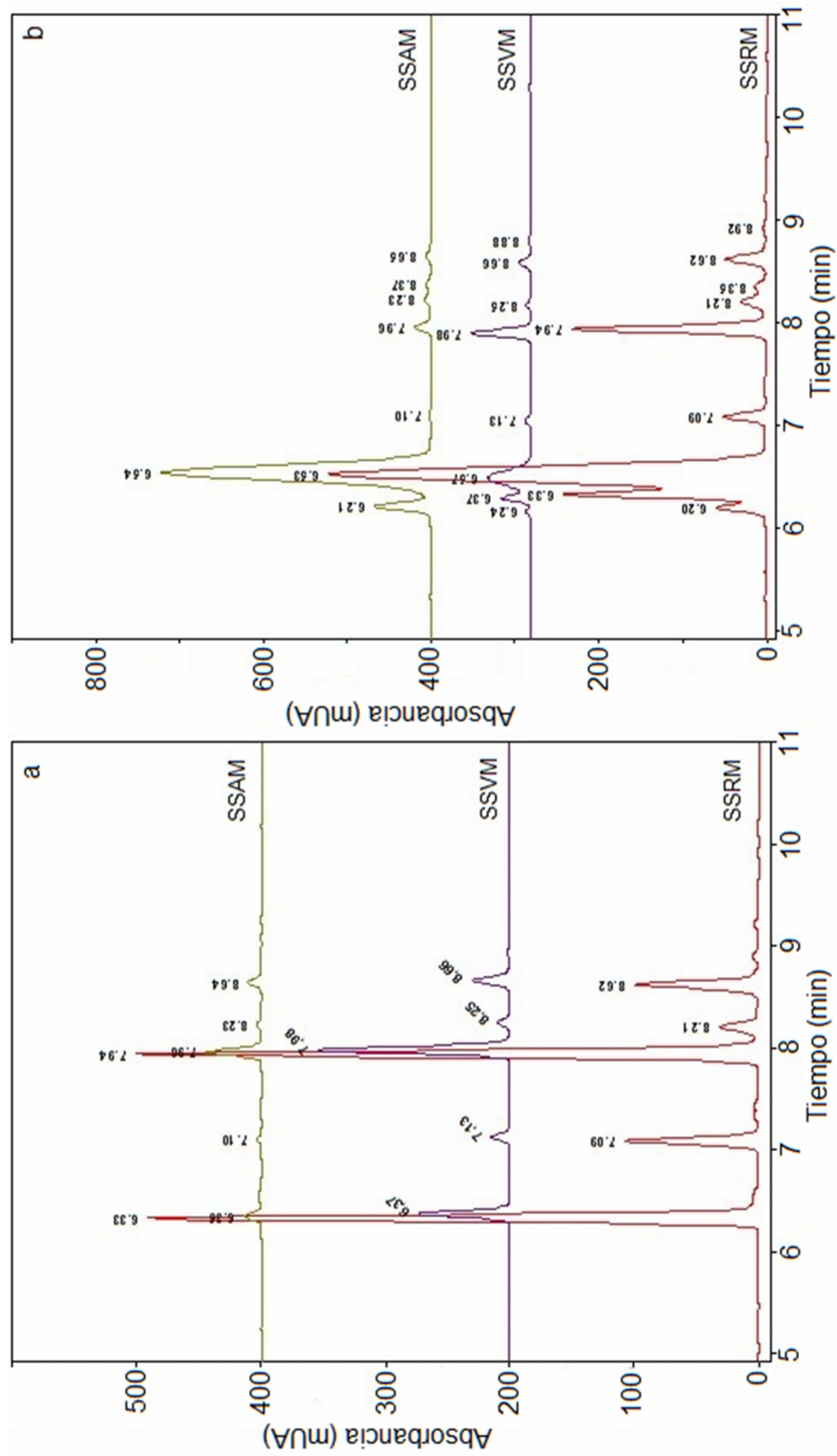


Figura 14. Cromatogramas (a) 538 y (b) 483nm de los extractos de pitayas *S. stellatus* amarilla (SSAM), violeta (SSVM) y roja (SSRM) obtenidos por HPLC-DAD.

6.10 Efecto de los pretratamientos en la extracción de compuestos bioactivos en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja *S. stellatus*.

En el caso de las tunas, es fácil separar las semillas de la pulpa debido a su tamaño y dureza, sin embargo, las semillas de la pitaya son pequeñas y frágiles, por lo que la separación de la pulpa es difícil y genera una pérdida de cerca del 31% de muestra. Por tal motivo es importante evaluar la posibilidad de utilizar pulpa con semillas para realizar la extracción de pigmentos y otros compuestos de interés presentes en la misma.

6.10.1 Extracción de betalainas en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja *S. stellatus*.

La Figura 19 muestra el contenido de Bc, Bx y BT en los extractos de pulpa sin y con semillas tras aplicar los diferentes pretratamientos. Se encontró que los tratamientos enzimáticos reducen el contenido de pigmentos en el extracto ($p \leq 0.05$) en pulpa sin semillas y pulpa con semillas y que un mayor tiempo de incubación provoca una mayor pérdida de pigmentos principalmente Bx.

Se observó una pérdida de BT en pulpa con y sin semillas por efecto de la temperatura; esto es evidente al analizar los valores de los grupos control sin enzima (CEA, CEB) donde se observó que, al incrementar el tiempo de incubación de 2 (†) a 24h (††), la cantidad de BT disminuyen del 9–34% en pulpa sin semillas y del 28–42% en pulpa con semillas con respecto al control, debido a la destrucción de pigmentos termosensibles presentes en la pitaya y como resultado de un prolongado calentamiento de la muestra (Figura 25).

La mayor estabilidad térmica de las betacianinas respecto a las betaxantinas de las pitayas se ha reportado en otros frutos de cactáceas (Herbach *et al.*, 2004; Moßhammer *et al.*, 2005b).

Algo similar fue reportado por Herbach *et al.*, (2007); quienes observaron una pérdida de betacianinas de 22–36% al realizar una hidrólisis enzimática parcial del mucílago de pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) a 40°C por 2h.

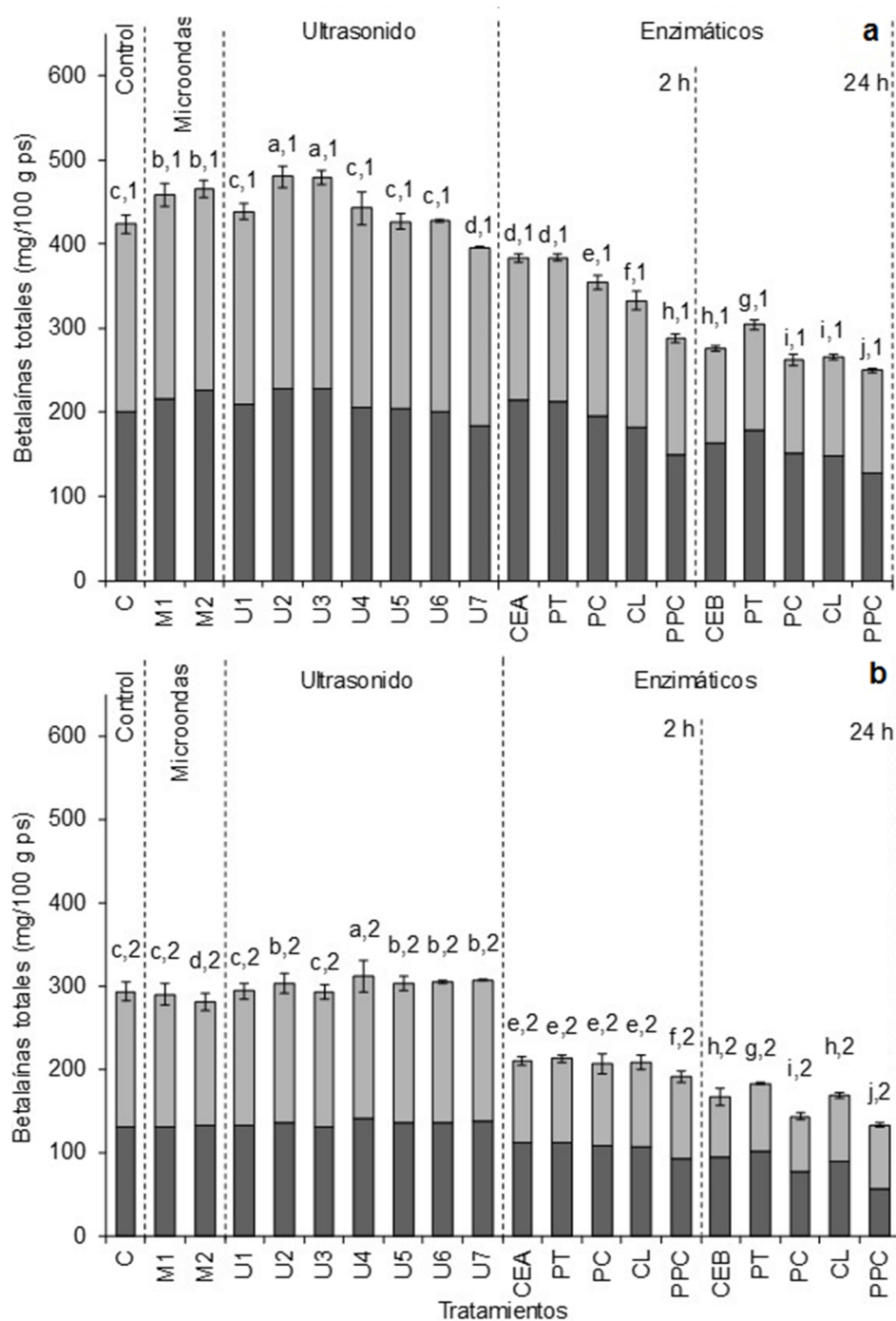


Figura 25. Betalainas totales (BT) en pulpa sin semillas (a) y pulpa con semillas de pitaya roja *S. stellatus* (b) obtenidas después de la aplicación de los pretratamientos. Microondas (Mi) y ultrasonido (U), por diferentes periodos de tiempo. Proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC) con incubación por 2 y 24h; comparados con los controles sin tratamiento (C, CEA, CEB). La barra muestra el contenido de Bc (■) y Bx (□). Letras diferentes indican diferencia significativa entre los pretratamientos ($p \leq 0.05$). Números diferentes indican diferencia significativa entre muestras (pulpa sin semillas y con semillas) ($p \leq 0.05$).

La concentración de los pigmentos obtenida en pulpa sin semillas presentó el siguiente orden (de menor a mayor) (Figura 25a):

Bc: $PPC^{\dagger\dagger} < PC^{\dagger\dagger} = CL^{\dagger\dagger} = PPC^{\dagger} < CL^{\dagger} = PT^{\dagger\dagger} = U7 < PC^{\dagger} = \mathbf{C} < PT^{\dagger} = U1 = U4 = U5 = U6 = M1 < U2 = U3 = M2$

Bx: $CL^{\dagger\dagger} = PC^{\dagger\dagger} < PPC^{\dagger\dagger} = PT^{\dagger\dagger} < PPC^{\dagger} < CL^{\dagger} = PC^{\dagger} = PT^{\dagger} < U7 < U6 = U5 = U4 = U1 = M1 = M2 = \mathbf{C} < U2 = U3$

BT: $PPC^{\dagger\dagger} < CL^{\dagger\dagger} = PC^{\dagger\dagger} < PT^{\dagger\dagger} = PPC^{\dagger} < CL^{\dagger} < PC^{\dagger} < PT^{\dagger} = U7 < U6 = U5 = U4 = U1 = \mathbf{C} < M1 = M2 < U2 = U3$

Al aplicar ultrasonido por 10 y 15min hubo mayor extracción de pigmentos respecto al control. El ultrasonido por 15min incrementó el contenido de Bc, Bx y BT; 13.60, 12.73 y 13.14% respectivamente.

Sivakumar *et al.*, (2009) encontraron que el rendimiento de la extracción de pigmentos del betabel incrementó 8% aplicando ultrasonido sin necesidad de aplicar elevadas temperaturas.

Los resultados de pulpa con semillas se observan en la Figura 25b, presentándose de menor a mayor en el siguiente orden:

Bc: $PPC^{\dagger\dagger} < PC^{\dagger\dagger} < CL^{\dagger\dagger} < PPC^{\dagger} < PT^{\dagger\dagger} < CL^{\dagger} = PC^{\dagger} = PT^{\dagger} < \mathbf{C} = M1 = M2 = U1 = U3 < U2 = U5 = U6 = U7 < U4$

Bx: $PC^{\dagger\dagger} < PPC^{\dagger\dagger} < CL^{\dagger\dagger} = PT^{\dagger\dagger} < PT^{\dagger} = PC^{\dagger} = CL^{\dagger} = PPC^{\dagger} < M2 < M1 < \mathbf{C} = U1 = U3 < U2 = U5 = U6 < U7 = U4$

BT: $PPC^{\dagger\dagger} < PC^{\dagger\dagger} < CL^{\dagger\dagger} < PT^{\dagger\dagger} < PPC^{\dagger} < CL^{\dagger} = PC^{\dagger} = PT^{\dagger} < M2 < M1 = \mathbf{C} = U1 = U3 < U2 = U5 = U6 = U7 < U4$

En pulpa con semillas la extracción de Bc, Bx y BT incrementó con el tratamiento de ultrasonido por 20 minutos en 6.88, 5.88 y 6.30% respectivamente.

Al comparar los resultados de pulpa sin semillas y pulpa con semillas, se encontró que en pulpa con semillas se obtienen menos betalaínas (Figura 25a y 25b).

Al comparar los valores obtenidos para el tratamiento U15 corregidos para pulpa con semillas con base en la cantidad de semilla presente, se observó menor concentración respecto a la pulpa sin semillas ($p \leq 0.05$) de Bc, Bx y BT un 16.76, 6.58 y 11.41% respectivamente; lo cual demostró que la presencia de las semillas afectó negativamente la extracción de betalaínas.

La presencia de las semillas de pitaya presentó un efecto negativo en la extracción de pigmentos; se obtuvo un contenido de BT menor entre 22.3–46.7% ($p \leq 0.05$) en pulpa con semillas respecto a pulpa sin semillas.

En el proceso de obtención de jugos de tuna, Moßhammer *et al.*, (2006); separan la piel y las semillas para evitar la decoloración provocada por la degradación de clorofila.

Además del decaimiento de las betalaínas, pueden presentarse otras reacciones como el pardeamiento no enzimático u oxidación del ácido ascórbico (Suh *et al.* 2003).

6.10.2 Extracción de compuestos fenólicos totales en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja *S. stellatus*.

En contraste con los resultados observados para la extracción de pigmentos, los pretratamientos enzimáticos incrementaron los valores de CFT en los extractos ($p \leq 0.05$) de pulpa sin y con semillas (Figura 26). Al aumentar el tiempo de incubación de 2 (†) a 24h (††) se observó un efecto negativo sobre la extracción de CFT de pulpa sin semillas (Figura 26a).

El orden creciente de los valores obtenidos es el siguiente:

Pulpa sin semillas: $U7 = U5 = U4 < U3 = U1 = U6 = M2 = M1 = \mathbf{C} < CL_{\dagger\dagger} < U2 = CL_{\dagger} < PT_{\dagger\dagger} = PPC_{\dagger\dagger} = PPC_{\dagger} < PT_{\dagger} = PC_{\dagger\dagger} < PC_{\dagger}$

Pulpa con semillas: $PC_{\dagger\dagger} < M1 = U3 < \mathbf{C} < U1 = U2 = U5 = U6 < U4 < U7 < PT_{\dagger} < CL_{\dagger} = PT_{\dagger\dagger} < PC_{\dagger} < PPC_{\dagger} < CL_{\dagger\dagger} < M2 < PPC_{\dagger\dagger}$

En el proceso de incubación por 2h el efecto de la temperatura produjo un incremento en la extracción de CFT un 60 y 61% en pulpa sin semillas y pulpa con semillas (C contra CA).

Aumentar el tiempo de incubación a 24h reduce el incremento a solo 9% en pulpa sin semillas y 45% para pulpa con semillas (C contra CB) lo cual demostró que la temperatura tiene un efecto positivo en la extracción de CFT, pero no es recomendable por tiempos prolongados.

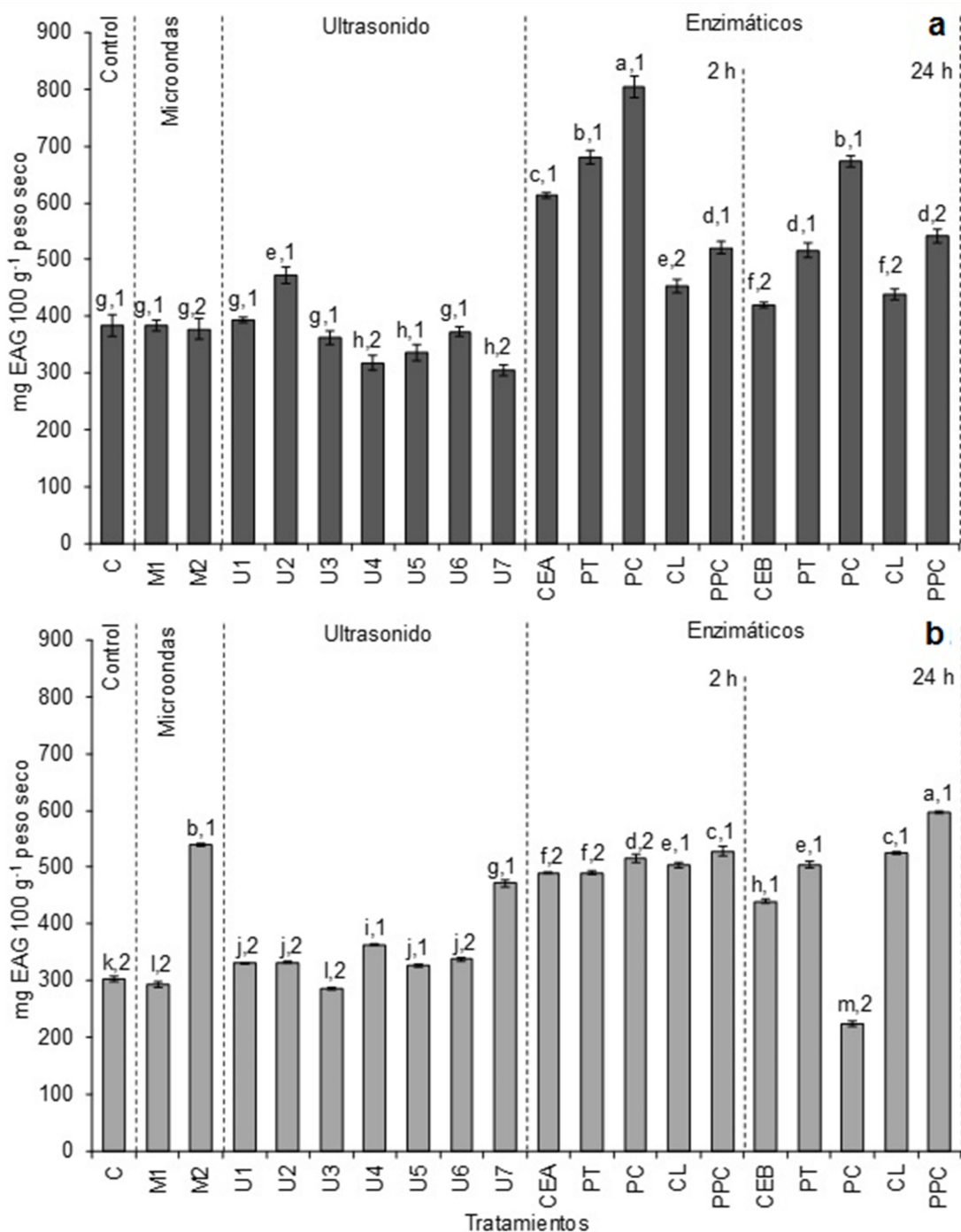


Figura 26. Compuestos fenólicos totales (CFT) en pulpa sin semillas (a) y pulpa con semillas de pitaya roja *S. stellatus* (b) obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos. Microondas (Mi) y ultrasonido (U), por diferentes periodos de tiempo. Proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC) con incubación por 2 y 24h; comparados con los controles sin tratamiento (C, CEA, CEB). Letras diferentes indican diferencia significativa entre los pretratamientos ($p \leq 0.05$). Números diferentes indican diferencia significativa entre muestras (pulpa sin semillas y con semillas) ($p \leq 0.05$).

El tratamiento con PC† incrementó el contenido de CFT en un 109.79 y 70.40% en las muestras pulpa sin semillas (Figura 26a) y pulpa con semillas (Figura 26b) respecto al control. Gómez-García *et al.*, (2012) reportaron incrementos de CFT del 25% en residuos de uva y del 28–35 % en desechos de cítricos y de frambuesa (Li *et al.*, 2005; Laroze *et al.*, 2010), que son valores inferiores a los obtenidos en este trabajo.

Al aplicar tratamientos enzimáticos, la hidrólisis parcial del mucílago permite extraer los compuestos ligados a la matriz polimérica y facilita el procesamiento de muestras (Puri *et al.*, 2012; Schweiggert *et al.*, 2009). Además, el ácido galacturónico es un componente abundante del mucílago (Combo *et al.*, 2011); si durante la hidrólisis enzimática se liberó dicho compuesto o se expusieron sus grupos funcionales (hidroxilo y carboxilo) puede incrementarse el valor de CFT.

En pulpa sin semillas el pretratamiento con microondas no incrementó el contenido de CFT ($p \geq 0.05$) mientras que en pulpa con semillas el tratamiento M2 aumentó los CFT 78.1 % ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, el pretratamiento con ultrasonido por 10min incrementó ($p \leq 0.05$) los CFT un 22.9% en pulpa sin semillas y 9.6% en pulpa con semillas (Figura 26). Esto significa que el rendimiento de CFT en los extractos, depende de las características del material vegetal en cuestión.

Nayak *et al.*, (2015), evaluaron diferentes métodos de extracción de fenoles en cáscara de cítricos, encontrando un incremento de 20.47% en la extracción asistida por microondas con respecto a la extracción convencional por disolventes y 1.37% en la extracción asistida por ultrasonido.

Al comparar los valores de CFT obtenidos en pulpa sin semillas y pulpa con semillas con el tratamiento enzimático (PC†) la presencia de semilla incrementó la extracción en 7.13% (dato corregido). Al comparar los valores de CFT más altos en pulpa sin semillas (PC†) y pulpa con semillas (PPC††) encontramos que en esta última incrementó el contenido de CFT 7.6%.

6.10.3 Valores de capacidad antioxidante en pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja *S. stellatus*.

En la Figura 27 se observa el valor de CA en extractos de pulpa sin semillas (27a) y pulpa con semillas (27b). Los tratamientos enzimáticos incrementaron los valores de CA ($p \leq 0.05$); se observó que la incubación por 2 h (†) dió como resultado un aumento entre 55–109% en la CA (Figura 27).

La CA incrementó ($p \leq 0.05$) 74.8% en pulpa sin semillas y 25.3% en pulpa con semillas al aplicar el pretratamiento con PC†, mientras que al aplicar los pretratamientos por ultrasonido en pulpa sin semillas disminuyó ($p \leq 0.05$) con respecto al control y se observó la influencia por el tiempo de tratamiento (Figura 27a).

En pulpa con semillas se incrementó el valor de CA (14.2–39.7%) con respecto al control, al aplicar los pretratamientos con ultrasonido (Figura 27b). Nayak *et al.*, (2015) observaron un incremento del 17.23 % en la CA (evaluada mediante el ensayo de DPPH) al aplicar extracción asistida por ultrasonido en piel de cítricos.

Se obtuvo una CA menor ($p \leq 0.05$) en pulpa con semillas respecto a la pulpa sin semillas (Figura 27). La presencia de semillas en la pulpa disminuyó la extracción de compuestos bioactivos de la pitaya, en especial las betalaínas por lo cual la CA fue menor entre 23–79%.

Urias-Orona *et al.*, (2010) encontraron que la pectina interacciona con moléculas oxidantes y radicales libres y el contenido de ácido galacturónico incrementa su CA; por otro lado, al hidrolizar los polisacáridos de cladodios de nopal (*Opuntia ficus indica*) se encontró una mayor CA en las fracciones de más bajo peso molecular (Chaouch *et al.*, 2015). Con base en esto es posible que la hidrólisis parcial de mucílago diera como resultado un incremento en la CA de los extractos de pitaya.

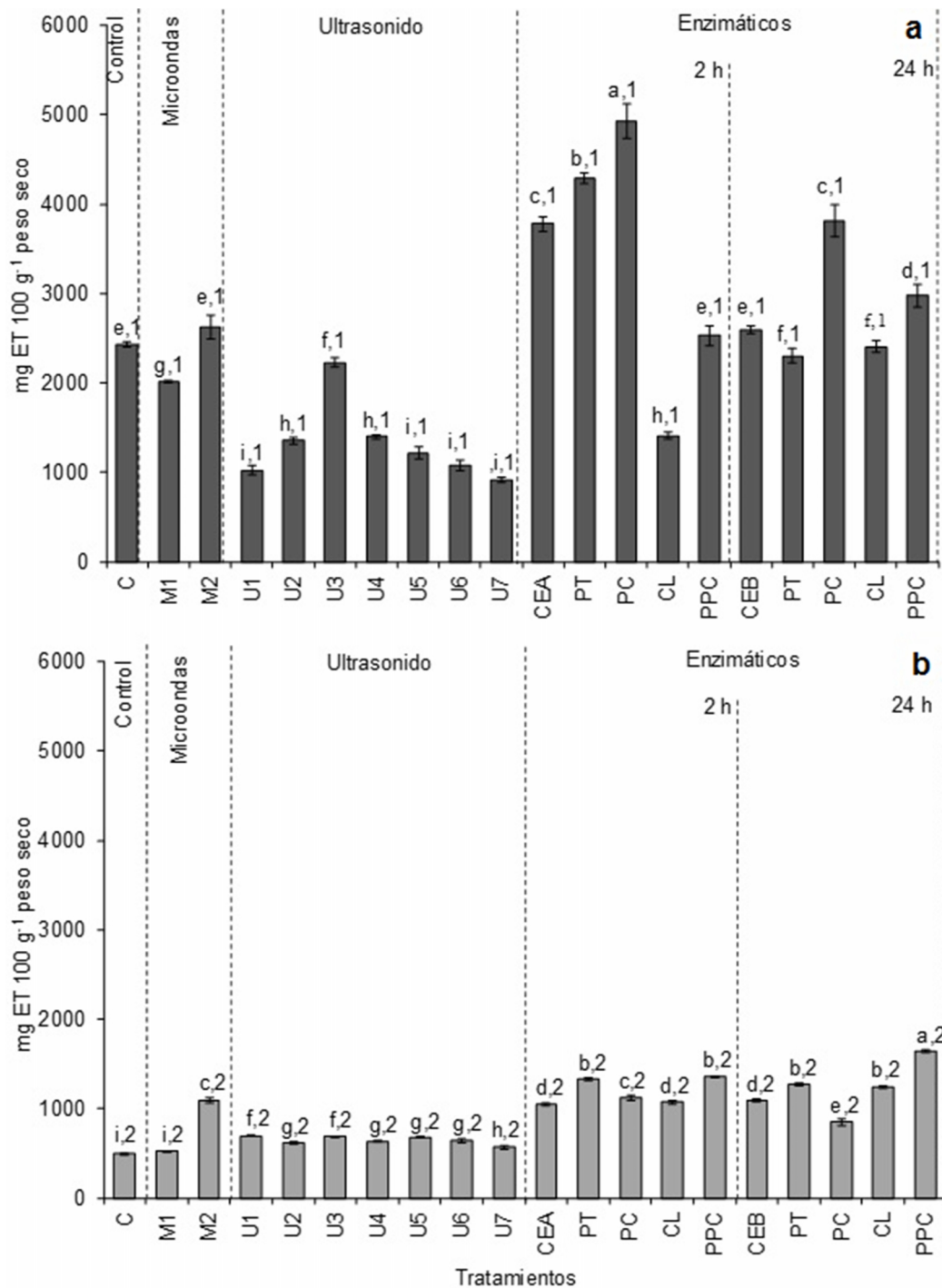


Figura 27. Capacidad antioxidante (CA) de pulpa sin semillas (a) y pulpa con semillas (b) de pitaya roja *S. stellatus* obtenida después de la aplicación de los pretratamientos. Microondas (Mi) y ultrasonido (U), por diferentes periodos de tiempo. Proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC) con incubación por 2 y 24h; comparados con los controles sin tratamiento (C, CEA, CEB). Letras diferentes indican diferencia significativa entre los pretratamientos ($p \leq 0.05$). Números diferentes indican diferencia significativa entre muestras (pulpa sin semillas y con semillas) ($p \leq 0.05$).

6.10.4 Selección de la muestra y el pretratamiento para la extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja *S. stellatus*.

Se calcularon y compararon los valores corregidos de Bc, Bx, BT, CA y CFT de pulpa para las muestras de pulpa con semillas, tomando en consideración la cantidad de semillas contenidas en la muestra. Esta comparación permitió determinar si las diferencias en la extracción se debían a la presencia de las semillas o a un efecto de dilución. En el Cuadro 21, se presentan los resultados obtenidos en las muestras sin pretratamiento (C) y con los pretratamientos de ultrasonido por 15 min (U3) y pectinasa 2 h (PC†).

Cuadro 21. Pigmentos (Bc, Bx, BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) de los extractos acuosos de pulpa sin semillas y pulpa con semillas de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos con los mejores pretratamientos.

Muestra	Pulpa sin semillas		
Tratamiento	Ultrasonido 15min	Pectinasa 2h	Control
Bc (mg 100g ⁻¹ PS)	227.6 ± 3.7 ^{1, A}	194.9 ± 8.2 ^{1, B}	200.4 ± 2.2 ^{1, B}
Bx (mg 100g ⁻¹ PS)	251.7 ± 4.7 ^{1, A}	159.7 ± 3.9 ^{1, C}	223.2 ± 12.9 ^{1, B}
BT (mg 100g ⁻¹ PS)	479.3 ± 8.4 ^{1, A}	354.6 ± 8.5 ^{1, C}	423.6 ± 10.9 ^{1, B}
CFT (mg EAG 100g ⁻¹ PS)	361.8 ± 11.5 ^{2, E}	804.5 ± 19.5 ^{1, A}	383.5 ± 18.4 ^{2, E}
CA (µmoles ET g ⁻¹ PS)	89.1 ± 2.1 ^{1, C}	196.8 ± 7.7 ^{1, A}	97.1 ± 1.2 ^{1, B}
	Pulpa con semillas (corregidos)†		
Bc (mg 100g ⁻¹ PS)	187.3 ± 1.5 ^{2, C}	156.0 ± 5.9 ^{2, D}	188.2 ± 1.5 ^{2, C}
Bx (mg 100g ⁻¹ PS)	232.4 ± 1.1 ^{2, B}	137.7 ± 5.6 ^{2, D}	231.6 ± 1.9 ^{1, B}
BT (mg 100g ⁻¹ PS)	419.6 ± 2.4 ^{2, B}	293.8 ± 10.8 ^{2, D}	419.8 ± 2.6 ^{1, B}
CFT (mg EAG 100g ⁻¹ PS)	409.9 ± 3.0 ^{1, D}	738.4 ± 11.6 ^{2, B}	433.4 ± 5.4 ^{1, C}
CA (µmoles ET g ⁻¹ PS)	39.3 ± 0.6 ^{2, E}	64.4 ± 1.5 ^{2, D}	28.6 ± 0.4 ^{2, F}

Media ± la desviación estándar (DE), n=3. La CA fue evaluada utilizando el radical ABTS. Los superíndices indican diferencias significativas para cada variable ($p \leq 0.05$). Los números indican, diferencias significativas entre muestras (pulpa y pulpa con semilla); las letras indican, diferencias significativas entre los pretratamientos. Ultrasonido 15min, pectinasa 0.5%, incubados a 40°C por 2h, con agitación a 150rpm, pH 4, control. PS: peso seco. †Los valores corregidos fueron calculados considerando un contenido de pulpa en el fruto del 69.82%.

Al comparar los datos corregidos del Cuadro 21 se confirma que; la presencia de semillas impacta negativamente en la extracción de los pigmentos y la capacidad antioxidante y sólo se obtiene un ligero aumento en la extracción de compuestos fenólicos totales (<13%), por lo cual es más recomendable el uso de la pulpa sin semillas.

Adicionalmente, se observó un oscurecimiento de los extractos de la pulpa con semillas que se puede deber a la oxidación o degradación de algunos de los compuestos presentes en el extracto. La presencia de semillas podría favorecer el pardeamiento no enzimático o la oxidación del ácido ascórbico (Suh *et al.*, 2003) que promueven el decaimiento de las betalaínas.

A pesar de la posibilidad de un sesgo en los resultados debido al método utilizado para determinar el contenido de pigmentos, es posible apreciar el nivel de betalaínas en los extractos de frutos de cactáceas (Fernández-López *et al.*, 2002); en este estudio, los valores de betalaínas totales obtenidos, permitieron evaluar y comparar el efecto de los diversos pretratamientos en la extracción de pigmentos en la pitaya roja.

Se determinó que los valores máximos de betacianinas ($227.6\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$), betaxantinas ($251.7\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$) y betalaínas totales ($479.3\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$) se obtienen al aplicar ultrasonido por 15 min. Mientras que los máximos del contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante se obtuvieron al utilizar pectinasa al 0.5% p·p⁻¹, incubados por 2h a 40 °C y con agitación a 150rpm (Cuadro 21).

Con el fin de correlacionar la eficiencia de extracción de los pigmentos, los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante con los pretratamientos empleados, se aplicó un análisis de componentes principales (ACP).

6.10.4.1 Análisis de componentes principales (ACP) de la extracción de los compuestos bioactivos en relación al pretratamiento utilizado.

Al someter los resultados de Bc, Bx, BT, CFT y CA a un ACP, se encontró que dos componentes principales (CP) explican el 96.3% de la variación total de los resultados (CP1: 71.6%; CP2: 24.7%) en pulpa sin semillas (Figura 28a) y 97.3% (CP1: 82.1%; CP2: 15.2%) en pulpa con semillas (Figura 28b) (Anexo IV).

Si bien los gráficos de barras son útiles para analizar cuantitativamente las diferencias entre los diferentes tratamientos para cada una de las muestras (Figuras 25, 26 y 27), el gráfico de componentes principales permite analizar todos los resultados en su conjunto y concluir en función de los agrupamientos resultantes (Figura 28).

Al analizar los gráficos de ACP para la pulpa sin semillas y pulpa con semillas (Figura 28), se puede observar que los tratamientos enzimáticos (PC y PT) están correlacionados con los valores de CFT y CA, mientras que el de ultrasonido (U) y microondas (Mi) lo están con pigmentos.

En el caso de la pulpa sin semillas (Figura 28a), se observa que los pretratamientos enzimáticos con periodos largos de incubación (24h ††) o los de ultrasonido con mayores tiempos de exposición (U4–U7), se alejan de las variables BT, CFT y CA (en los cuadrantes CP2 positivo), lo que significa que la aplicación de dichos pretratamientos por tiempos mayores no favorecen la extracción.

Este efecto no es otorio en la pulpa con semillas (Figura 28b), debido a que los rendimientos de extracción de BT, CFT y CA son muy similares con los diferentes tratamientos y en algunos casos no se observan diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figuras 25, 26 y 27).

Cabe resaltar a que la capacidad antioxidante tiene mayor correlación con la cantidad de compuestos fenólicos (ambas en CP1 negativo), que con la cantidad de betalaínas (en CP1 positivo) (Corral-Aguayo *et al.*, 2010; Gorinstein *et al.*, 2013; Yahia y Mondragon-Jacobo, 2011).

Con base en estos resultados, se sugiere que para lograr el aprovechamiento de la pitaya como fuente de compuestos bioactivos, la pulpa debe separarse de las semillas y para maximizar la extracción de pigmentos, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, aquella debe ser tratada previamente.

Por lo cual, se decidió combinar los tratamientos de ultrasonido 15min con pectinasa 0.5% y analizarlo mediante un diseño factorial 2^2 , con la finalidad de determinar si la combinación mejora la extracción de compuestos bioactivos de la pulpa de pitaya roja.

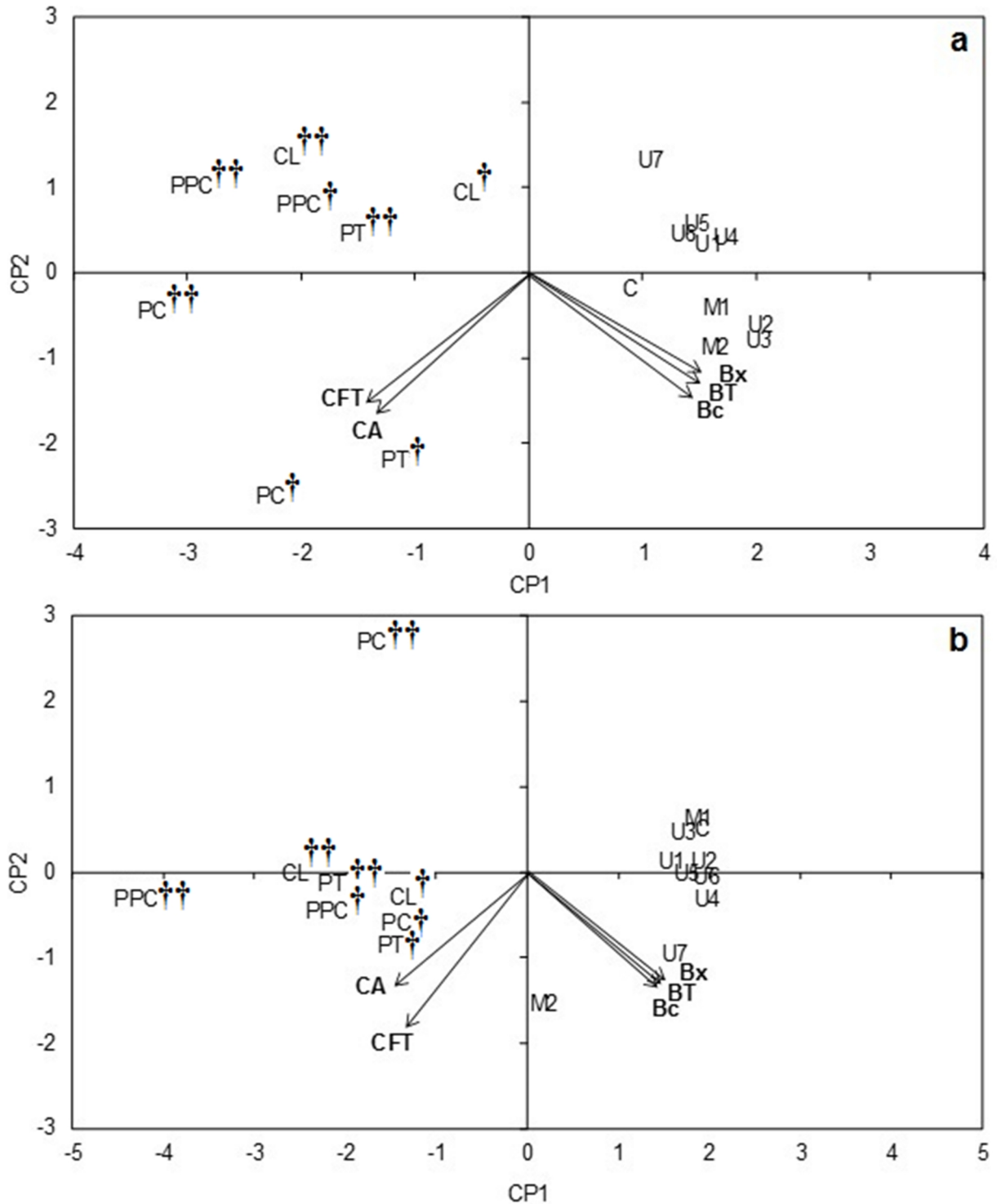


Figura 28. Componentes principales CP1 y CP2 para las cargas y puntuaciones del ACP de Bc, Bx, BT, CFT y CA en pulpa sin semillas (a) y pulpa con semillas (b) de pitaya roja *S. stellatus* sometida a diferentes pretratamientos. Sin pretratamiento (C), Microondas (Mi) y ultrasonido (U), por diferentes periodos de tiempo. Proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC) con incubación por 2 (†) y 24h (††).

6.10.4.2 Efecto de la combinación de pretratamientos en la extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja *S. stellatus*.

Con los resultados del experimento factorial 2², se observó el efecto de los diferentes tratamientos y su combinación (Cuadro 22).

Cuadro 22. Resultados del diseño factorial 2² para pigmentos (Bc, Bx y BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) en extractos de pitaya roja *S. stellatus*.

Corrida	Valores codificados		Bc (PS)	Bx (PS)	BT (PS)	CFT (PS)	CA (PS)
	A	B	mg·100g ⁻¹	mg·100g ⁻¹	mg·100g ⁻¹	mg EAG·100g ⁻¹	μmol ET·g ⁻¹
1	-1	-1	176.48	200.29	376.77	471.68	52.32
2	1	-1	195.72	221.27	416.99	533.75	53.58
3	-1	1	178.48	147.51	326.00	806.17	87.16
4	1	1	180.39	145.35	325.74	780.99	89.09
5	-1	-1	167.31	190.20	357.51	483.02	56.50
6	1	-1	193.36	218.25	411.62	557.63	53.54
7	-1	1	181.04	151.53	332.57	826.84	85.92
8	1	1	178.76	147.39	326.16	811.54	88.90
9	-1	-1	170.33	193.72	364.05	466.00	49.38
10	1	-1	196.28	219.84	416.13	536.63	57.50
11	-1	1	176.88	148.40	325.29	894.47	86.53
12	1	1	184.60	154.66	339.27	819.17	89.91

A: Ultrasonido, B: Pectinasa. (-1) tratamiento no aplicado y (1) tratamiento aplicado. PS, peso seco. La CA fue evaluada utilizando el radical ABTS.

Con los resultados del análisis factorial se evaluó el efecto de cada factor sobre las diferentes variables evaluadas; las superficies de respuesta (Figura 29) permiten observar el efecto de los pretratamientos sobre las variables de estudio.

Mientras que las superficies de respuesta ilustran el efecto del tratamiento con ultrasonido y pectinasa en el contenido de Bc (Figura 29a), Bx (Figura 29b), CFT (Figura 29c) y los valores de CA (Figura 29d).

Las superficies de respuesta muestran como se afecta la extracción dependiendo del nivel de cada variable; el contenido de CFT (Figura 29c) y CA (Figura 29d) presentaron comportamientos similares y los cambios más evidentes fueron resultado del factor B (pectinasa).

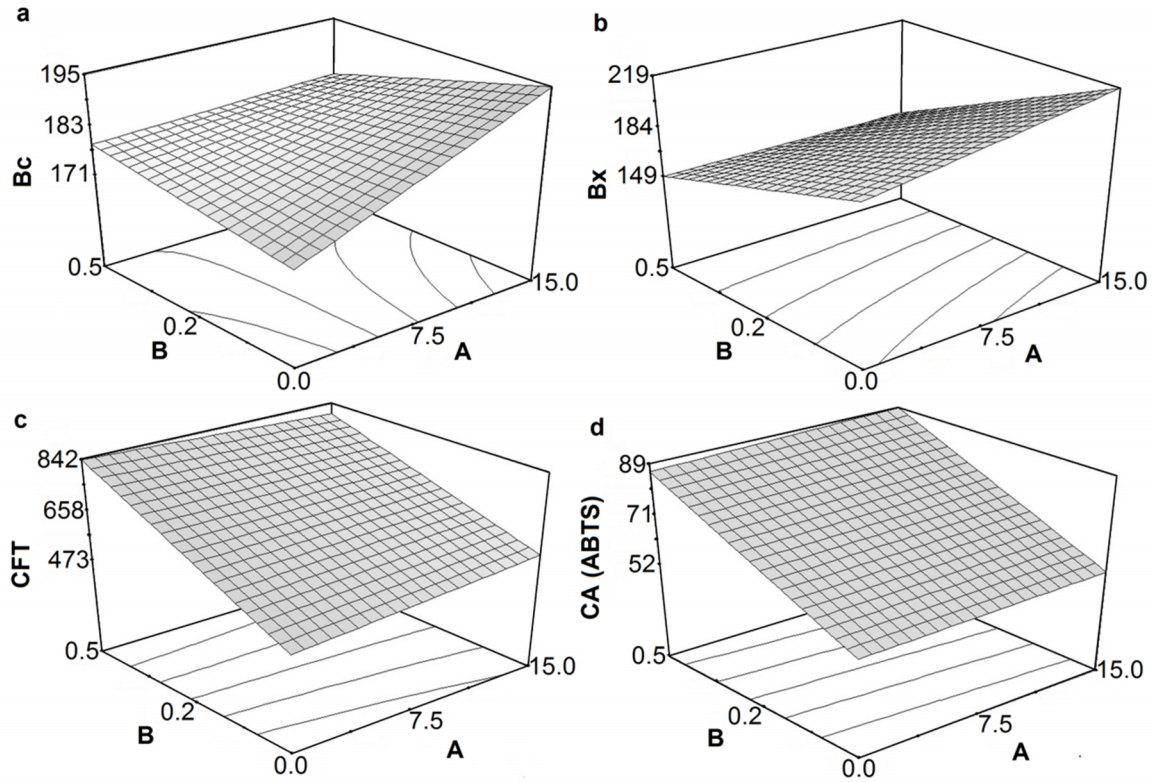


Figura 29. Superficie de respuesta de la extracción de (a) betacianinas (Bc), (b) betaxantinas (Bx), (c) compuestos fenólicos totales (CFT) y (d) capacidad antioxidante (CA) en función de los pretratamientos con ultrasonido (A) y pectinasa (B).

Una interacción entre los factores analizados se presenta cuando el efecto de uno de ellos depende del nivel del otro. La Figura 30 muestra las posibles interacciones entre las variables; mientras mayor sea la diferencia entre las pendientes de las líneas, mayor es el grado de interacción. En las Bc, (Figura 30a) se observa que las líneas de interacción se interceptan y que la combinación de los tratamientos afecta la extracción de pigmentos. Para Bx y BT (Figura 30b y 30c) las gráficas de interacción son muy parecidas; la combinación de los tratamientos propicia un menor contenido de pigmentos. Las gráficas de interacción muestran que es posible encontrar interacción entre los factores analizados; incluso en CFT (Figura 30d) a pesar de la poca diferencia en las pendientes. Sin embargo solo el ANOVA permitió determinar cuales efectos son significativos.

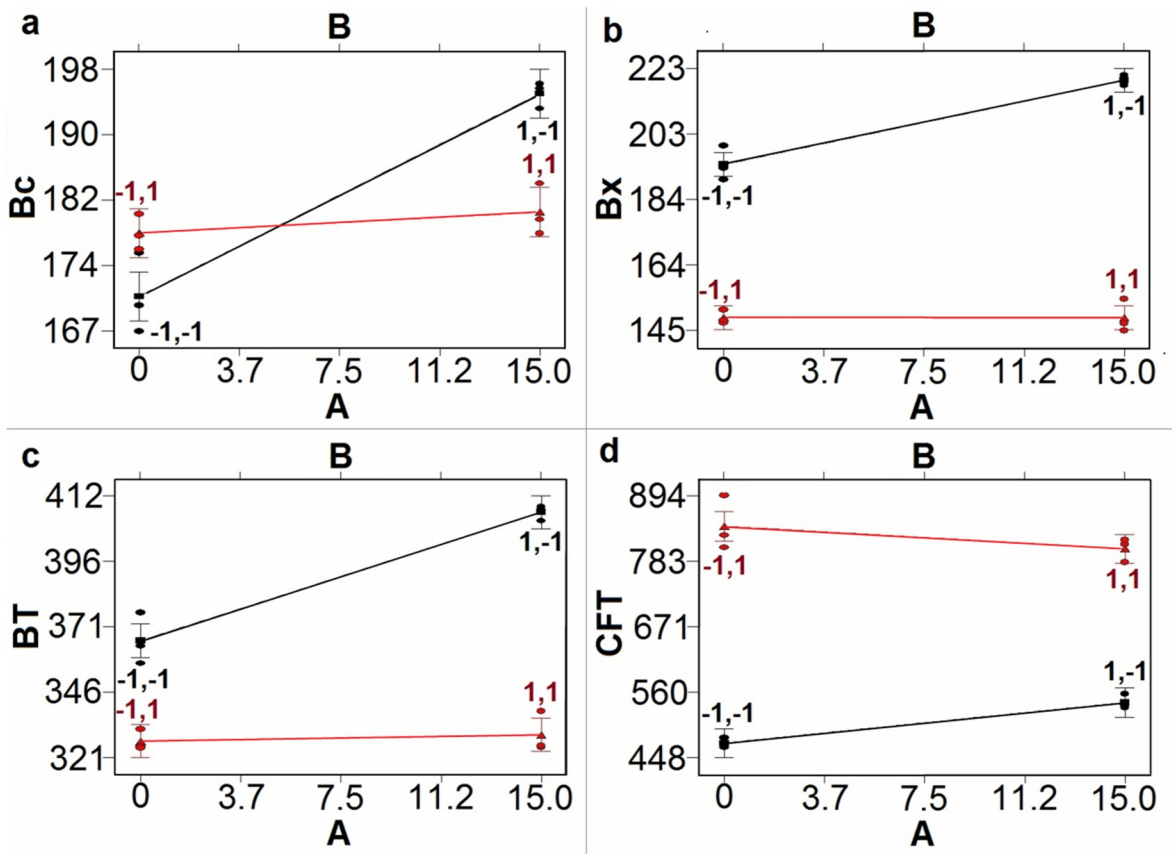


Figura 30. Interacciones en el diseño factorial 2^2 entre los tratamientos por (A) ultrasonido y (B) pectinasa en pulpa de pitaya roja *S. stellatus*. Para (a) betacianinas (Bc), (b) betaxantinas (Bx), (c) betalainas totales y (d) compuestos fenólicos totales (CFT). Donde: -1,-1 = control; 1,-1 = ultrasonido; -1,1 = pectinasa y 1,1 = ultrasonido y pectinasa.

Los resultados del ANOVA del diseño factorial 2^2 indicaron cuales fueron los factores que afectan significativamente a cada variable, se encontró que; en Bc el ultrasonido (A) y ultrasonido con pectinasa (AB) afectaron significativamente el proceso de extracción ($p \leq 0.05$). Para Bx y BT cada tratamiento por separado A y B así como su interacción AB tienen un efecto significativo ($p \leq 0.05$), en el contenido de CFT la pectinasa (B) y AB muestran efecto significativo ($p \leq 0.05$) y en CA solo B presentó efecto significativo ($p \leq 0.05$).

Los modelos matemáticos (Cuadro 23) muestran las variables de respuesta y su relación con los factores evaluados (ultrasonido y pectinasa); las ecuaciones están escritas en términos codificados de los factores significativos ($p \leq 0.05$) y presentaron un buen coeficiente de determinación con valores de R^2 entre

0.9216–0.9898. En estos modelos se desprecian los efectos que no fueron significativos.

Cuadro 23. Modelos matemáticos del diseño factorial 2² en términos codificados de los factores significativos para el proceso de extracción de pigmentos (Bc, Bx, BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Figura	Respuesta	Ecuación en términos codificados	Modelo	R ²
29 y 30a	Bc	$Bc = 181.64 + 6.55A - 5.33AB$	2FI	0.9216
29 y 30b	Bx	$Bx = 178.21 + 6.26A - 29.06B - 6.27AB$	2FI	0.9898
30c	BT	$BT = 359.85 + 12.81A - 30.67B - 11.59AB$	2FI	0.9764
29c y 30d	CFT	$CFT = 665.66 + 157.54B - 26.92AB$	2FI	0.9822
29d	CA	$CA = 70.87 + 17.06B$	2FI	0.9895

A: ultrasonido, B: pectinasa. 2FI: interacción de 2 factores (two factors interaction)

Al analizar los signos en los coeficientes de los modelos matemáticos (Cuadro 23) se describe cuando el efecto de las variables en la extracción de compuestos bioactivos es negativo (disminuyen) o positivo (aumentan).

Al comparar los valores promedio de los resultados del experimento factorial 2² (Anexo V); se encontró que, el uso de ultrasonido incrementó significativamente la extracción de pigmentos (13%) y el uso de pectinasa incrementó los valores de CFT (78%) y CA (65%) con respecto al control. Contrario a lo esperado, la combinación de dos pretratamientos (ultrasonido-pectinasa) no incrementó el rendimiento de todos los compuestos bioactivos, por lo tanto, con este experimento se confirma que la mejor condición para extraer fenoles y obtener valores mayores de CA es el uso de pectinasa (Figura 29c y 29d, signo positivo en la ecuación del cuadro 23); pero si el objetivo es obtener la máxima cantidad de pigmentos, es mejor aplicar el tratamiento por ultrasonido (Figura 29a, signo positivo en la ecuación del cuadro 23).

Los resultados obtenidos al aplicar diferentes pretratamientos muestran que el uso de enzimas, ultrasonido y microondas tienen diferentes efectos en la extracción de pigmentos, fenoles y la capacidad antioxidante de la muestra; estas diferencias están relacionadas con el mecanismo de acción de los tratamientos aplicados (Azmir *et al.*, 2013; Sivakumar *et al.*, 2011; Ghafoor *et al.*, 2011; Alupului *et al.*, 2012; Setyaningsih *et al.*, 2015; Naderi *et al.*, 2010; Schweiggert *et al.*, 2009) y las

características de los compuestos de interés (solubilidad, estabilidad térmica, entre otros). Sin embargo, la selección de un pretratamiento solo o en combinación para la extracción de compuestos bioactivos específicos, dependerá de la matriz y el objetivo del estudio.

Si bien, fue evidente que al combinar los pretratamientos de ultrasonido y pectinasa no se incrementó significativamente ($p \geq 0.05$) la extracción de compuestos bioactivos (Anexo V) comparado con aplicar solo pectinasa; se realizó una prueba de estabilidad a los extractos obtenidos con muestras con y sin pretratamiento. Las muestras fueron almacenadas por tres semanas protegidas de la luz a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y se determinó el contenido de Bc, Bx y BT al final del almacenamiento; se observó que los extractos obtenidos de muestras tratadas con la combinación de Ultrasonido 15 min y pectinasa 0.5%, pH 4, incubadas por 2h a 40°C y con agitación a 150rpm presentaron una retención de BT de 26.1%; a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y 81.6% en refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$); una retención mayor en comparación con las muestras tratadas con pectinasa un 17.5 y 11% respectivamente. Por ello se decidió utilizar la combinación de pretratamientos para la extracción de los compuestos bioactivos de pitaya roja *S. stellatus*.

6.10.4.3 Selección del tiempo de incubación para el pretratamiento de la muestra.

Durante la evaluación de los pretratamientos enzimáticos solo se evaluaron dos tiempos de incubación (2 y 24h); por lo cual con la finalidad de seleccionar el tiempo óptimo para el pretratamiento enzimático se aplicó la combinación de los pretratamientos con ultrasonido 15 min y pectinasa al 0.5% p·p⁻¹ a 40°C , con agitación a 150 rpm, incubados por diferentes tiempos (0.5 – 5h) (Sección 5.8.2).

El contenido de betacianinas disminuyó en los extractos entre 2.9–12.29%; el descenso en betaxantinas fue máximo (40.18%) desde los 30 min de incubación y la cantidad de betalaínas totales disminuyó entre 16.15–27.38%. Debido a que en todos los casos se observó descenso del contenido de betalaínas no fue posible seleccionar el tiempo de incubación con base en esta variable.

Por otro lado, se observó un incremento en los fenoles totales y la capacidad antioxidante ($p \leq 0.05$) del 47 y 21% en los extractos incubados por 3h con respecto al contro, La aplicación de mayor tiempo de incubación disminuyó estos valores. Por ello, las condiciones seleccionadas para el pretratamiento de la pulpa de pitaya fueron: Ultrasonido 15 min combinado con pectinasa al 0.5 % p·p⁻¹, 40°C, con 3h de incubación y con agitación a 150rpm. De esta forma los extractos obtenidos presentaron valores más altos de CFT y CA con una pérdida de BT del 18%.

En residuos de uva, Gómez-García *et al.*, (2012) evaluaron tiempos de hidrólisis entre 0 y 36h y observaron que el periodo de incubación adecuado para obtener la mayor extracción de fenoles y valores de capacidad antioxidante fue de 12h.

Schweiggert *et al.*, (2009) encontraron que la aplicación de enzimas a bajas temperaturas (4–12°C) se requiere de 3 días de incubación para reducir 50% la viscosidad del jugo de pitahaya *Hylocereus* con retención de betalaínas del 80%.

La cinética de incubación hizo posible definir que con 3h se obtiene la mayor cantidad de fenoles totales y valores de capacidad antioxidante sin pérdida significativa de pigmentos. Por lo cual se determinó que, para maximizar la extracción de pigmentos, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, la pulpa de pitaya roja *S. stellatus* debe ser tratada previamente con ultrasonido por 15min y pectinasa al 0.5% p·p⁻¹.

6.11 Optimización de la extracción de compuestos bioactivos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Se evaluó mediante un diseño central compuesto de superficie de respuesta, el efecto de (A) la relación pulpa- disolvente (g·mL⁻¹) y (B) el etanol (%) sobre los parámetros de color: luminosidad (L*), a*, b*, tono (Angulo Hue) y saturación de color (Croma) (Cuadro 24); la extracción de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalaínas totales (BT) (Cuadro 25); el tiempo de vida media (t_{1/2}) y la retención (%) de Bc, Bx y BT (Cuadro 27); además de la extracción y retención de los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante (Cuadro 28).

Las superficies de respuesta ilustran el efecto de los factores sobre algunas de las variables evaluadas (Figuras 31, 32 y 33).

Los modelos matemáticos (Cuadros 26, 28, y 30) presentaron valores de determinación (R^2) entre 0.7049–0.9533 y describen el comportamiento de las variables de respuesta en términos codificados de los factores significativos ($p \leq 0.05$).

6.11.1 Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en el color de los extractos.

Al comparar los parámetros de color en los extractos obtenidos, se observaron diferencias ($p \leq 0.05$) dependiendo de las condiciones de extracción (Cuadro 24).

La luminosidad (L^*) fue mayor en los extractos obtenidos con menor relación pulpa–disolvente y no se observó relación con el porcentaje de etanol utilizado. Se observó un ligero efecto de las condiciones de extracción en el valor de a^* con variaciones entre 43.52–57.30 sin embargo, los valores obtenidos corresponden a rojo en todos los casos.

Cuadro 24. Color de los extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.

A (g/mL)	B (%)	Luminosidad (L^*)	a^*	b^*	Angulo Hue (H^*)	Croma (C^*)
0.16	15	25.16 ± 1.05 ^B	57.30 ± 3.90 ^A	40.35 ± 3.29 ^A	35.14 ± 0.44 ^A	67.18 ± 1.07 ^A
0.83	15	13.85 ± 0.06 ^E	43.81 ± 0.50 ^B	22.98 ± 0.57 ^F	27.68 ± 0.31 ^C	49.47 ± 0.71 ^E
0.16	85	24.08 ± 2.24 ^B	53.38 ± 1.90 ^A	34.88 ± 0.42 ^B	33.17 ± 0.90 ^A	63.77 ± 1.67 ^B
0.83	85	12.55 ± 0.13 ^E	43.52 ± 0.48 ^B	20.45 ± 0.31 ^G	26.22 ± 0.25 ^C	46.28 ± 0.30 ^F
0.03	50	40.74 ± 3.10 ^A	48.07 ± 3.28 ^A	19.74 ± 0.91 ^G	22.81 ± 0.48 ^D	51.09 ± 3.32 ^E
0.96	50	13.72 ± 0.89 ^E	45.84 ± 3.58 ^A	22.92 ± 1.30 ^F	27.44 ± 0.76 ^C	50.58 ± 0.59 ^E
0.5	0.5	18.76 ± 0.13 ^C	51.63 ± 4.54 ^A	31.49 ± 0.34 ^C	33.67 ± 1.75 ^A	58.33 ± 1.55 ^C
0.5	99.5	16.09 ± 0.76 ^D	47.13 ± 2.92 ^A	25.75 ± 1.48 ^E	30.94 ± 1.24 ^B	52.29 ± 1.70 ^D
0.5	50	16.39 ± 0.53 ^D	49.40 ± 3.17 ^A	28.45 ± 0.95 ^D	31.83 ± 1.29 ^B	58.19 ± 4.31 ^D

A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol. Los valores son la media de tres determinaciones ± DE. Diferentes superíndices significan diferencias entre extractos.

En relación a los valores de b^* todos corresponden a color amarillo, confirmado que el color de la pulpa de pitaya roja *S. stellatus* es resultado de la mezcla rojo-amarillo (Cuadro 24). Los valores del ángulo Hue (Cuadro 24); corresponden a tonalidades rojas en todos los casos con ligeras variaciones. Los valores más altos de a^* , b^* , tono (H^*) y saturación de color (C^*) se obtuvieron en los extractos en los que se usó una relación sólido–disolvente de $0.16\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 15% de etanol (Cuadro 24).

6.11.2 Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en la extracción de betalaínas.

La mayor extracción de betalaínas se logró con una relación sólido-disolvente de $0.16\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 15% de etanol (Cuadro 25).

Estos datos coinciden con los valores más altos en los parámetros de color de los extractos (Cuadro 24) con lo cual se comprueba que el color de los extractos de pitaya está relacionado con la cantidad de betalaínas presentes en el extracto.

Cuadro 25. Contenido de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx) y betalaínas totales (BT) en extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.

A ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	B (%)	Bc ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$)	Bx ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$)	TB ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}_{\text{PS}}$)
0.16	15	184.38 ± 2.16	164.94 ± 0.52	352.18 ± 0.17
0.83	15	165.54 ± 4.15	142.60 ± 3.25	313.69 ± 2.83
0.16	85	159.78 ± 1.75	155.88 ± 1.91	315.66 ± 3.66
0.83	85	181.47 ± 1.99	160.99 ± 1.76	342.45 ± 3.74
0.03	50	157.80 ± 3.30	164.91 ± 1.54	323.97 ± 0.95
0.96	50	178.34 ± 1.16	155.42 ± 1.66	338.47 ± 1.30
0.5	0.5	160.13 ± 1.64	143.60 ± 0.61	305.07 ± 0.81
0.5	99.5	171.19 ± 1.48	155.65 ± 0.52	324.55 ± 1.17
0.5	50	177.84 ± 2.22	153.21 ± 4.22	331.37 ± 7.96

A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol. Los valores son la media de tres determinaciones \pm DE. Los resultados se reportan en peso seco (PS).

En las superficies de respuesta (Figura 31) se observó que, la extracción de Bc y Bx tienen comportamientos diferentes.

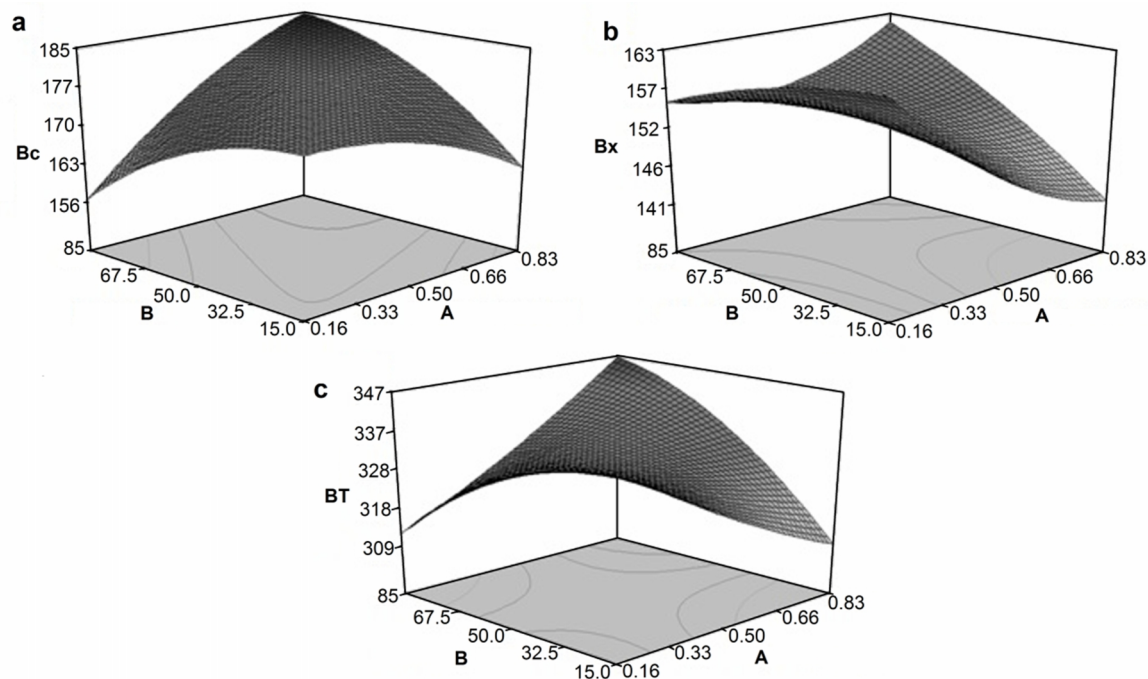


Figura 31. Superficie de respuesta para Bc (a), Bx (b) y BT (c) de los extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* en función de la relación pulpa-disolvente (A) y el porcentaje de etanol (B).

Los resultados del análisis estadístico, permitieron definir que la extracción de betalaínas (Bc, Bx y BT) es afectada ($p \leq 0.05$) por la interacción (AB) entre la relación pulpa-disolvente (A) y el porcentaje de etanol (B); el efecto de la interacción es mayor que para cada factor por separado (Cuadro 26).

Cuadro 26. Modelos matemáticos del DCC en términos codificados de los factores significativos para la optimización del proceso de extracción de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx) y betalaínas totales (BT) en extractos de pulpa de pitaya *S. stellatus*.

Figura	Respuesta	Ecuación en términos codificados	Modelo	R ²
31a	Bc	$Bc = 177.84 + 3.99A + 10.13AB - 4.61B^2$	Q	0.7049
31b	Bx	$Bx = 153.21 - 3.83A + 3.30B + 6.86AB + 3.78A^2$	Q	0.9085
31c	BT	$BT = 331.37 + 16.32AB - 6.28B^2$	Q	0.7303

A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol, Q: Cuadrático.

Prakash y Manikandan, (2012), optimizaron la extracción acuosa de pigmentos de tuna, encontrando que las condiciones óptimas de extracción, fueron 40°C, 115min y 1.44g de muestra; se observa que la temperatura óptima es igual a la utilizada en este estudio.

6.11.3 Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en el tiempo de vida media y retención de las betalaínas.

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de Bc y BT fue mayor con una relación sólido-disolvente de $0.96\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 50% de etanol y para Bx con $0.83\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 85% de etanol. La máxima retención se observó con $0.96\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 50% de etanol para Bc, $0.5\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 99.5% de etanol en Bx y BT (Cuadro 27).

Cuadro 27. Tiempo de vida media y porcentaje de retención de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx) y betalaínas totales (BT) en extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.

A ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	B (%)	Bc $t_{1/2}$ (h)	Retención Bc (%)	Bx $t_{1/2}$ (h)	Retención Bx (%)	BT $t_{1/2}$ (h)	Retención BT (%)
0.16	15	2.25 ± 0.10	19.19 ± 0.75	5.27 ± 0.01	47.61 ± 1.86	3.36 ± 0.03	32.49 ± 2.40
0.83	15	3.50 ± 0.09	36.82 ± 1.37	5.41 ± 0.09	50.58 ± 1.29	4.53 ± 0.11	43.74 ± 2.15
0.16	85	1.69 ± 0.10	12.86 ± 0.82	9.55 ± 0.50	67.36 ± 2.39	3.46 ± 0.22	40.64 ± 1.14
0.83	85	3.65 ± 0.14	37.60 ± 1.18	10.94 ± 0.63	69.19 ± 0.76	5.71 ± 0.02	52.28 ± 2.00
0.03	50	1.16 ± 0.02	6.45 ± 0.72	5.24 ± 0.07	47.63 ± 0.27	2.79 ± 0.01	25.07 ± 0.41
0.96	50	4.53 ± 0.42	38.34 ± 1.42	7.89 ± 0.05	61.71 ± 1.32	5.79 ± 0.27	50.29 ± 1.39
0.5	0.5	2.73 ± 0.04	28.28 ± 0.58	3.66 ± 0.27	39.04 ± 0.73	3.18 ± 0.05	32.61 ± 1.84
0.5	99.5	3.30 ± 0.05	34.48 ± 2.10	9.00 ± 0.06	80.13 ± 0.72	4.09 ± 0.21	52.35 ± 0.59
0.5	50	2.60 ± 0.27	26.62 ± 3.56	7.06 ± 0.66	58.82 ± 1.28	4.14 ± 0.53	41.88 ± 3.02

A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol. Los valores son la media de tres determinaciones \pm DE.

Tanto la retención, como el tiempo de vida media de las betalaínas, tienen relación con la estabilidad de los pigmentos; sin embargo, se encontraron diferentes efectos de los factores evaluados para Bc y Bx.

Los resultados muestran que la estabilidad de Bc fue afectada por la relación pulpa-disolvente y la estabilidad de Bx por el porcentaje de etanol en la mezcla de extracción, con efectos contrarios en estas variables (Figura 32).

Es interesante notar que la relación pulpa-disolvente y el etanol (%) tienen efectos contrarios en la estabilidad de Bc y Bx, por lo cual no fue posible maximizar bajo las mismas condiciones de extracción el $t_{1/2}$ y/o la retención de Bc y Bx.

Los modelos matemáticos demostraron (Cuadro 28) que la retención y $t_{1/2}$ de las Bc y BT fueron afectadas ($p \leq 0.05$) por la relación pulpa-disolvente (A) mientras que el porcentaje de etanol (B) presentó efecto ($p \leq 0.05$) sobre la retención y $t_{1/2}$ de Bx.

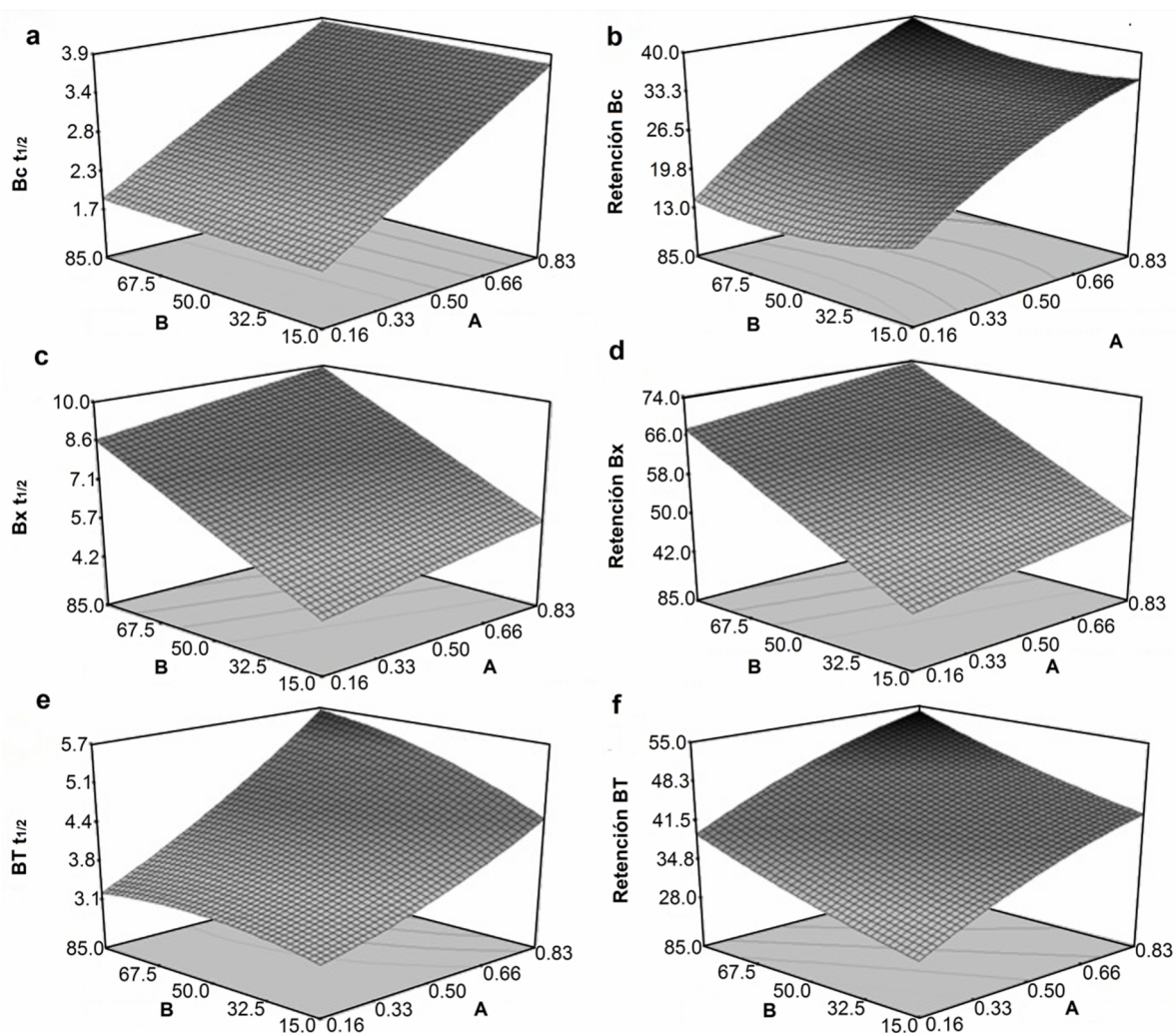


Figura 32. Superficie de respuesta para Bc $t_{1/2}$ (a), retención Bc (b), Bx $t_{1/2}$ (c), retención Bx (d), BT $t_{1/2}$ (e), retención BT (f) de los extractos de pitaya roja *S. stellatus* en función de la relación pulpa-disolvente (A) y el porcentaje de etanol (B).

El hecho de que a mayor relación pulpa-disolvente aumente el tiempo de vida media y la retención de Bc y BT, demuestra que los efectos de matriz son

importantes y que encapsular el jugo de pitaya roja *S. stellatus* puede ser una buena opción para obtener una mayor estabilidad.

Cuadro 28. Modelos matemáticos del diseño central compuesto en términos codificados de los factores significativos para Bc $t_{1/2}$, Bx $t_{1/2}$ y BT $t_{1/2}$ así como la retención de Bc, Bx y BT en extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Figura	Respuesta	Ecuación en términos codificados	Modelo	R ²
32a	Bc $t_{1/2}$	Bc $t_{1/2}$ = 2.81 + 1.00A	L	0.8857
32b	Ret. Bc	Retención Bc = 26.62 + 10.93A + 1.78AB – 2.18A ²	Q	0.9533
32c	Bx $t_{1/2}$	Bx $t_{1/2}$ = 7.11 + 0.66A + 2.17B	L	0.8655
32d	Ret. Bx	Retención Bx = 58.21 + 3.09A + 12.32B	L	0.9025
32e	BT $t_{1/2}$	BT $t_{1/2}$ = 4.11 + 0.96A + 0.32B + 0.27AB	Q	0.9211
32f	Ret. BT	Retención BT = 41.88 + 7.32A + 5.58B	Q	0.9063

A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol, L: lineal, Q: cuadrático.

6.11.4 Efecto de la relación pulpa-disolvente y el porcentaje de etanol en la extracción de fenoles, capacidad antioxidante y su retención.

La mayor cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT) se obtiene con 85% de etanol y su máxima retención con 50% de etanol, en ambos casos con una relación pulpa-disolvente de 0.16g·mL⁻¹ (Cuadro 29).

Cuadro 29. Contenido y porcentaje de retención de CFT y CA en extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* evaluados durante la optimización de la extracción mediante diseño central compuesto de superficie de respuesta.

A (g·mL ⁻¹)	B (%)	CFT (mg EAG · 100g ⁻¹ PS)	Retención CFT (%)	CA (μmoles ET·g ⁻¹ PS)	Retención CA (%)
0.16	15	1835.53 ± 31.48	86.05 ± 0.83	177.96 ± 3.83	86.99 ± 0.18
0.83	15	1490.06 ± 0.10	83.73 ± 0.17	124.02 ± 3.02	54.43 ± 0.56
0.16	85	3505.80 ± 70.32	80.52 ± 0.95	223.85 ± 1.36	95.93 ± 4.68
0.83	85	1994.93 ± 56.43	78.95 ± 2.23	147.56 ± 1.06	89.21 ± 1.03
0.03	50	1885.85 ± 4.03	87.19 ± 1.36	136.20 ± 3.54	97.98 ± 1.96
0.96	50	1466.91 ± 34.60	94.76 ± 0.40	121.69 ± 1.77	97.56 ± 1.23
0.5	0.5	1546.11 ± 27.99	48.38 ± 0.40	146.34 ± 1.83	46.69 ± 0.46
0.5	99.5	2617.16 ± 20.61	65.52 ± 0.74	145.67 ± 1.83	93.68 ± 1.95
0.5	50	1827.44 ± 44.99	86.38 ± 4.09	173.46 ± 4.59	88.20 ± 0.18

A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol. Los valores son la media de tres determinaciones ± DE. Los resultados se reportan en peso seco (ps).

Los valores más altos de capacidad antioxidante (CA) se obtuvieron con una relación pulpa-disolvente de $0.16 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 85% de etanol al igual que los CFT. Respecto a la retención de CA ésta fue mayor al utilizar 50% de etanol y una relación sólido-disolvente de 0.03 o $0.96 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cuadro 29).

Aguirre *et al.*, (2013) optimizaron la extracción de fenoles en la piel de tuna encontrando que la máxima extracción de fenoles se obtiene con 93°C , 35% de etanol y 4h de extracción; pero con mayor temperatura disminuye la CA.

El efecto de los factores evaluados en los compuestos fenólicos totales (CFT) y su retención presentaron diferentes superficies de respuesta (Figura 33a y 33b), se observó un importante efecto de la concentración de etanol utilizado en ambos casos.

Respecto a la capacidad antioxidante (CA) del extracto y su retención, ambas se incrementan al aumentar la proporción de etanol y al disminuir la relación pulpa-disolvente (Figura 33c y 33d). Y mostró tanto en CA como en CFT, relación directa (Cuadro 30).

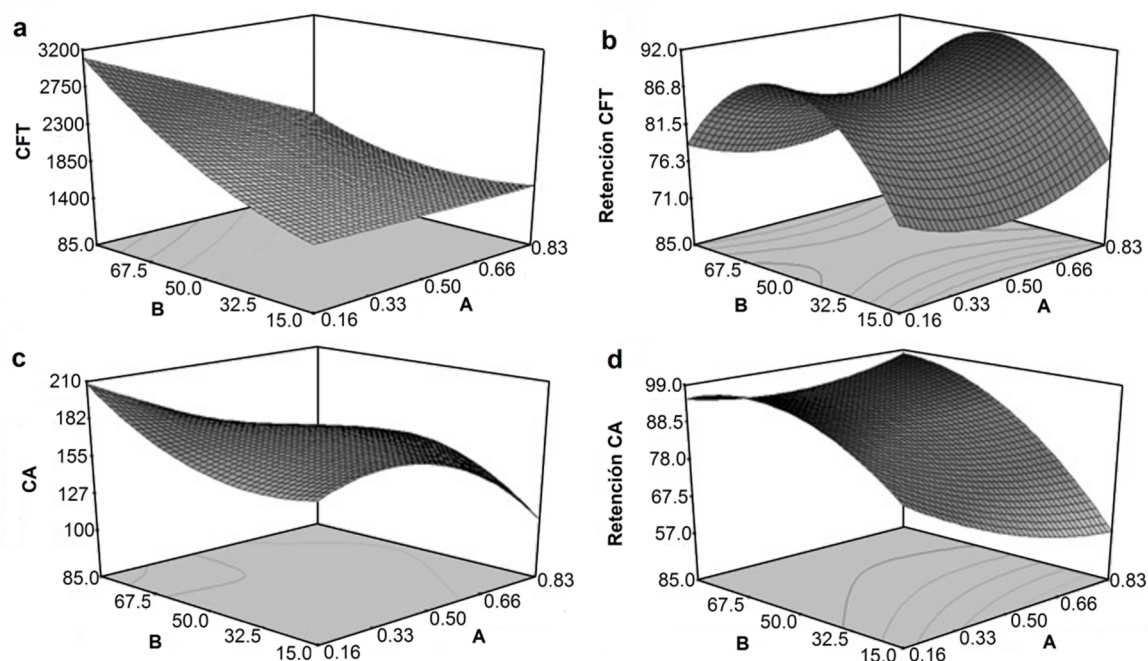


Figura 33. Superficie de respuesta para CFT (a), CA (c), retención de CFT (b) y retención de CA (d) de los extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* en función de la relación pulpa-disolvente (A) y el porcentaje de etanol (B).

En piel de tuna, se determinó que las condiciones óptimas para obtener una adecuada extracción de fenoles con buena CA fue 45% de etanol, 80°C y 2h de extracción (Aguirre *et al.*, 2013).

Las condiciones para la máxima retención de CFT y CA (0.96g·mL⁻¹, 50% etanol) coinciden con las de mayor tiempo de vida media de Bc y BT.

Cuadro 30. Modelos matemáticos del diseño central compuesto en términos codificados de los factores significativos para CFT, CA, retención de CFT y retención de CA en extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Figura	Respuesta	Ecuación en términos codificados	Modelo	R ²
33a	CFT	$CFT = 1827.44 - 306.10A + 461.23B + 208.99B^2 - 291.35AB + 208.99B^2$	Q	0.8630
33b	Ret. CFT	$Retención\ CFT = 86.38 + 4.39A^2 - 12.63B^2$	Q	0.7886
33c	CA	$CA = 173.46 - 14.54A^2 + 17.59A^2B - 27.43AB^2$	C	0.7609
33d	Ret. CA	$Retención\ CA = 88.20 - 4.98A + 13.77B + 6.46AB + 4.20A^2 - 9.59B^2$	Q	0.9040

A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol, Q: cuadrático, C: cubico.

6.11.5 Selección de condiciones óptimas y validación de la optimización.

Las condiciones óptimas de extracción se obtuvieron mediante el programa Design Expert 6.0, utilizando como criterios para la optimización, la máxima extracción de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalaínas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA).

Como resultado se obtuvieron tres condiciones para la extracción, además de los resultados teóricos para las diferentes variables de respuesta. En el Cuadro 31 se muestran los resultados teóricos y experimentales para cada variable, así como la variación (%).

Se seleccionaron 0.46g·mL⁻¹ y 85% de etanol como condiciones óptimas para la extracción de los compuestos bioactivos presentes en la pulpa de pitaya roja *S. stellatus*. La cantidad de BT obtenidas fueron 17% mayores a lo reportado en la caracterización de estas pitayas (Pérez-Loredo *et al.*, 2016).

Cuadro 31. Valores teóricos y experimentales para validar la optimización del proceso de extracción de Bc, Bx, BT, CFT y CA de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Variables de respuesta	Condiciones		1	2	3
	A (g·mL ⁻¹)	B (%)	0.19	0.83	0.46
			37.12	84.98	85
Resultados					
Bc (PS) mg·100g ⁻¹	Teórico		181.09	178.49	170.9
	Experimental		169.80 ± 5.97	187.13 ± 7.73	181.73 ± 6.09
	Variación (%)		6.24	-4.84	-6.34
Bx (PS) mg·100g ⁻¹	Teórico		160.50	161.82	154.91
	Experimental		156.80 ± 4.20	161.08 ± 2.03	165.87 ± 2.70
	Variación (%)		2.30	0.46	-7.08
BT (PS) mg·100g ⁻¹	Teórico		345.00	338.44	322.95
	Experimental		326.60 ± 10.14	348.21 ± 10.06	347.61 ± 8.52
	Variación (%)		5.33	-2.89	-7.63
CFT (PS) mg EAG·100g ⁻¹	Teórico		1983.87	1830.97	2619.44
	Experimental		1819.13 ± 89.88	1804.97 ± 68.72	2350.08 ± 80.73
	Variación (%)		8.30	1.42	10.28
CA (PS) μmoles ET·g ⁻¹	Teórico		181.22	132.41	187.18
	Experimental		158.98 ± 4.04	139.24 ± 9.87	193.74 ± 7.38
	Variación (%)		12.27	-5.16	-3.50

Media ± DS, n = 3. PS: peso seco. A: relación pulpa-disolvente, B: porcentaje de etanol. El signo negativo del porcentaje de variación significa que el valor experimental es mayor al teórico.

Schweiggert *et al.*, (2009), desarrollaron y optimizaron un tratamiento enzimático a baja temperatura para obtener los pigmentos de la pitaya púrpura de *Hylocereus* sp, encontrando que las condiciones óptimas de extracción de los pigmentos fueron 7.9 °C, 3 días de reacción, concentración de ácido ascórbico 0.92 % y dosificación de enzima de 1.0 % p/p, aunque hay una pérdida del 20% de las betalaínas totales.

Bajo las condiciones óptimas de extracción Prakash y Manikandan (2012) obtuvieron 3.43 y 24.29 mg/100 g de Bc y Bx de tuna; mientras que en este trabajo se extrajeron de pitaya roja (*S. stellatus*) 52 y 6.82 veces más Bc y Bx (Cuadro 30). Por otro lado, el tiempo de vida media de los pigmentos a 60 °C fue de 2.59, 11.43 y 4.77 h para Bc, Bx y BT respectivamente y la retención de fenoles fue del 75 %.

6.12 Determinación de la estabilidad del extracto.

Como parte de la caracterización de los extractos se evaluó la estabilidad de los compuestos bioactivos obtenidos de la pitaya roja *S. stellatus* a diferentes pH's y temperaturas.

6.12.1 Efecto del pH sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

6.12.1.1 Efecto del pH sobre el color.

La medición inicial de color (Cuadro 32), mostró diferencias entre los extractos obtenidos ($p \leq 0.05$) sin embargo, no fue posible determinar si fue el cambio de pH el responsable de las diferencias ya que no se observó una tendencia del efecto del pH sobre el color de los extractos.

Cuadro 32. Color de extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos con diferentes condiciones de pH.

pH	L*	a*	b*	Hue (°)	Croma
2.90	23.67 ± 1.48 ^A	53.62 ± 3.68 ^A	36.56 ± 2.34 ^A	34.39 ± 1.85 ^A	68.21 ± 3.05 ^A
3.48	19.01 ± 0.26 ^C	49.70 ± 0.41 ^C	31.40 ± 0.50 ^B	32.17 ± 0.04 ^B	58.44 ± 0.19 ^C
3.97	20.96 ± 1.15 ^A	52.09 ± 1.86 ^A	34.26 ± 2.60 ^A	33.30 ± 1.06 ^A	62.36 ± 2.98 ^B
4.55	22.36 ± 2.00 ^A	54.21 ± 3.80 ^A	37.11 ± 3.70 ^A	34.81 ± 1.08 ^A	67.51 ± 4.84 ^A
5.12	22.60 ± 2.23 ^A	54.94 ± 3.15 ^A	37.72 ± 3.64 ^A	34.42 ± 1.10 ^A	66.65 ± 4.65 ^A
6.38	22.54 ± 1.39 ^A	54.65 ± 2.02 ^A	37.60 ± 2.44 ^A	34.95 ± 0.16 ^A	66.34 ± 3.04 ^A
6.97	16.06 ± 0.89 ^D	46.27 ± 1.83 ^D	26.97 ± 2.28 ^C	30.20 ± 1.10 ^C	53.57 ± 2.73 ^D
7.10	19.65 ± 0.21 ^B	51.69 ± 0.13 ^B	33.30 ± 0.21 ^A	32.79 ± 0.22 ^A	61.49 ± 0.08 ^B

Los valores son la media de tres determinaciones ± DE. Diferentes superíndices significan diferencias entre los extractos

Al analizar los valores del ángulo Hue, se observó que en todos los casos corresponde a color rojo; en contraste con las antocianinas más comunes, las betalaínas de la pitaya no presentaron cambios de color evidentes en el intervalo de pH de 2.9 a 7.1 (Cuadro 32).

Se ha reportado que las betalaínas cambian su color a amarillo debido a la liberación del ácido betalámico producido por la hidrólisis alcalina de la betanina a pH de 11 (Socaciu, 2008; Stintzing y Carle, 2004; Gandía-Herrero *et al.*, 2012).

6.12.1.2 Efecto del pH sobre la retención de betalaínas (Bc, Bx y BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) de los extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Se observó menor retención de Bc con respecto a Bx a pH mayores a 6; la mayor retención de Bc fue a pH de 4.5 y para Bx a 5.1. Las Bc y BT presentaron un comportamiento similar a una campana de Gauss (Figura 34), igual a lo reportado para la betanina del betabel (Jiménez-Aparicio *et al.*, 1997).

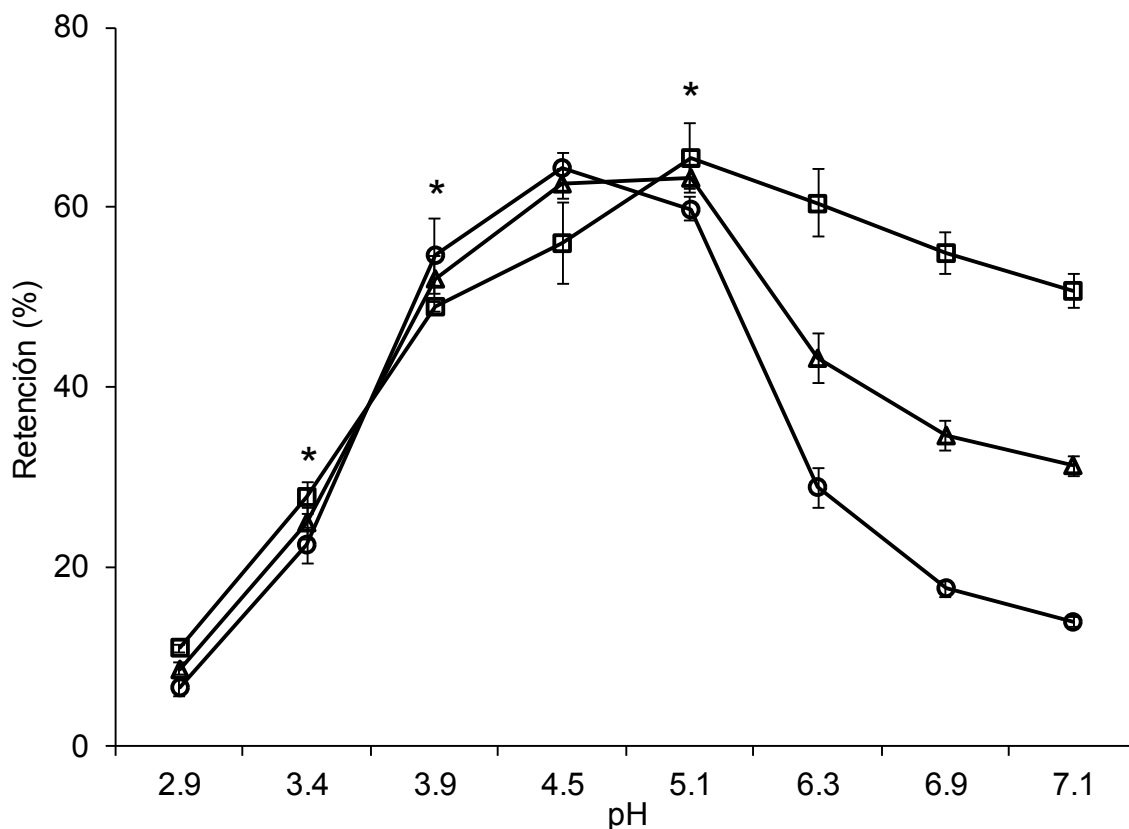


Figura 34. Retención de Bc (o), Bx (□) y BT (Δ) de extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos a diferentes condiciones de pH. El * indica que no hay diferencia significativa en la retención ($p > 0.05$). Condiciones de tratamiento incubación por 5h a 60°C, agitación a 150rpm y ausencia de luz.

Fue evidente una mayor retención de las Bx a pH por encima de 5.1, diferentes autores han reportado que los procesos de degradación de betalaínas producen ácido betalámico (Cai *et al.*, 2003), compuesto común en todas las betalaínas, de color amarillo que puede contribuir con los valores de Bx obtenidos bajo las condiciones evaluadas en este estudio. Por lo cual se puede decir que como

resultado de la pérdida de Bc se incrementa en valor de Bx debido a la presencia de ácido betalámico. Aunque la tendencia en la retención de las betalaínas es similar, los resultados estadísticos mostraron que hay diferencias ($p \leq 0.05$) en los valores de pH evaluados, excepto a 3.4, 3.9 y 5.1 donde la retención de pigmentos no presentó diferencia ($p > 0.05$).

Se considera que las betalaínas en general son mas estables en un rango de pH de 3 a 7; en este caso presentaron mayor estabilidad entre 3.9 – 5.1 confirmando que la óptima retención de pigmentos se presentará a valores de pH cercanos al de la matriz vegetal de la cual se obtienen (Socaciu, 2008), además de protegidas de oxígeno, luz y almacenados en refrigeración. Debido a estas propiedades, las betalaínas se utilizan en productos lacteos, rellenos de frutas para panadería, condimentos, productos instantáneos, sustitutos de carne y salchichas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

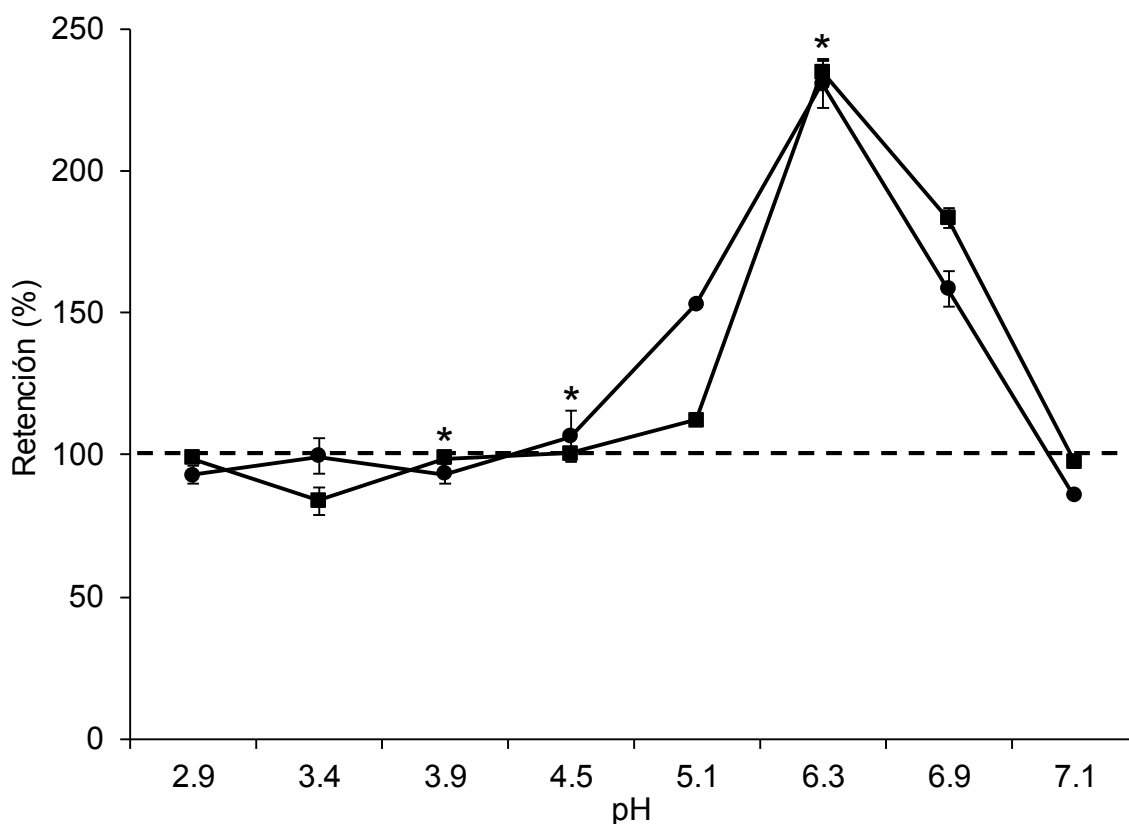


Figura 35. Retención de CFT (■) y CA (●) de extractos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos a diferentes condiciones de pH. El * indica que no hay diferencia significativa en la retención ($p > 0.05$). Condiciones de tratamiento 5h, 60°C, agitación a 150rpm, ausencia de luz.

En cuanto a los resultados de CFT y CA se observó un comportamiento similar en ambas variables, la disminución de la retención fue mínima.

Se encontró la menor retención a pH de 3.4, mientras que a valores de pH entre 5–6.9 se obtuvieron valores finales más altos. Al poner atención a la línea punteada que indica el 100% de retención, fue muy evidente que incrementó el contenido de CFT y la CA en ciertos valores de pH (Figura 35).

Además, los resultados estadísticos mostraron que hay diferencia ($p \leq 0.05$) en la retención de CFT y CA en las condiciones de pH evaluadas, excepto a 3.9, 4.5 y 6.3 donde no se presentó diferencia ($p > 0.05$).

Estos resultados pueden estar relacionados con el proceso de hidrólisis de las Bc, durante el cual se puede liberar algún compuesto con actividad antioxidante. Cai *et al.*, (2003) encontraron que la capacidad antioxidante de las betalainas depende de su estructura y las betacianinas con mayor grado de glicosilación tienen menor capacidad antioxidante. Por lo cual se puede suponer que las Bc de la pitaya pierden sustituyentes (azúcares) y se presenta una mayor CA final.

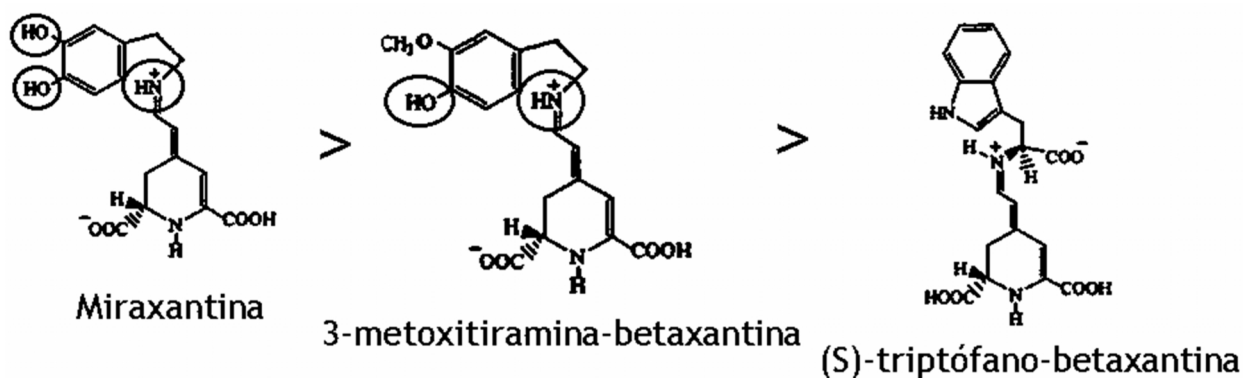


Figura 36. Betaxantinas con diferente capacidad antioxidante.

El incremento obtenido en la capacidad antioxidante puede también estar relacionado con el tipo de compuestos presentes, la Figura 36 ilustra tres betaxantinas ordenadas de izquierda a derecha de mayor a menor CA, debido a la cantidad de grupos químicos con propiedades antioxidantes presentes (Cai *et al.*, 2003).

6.12.1.3 Efecto del pH en los parámetros cinéticos de las betalainas de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Se analizaron los resultados obtenidos durante el estudio de degradación y se determinó que ajustaron a un modelo cinético de primer orden después de aplicar las ecuaciones descritas en la sección 5.10.

Cuadro 33. Coeficientes de la ecuación lineal y constantes de degradación de las betalainas de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a diferentes pH.

	pH	Ln (C) = -kt + ln(Co)		k (h ⁻¹)
		R ²	Ln (Co)	
Betacianinas	2.9	0.822 ± 0.019	4.33 ± 0.08	0.5699 ± 0.007
	3.5	0.955 ± 0.004	4.76 ± 0.04	0.3089 ± 0.008
	3.9	0.935 ± 0.030	4.59 ± 0.03	0.1058 ± 0.000
	4.5	0.963 ± 0.007	4.56 ± 0.02	0.0997 ± 0.012
	5.1	0.910 ± 0.010	4.51 ± 0.01	0.0889 ± 0.006
	6.4	0.964 ± 0.007	4.46 ± 0.02	0.2448 ± 0.005
	6.9	0.986 ± 0.001	4.47 ± 0.03	0.3511 ± 0.002
	7.1	0.986 ± 0.009	4.48 ± 0.02	0.3981 ± 0.008
Betaxantinas	2.9	0.944 ± 0.005	4.46 ± 0.04	0.4624 ± 0.008
	3.5	0.989 ± 0.002	4.61 ± 0.02	0.2504 ± 0.002
	3.9	0.962 ± 0.019	4.56 ± 0.02	0.1222 ± 0.001
	4.5	0.954 ± 0.022	4.54 ± 0.04	0.1075 ± 0.005
	5.1	0.936 ± 0.039	4.57 ± 0.02	0.0751 ± 0.003
	6.4	0.884 ± 0.029	4.48 ± 0.03	0.0828 ± 0.002
	6.9	0.932 ± 0.011	4.47 ± 0.02	0.1234 ± 0.001
	7.1	0.920 ± 0.019	4.49 ± 0.02	0.1338 ± 0.004
Betalainas totales	2.9	0.896 ± 0.008	4.31 ± 0.18	0.5105 ± 0.007
	3.5	0.975 ± 0.002	4.69 ± 0.03	0.2824 ± 0.006
	3.9	0.974 ± 0.016	4.58 ± 0.02	0.1078 ± 0.000
	4.5	0.962 ± 0.009	4.55 ± 0.03	0.1032 ± 0.009
	5.1	0.928 ± 0.021	4.48 ± 0.10	0.0831 ± 0.004
	6.4	0.902 ± 0.044	4.43 ± 0.05	0.1498 ± 0.004
	6.9	0.958 ± 0.003	4.45 ± 0.01	0.2144 ± 0.001
	7.1	0.956 ± 0.010	4.46 ± 0.02	0.2284 ± 0.004

Media ± la desviación estándar (DE), n = 3.

El Cuadro 33 muestra los parámetros cinéticos obtenidos para betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx) y betalainas totales (BT). Se comprobó que la degradación es

descrita por la cinética de primer orden (Figura 37) de acuerdo con los coeficientes de determinación.

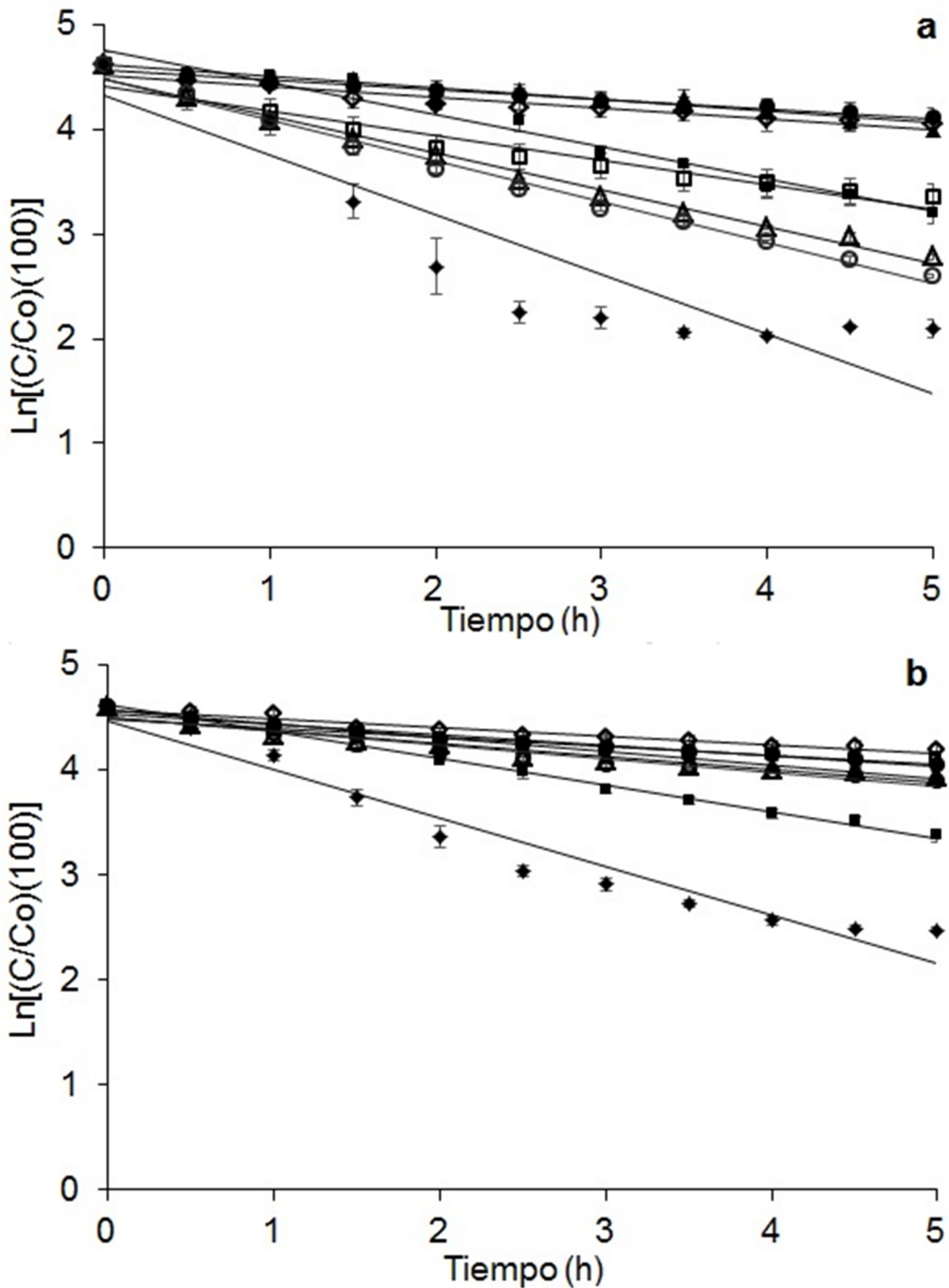


Figura 37. Cinética de primer orden de la degradación de (a) Bc y (b) Bx de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a diferentes valores de pH: 2.9 (◆), 3.4 (■), 3.9 (▲), 4.5 (●), 5.1 (◇), 6.3 (□), 6.9 (△) y 7.1 (○). C: concentración a cada tiempo de incubación, Co: concentración inicial.

La Figura 37 muestra los cambios en la cinética de degradación de las Bc (Figura 37a) y Bx (Figura 37b). Es evidente que a valores de pH bajos las betalaínas se degradan más rápido. Los análisis de regresión lineal dieron como resultado valores del coeficiente de determinación (R^2) entre 0.8220 – 0.9861 por lo cual fue posible determinar el tiempo de vida media de los pigmentos (Figura 38).

A pH de 2.9 se observó una mayor velocidad de degradación (Figura 37, Cuadro 33), es posible asegurar que a $\text{pH} < 2.9$ las betalaínas se degradaron rápidamente a diferencia de muchas antocianinas que son estables a pH debajo de 3. La menor velocidad de degradación se presentó a pH de 5.1, por lo cual este sería la condición óptima para su aplicación en diversas matrices.

Las Bc de la pitaya roja *S. stellatus* presentaron mayor tiempo de vida media a pH entre 4.5–5.1 (Figura 38), se ha reportado diferente estabilidad al pH en Bc obtenidas de diversas fuentes vegetales (Coskuner *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2001; Castellar *et al.*, 2006; Khan y Giridhad, 2014; Mello *et al.*, 2015).

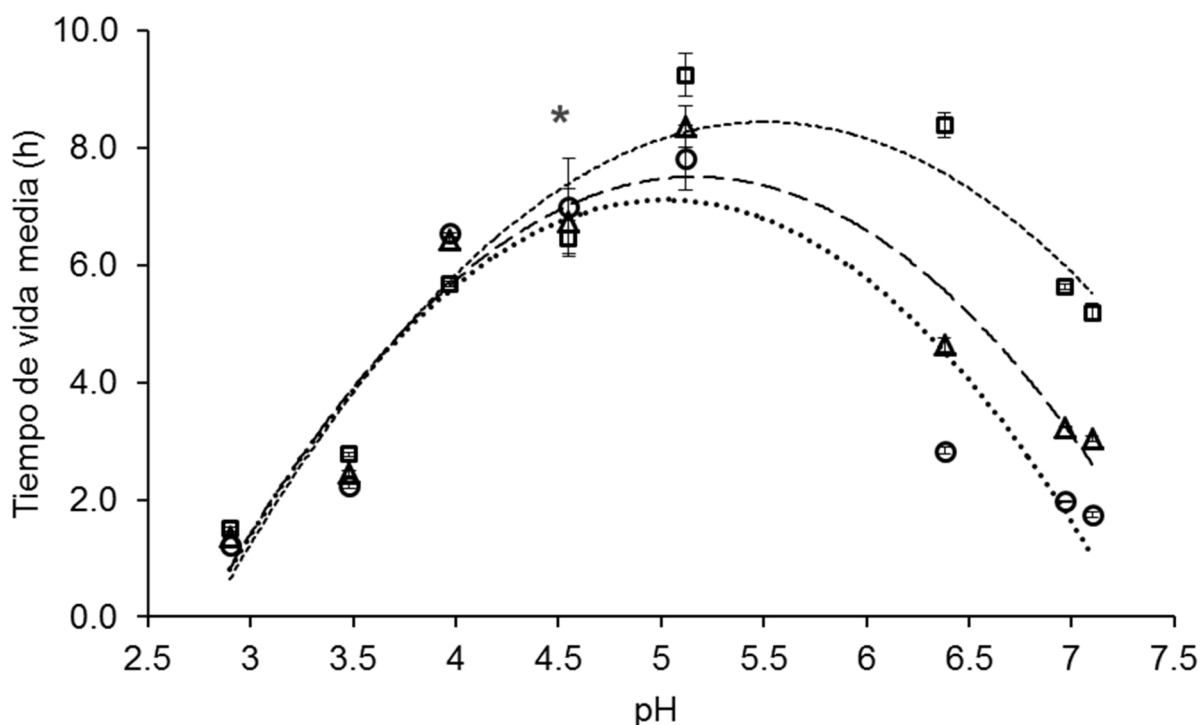


Figura 38. Tiempo de vida media en horas de Bc (o), Bx (□) y BT (Δ) de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a diferentes condiciones de pH. El * indica que no hay diferencia significativa en el tiempo de vida media ($p > 0.05$). Condiciones de tratamiento 5h de incubación, 60°C, con agitación a 150rpm, ausencia de luz.

Las Bx fueron más estables a valores de pH ligeramente más altos entre 5.1–6.5, similar a lo reportado para otras fuentes (Cuadro 34).

Los resultados estadísticos mostraron que hay diferencia ($p \leq 0.05$) en el tiempo de vida media de los pigmentos en las condiciones de pH evaluadas, excepto a 4.5 donde no se presentó diferencia ($p > 0.05$) (Figura 38).

Se considera que las Bc son más resistentes en medios ácidos y las Bx a pH neutro (Socaciu, 2008) lo cual coincide con los resultados obtenidos en la pitaya roja *S. stellatus*. La diferencia en la estabilidad de las betalainas respecto al pH permite que sean aplicables a diferentes matrices alimentarias.

Por otro lado, algunas antocianinas son más estables a pH entre 1–4 (Cuadro 34), presentan colores rojos a pH ácidos (< 2) y a pH arriba de 3, hay cambios en su coloración (Delgado-Vargas *et al.*, 2000), por lo cual las betalainas de pitaya roja *S. stellatus* pueden utilizarse en condiciones a las cuales no sea posible aplicar antocianinas.

Cuadro 34. Condiciones de pH de mayor estabilidad para betalainas y antocianinas de diversas fuentes vegetales.

Fuente	pH	Tipo de pigmento	Referencia
Cactáceas			
<i>Opuntia stricta</i>	3.4	betanina-isobetanina	Castellar <i>et al.</i> , 2006
<i>Hylocereus undatus</i>	3.2 - 7	Betalainas	Mello <i>et al.</i> , 2015
<i>Opuntia ficus-indica</i>	5	Indicaxantina	Coskuner <i>et al.</i> , 2000
Amaranto			
<i>Amaranthus</i>	5 – 7	Betacianinas	Cai <i>et al.</i> , 1998
<i>A. tricolor</i>	5 – 6	Amarantina	Huang y von Elbe, 1986
<i>A. cruentus</i>	5.6	Betacianinas	Cai <i>et al.</i> , 1998
Otras fuentes			
Beta vulgaris	6	Betanina	Jiménez-Aparicio <i>et al.</i> , 1997
<i>Rivina humilis L.</i>	5	Betalainas	Khan y Giridhad 2014
<i>Celosia argentea</i>	5.5	Betaxantinas	Cai <i>et al.</i> , 2001
Antocianinas			
Camote morado	2 – 4	Antocianinas	Fan <i>et al.</i> , 2008
Arroz negro	1	Antocianinas	Hou <i>et al.</i> , 2013

Para realizar el análisis de estabilidad a diferentes temperaturas se seleccionó el pH de 4.5 al cual se presentó la mayor retención de Bc (65 %) (Figura 38).

6.12.2 Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los compuestos bioactivos de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Se evaluó la estabilidad térmica de los compuestos bioactivos de la pitaya roja *S. stellatus*, al realizar las mediciones iniciales de color no se observó diferencia ($p > 0.05$) en los parámetros de color de los extractos presentaron; luminosidad (L^*) de entre 18.7 – 22.03, a^* de 49.7 – 53.9 (corresponde al componente rojo del color), b^* de 31.6 – 36.9 (corresponde al componente amarillo del color), tono (Hue*) de 32.4° – 34.0° y saturación de color (C^*) 59.0 – 65.0.

6.12.2.1 Efecto de la temperatura sobre la retención de betalaínas (Bc, Bx y BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) de pulpa de pitaya *S. stellatus*.

La Figura 39 muestra que la retención de las betalaínas disminuyó conforme se incrementó la temperatura igual a lo observado en betalaínas de tuna, betabel y amaranto (Coskuner *et al.*, 2000; Jiménez-Aparicio *et al.*, 1997; Cai *et al.*, 1998).

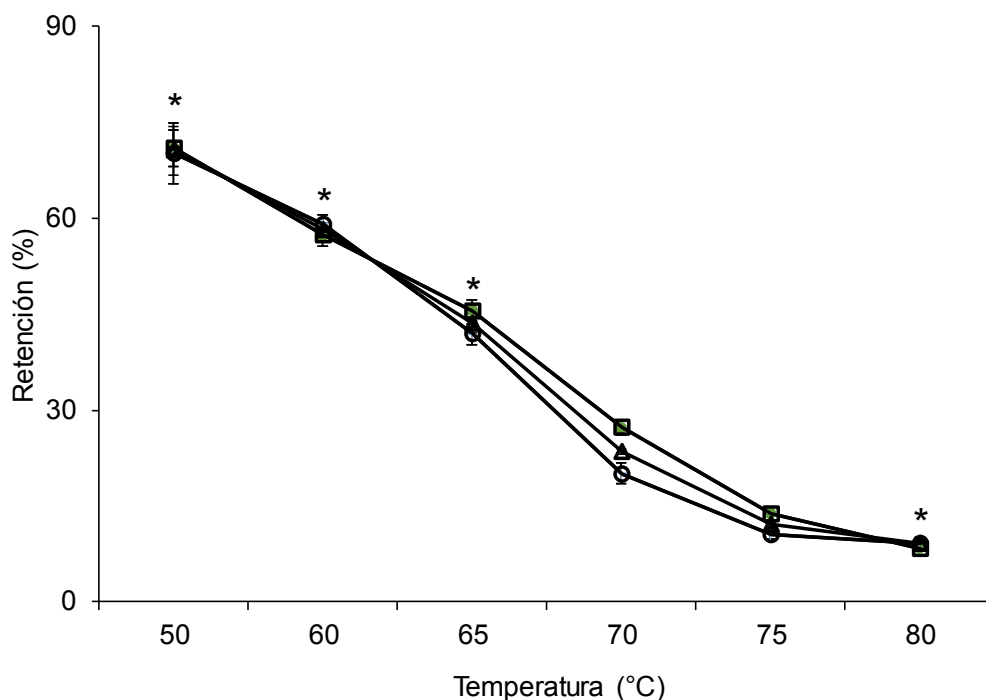


Figura 39. Retención de pigmentos Bc (o), Bx (□) y BT (Δ) de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a diferentes temperaturas. El * indica que no hay diferencia significativa en la retención ($p > 0.05$). Condiciones de tratamiento 5h de incubación, pH 4.7, con agitación a 150rpm, ausencia de luz.

En este estudio a partir de 65°C (Figura 39), la retención de pigmentos fue de menos del 50%. La tendencia en la retención de las betalaínas presentó comportamientos similares; los resultados estadísticos mostraron que hay diferencias ($p \leq 0.05$) solo a 70 y 75°C en el resto de las temperaturas evaluadas la retención de pigmentos no presentó diferencia ($p > 0.05$).

En CFT y CA la retención fue mayor al 100% porque los valores finales fueron mayores en todos los casos; se presentó un comportamiento similar en ambas variables. Además, los resultados estadísticos mostraron que hay diferencia ($p \leq 0.05$) en la retención de CFT y CA en las diferentes temperaturas evaluadas, excepto a 60 y 70°C donde no se presentó diferencia ($p > 0.05$) (Figura 40).

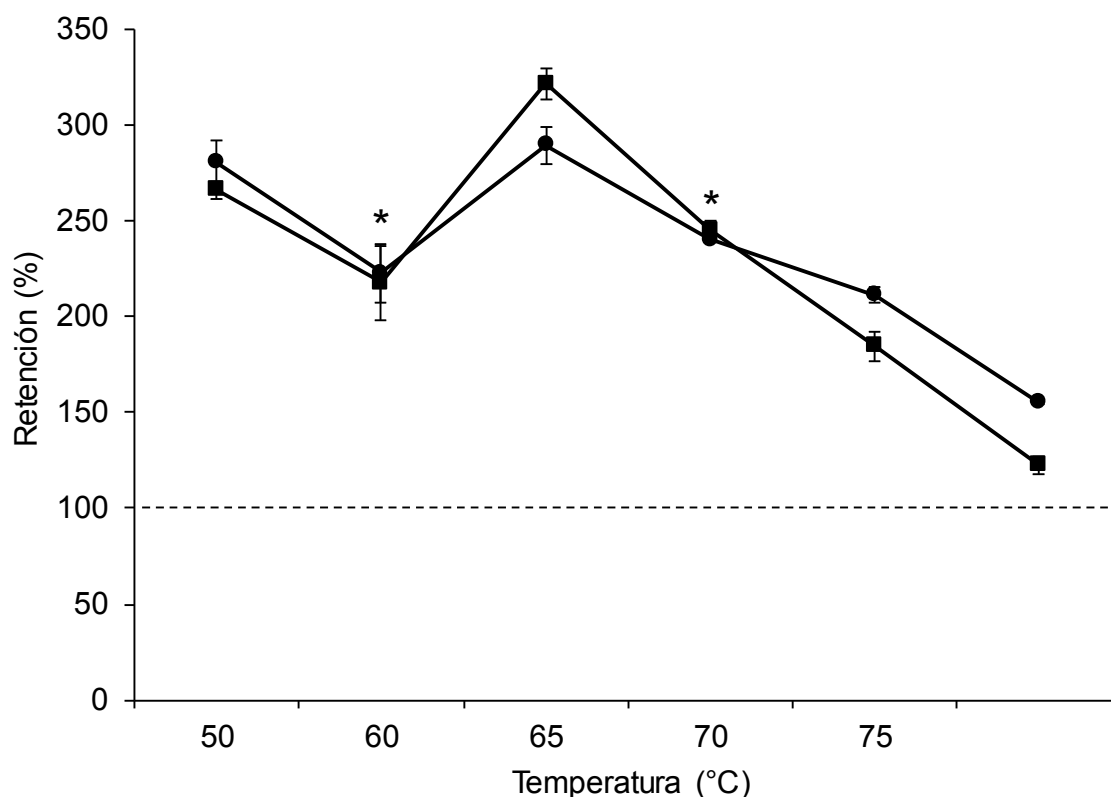


Figura 40. Retención de CFT (■) y CA (●) de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a diferentes temperaturas. El * indica que no hay diferencia significativa en la retención ($p > 0.05$). Condiciones de tratamiento 5h de incubación, pH 4.7, con agitación a 150 rpm, ausencia de luz.

Al evaluar el efecto del pH (Sección 6.12.1.2) se observaron resultados similares. Esto se debe a la estructura de las betalaínas, ya que se sabe que los compuestos aromáticos presentes en Bc y Bx pueden estabilizar radicales libres debido a su

naturaleza (Stintzing y Carle, 2004); los cambios estructurales de las betalaínas incrementan su CA (Cai *et al.*, 2003) y el incremento de temperatura genera reacciones de isomerización, descarboxilación e hidrólisis en las mismas (Stintzing y Carle, 2004).

Se observó que, debido al efecto de la temperatura, a pH de 4.7 incrementó la CA y CFT mientras que, disminuyó el contenido de betalaínas en los extractos de pitaya roja *S. stellatus*.

6.12.2.2 Efecto de la temperatura en los parámetros cinéticos de las betalaínas de pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

El efecto de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos naturales es importante para seleccionar la matriz para la aplicación y las condiciones adecuadas para el procesamiento y almacenamiento del pigmento y/o el producto donde sea aplicado.

Cuadro 35. Coeficientes de la ecuación lineal y constantes de degradación de las betalaínas de la pitaya roja *S. stellatus* a diferentes temperaturas.

	Temperatura (°C)	ln(C) = -kt + ln (Co)		k (h ⁻¹)
		R ²	ln (Co)	
Betacianinas	50	0.909 ± 0.069	4.59 ± 0.02	0.0575 ± 0.001
	60	0.961 ± 0.019	4.59 ± 0.03	0.1039 ± 0.006
	65	0.963 ± 0.020	4.57 ± 0.01	0.1649 ± 0.011
	70	0.972 ± 0.000	4.52 ± 0.01	0.3153 ± 0.014
	75	0.937 ± 0.026	4.44 ± 0.05	0.3687 ± 0.003
	80	0.958 ± 0.015	4.39 ± 0.06	0.4239 ± 0.025
Betaxantinas	50	0.944 ± 0.046	4.60 ± 0.02	0.0595 ± 0.004
	60	0.942 ± 0.013	4.58 ± 0.03	0.1136 ± 0.002
	65	0.969 ± 0.017	4.55 ± 0.00	0.1468 ± 0.008
	70	0.985 ± 0.008	4.54 ± 0.01	0.2619 ± 0.014
	75	0.981 ± 0.006	4.52 ± 0.01	0.3594 ± 0.021
	80	0.971 ± 0.017	4.43 ± 0.03	0.4253 ± 0.024
Betalaínas totales	50	0.924 ± 0.046	4.58 ± 0.01	0.0555 ± 0.004
	60	0.923 ± 0.013	4.59 ± 0.02	0.1126 ± 0.001
	65	0.977 ± 0.014	4.56 ± 0.01	0.1557 ± 0.006
	70	0.980 ± 0.005	4.53 ± 0.01	0.2881 ± 0.014
	75	0.973 ± 0.009	4.50 ± 0.01	0.3938 ± 0.023
	80	0.925 ± 0.061	4.42 ± 0.03	0.4456 ± 0.028

Media ± la desviación estándar (DS), n = 3.

Los resultados obtenidos durante el estudio de degradación a diferentes temperaturas se ajustaron a un modelo cinético de primer orden después de aplicar las ecuaciones descritas en la Sección 5.10 (Figura 41).

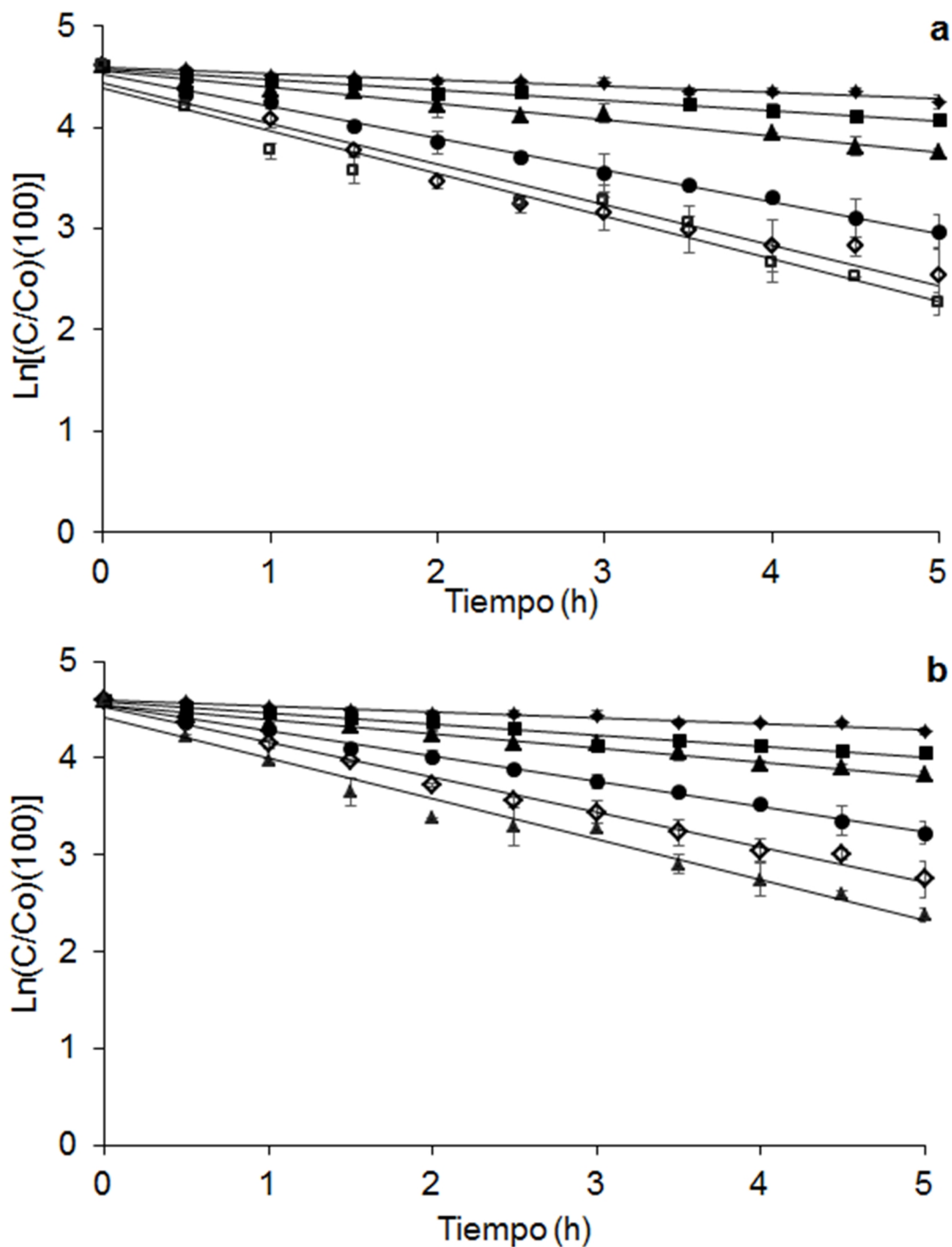


Figura 41. Cinética de primer orden de la degradación de (a) Bc y (b) Bx de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a diferentes temperaturas: 50(♦), 60(■), 65(▲), 70(●), 75(◇) y 80(□) °C. C: concentración a cada tiempo de incubación, Co: concentración inicial.

La Figura 41 muestra los cambios en la cinética de degradación de las Bc (Figura 41a) y Bx (Figura 41b). A mayor temperatura se incrementó el valor de la pendiente, lo cual demostró que a mayor temperatura se acelera el proceso de degradación.

Se obtuvieron diferentes parámetros cinéticos en función de la temperatura para betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx) y betalaínas totales (BT); las constantes de velocidad de reacción fueron de 0.0555–0.4456 h⁻¹ entre 50–80°C (Cuadro 35).

Para betalaínas de amaranto y tuna se reportaron constantes de velocidad de 0.0141–0.3408h⁻¹ entre 40– 80°C (Cai *et al.*, 1998) y 0.372–6.612h⁻¹ entre 50–90°C (Coskuner *et al.*, 2000), en este estudio se observó el incremento de las velocidades de degradación en función de la temperatura. Se observó un incremento de la velocidad de degradación y la disminución del tiempo de vida media a medida que se incrementó la temperatura (Cuadro 35, Figura 42). Los t_{1/2} maximos se obtuvieron a la temperatura mas baja evaluada (50°C).

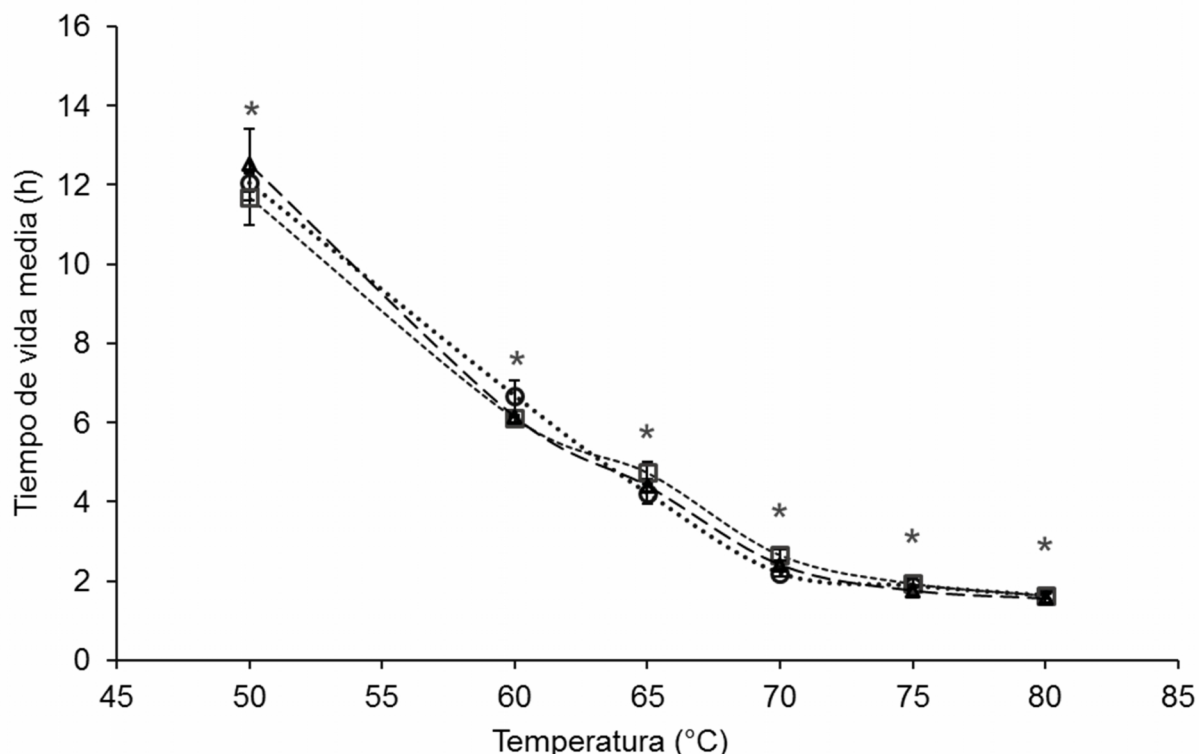


Figura 42. Tiempo de vida media en horas de Bc (o), Bx (□) y BT (Δ) de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a diferentes temperaturas. El * indica que no hay diferencia significativa en el tiempo de vida media ($p > 0.05$). Condiciones de tratamiento 5h de incubación, pH 4.7, con agitación a 150rpm, ausencia de luz.

Se observó que Bc, Bx y BT tienen la misma tendencia (Figura 42), lo cual muestra que el incremento de la temperatura a pH de 4.7 tiene efectos similares en las Bc y Bx de la pitaya roja *S. stellatus*. Cai *et al.*, (1998) reportaron $t_{1/2}$ de 48.95–2.03h para betalainas de amaranto (rojo) y Coskuner *et al.*, (2000) de 1.86–0.15 h para tuna (amarilla).

Los resultados reportados para amaranto y tuna muestran que las Bc del amaranto se degradaron más lentamente que las Bx de la tuna. Sin embargo, en este caso los análisis estadísticos mostraron que no hay diferencia ($p > 0.05$) en el tiempo de vida media de los pigmentos en las condiciones de temperatura evaluadas.

Por otro lado, para conocer la sensibilidad a la temperatura de las betalainas de la pitaya; las constantes de degradación obtenidas a cada temperatura fueron graficadas contra la temperatura y se relacionaron mediante la ecuación de Arrhenius. Para determinar la energía de activación (E_a) se construyó un gráfico con logaritmo natural negativo de la constante de degradación contra el inverso de la temperatura (K) para Bc, Bx y BT (Figura 43); se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de entre 0.9662–0.9842.

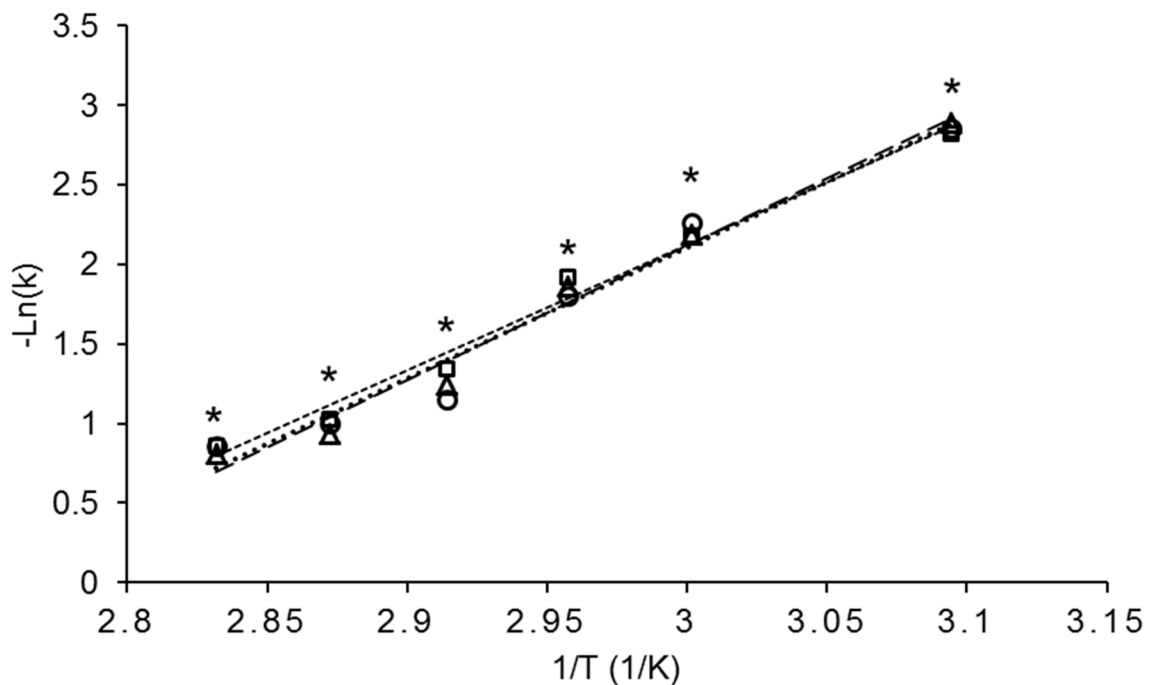


Figura 43. Determinación de la energía de activación de Bc (o), Bx (□) y BT (Δ) de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* a pH de 4.7, entre 50–80 °C. El * indica que no hay diferencia significativa en las constantes de degradación ($p > 0.05$).

Los valores de la E_a a pH de 4.7 y en un intervalo entre 50–80 °C fueron de 68.57, 65.59 y 70.25 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para Bc, Bx y BT respectivamente; estos datos indican que las Bc presentaron una mayor sensibilidad que las Bx a los cambios de temperatura. Los valores de E_a se han reportado entre 32.3–87.09 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para betalainas de diferentes cactáceas (Coskuner *et al.*, 2000; Vaillant *et al.*, 2005; Reynoso *et al.*, 1997). Güneser, (2016) reportó una E_a de 42.44 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para betalainas de betabel aplicadas en leche.

Por otro lado se han reportado E_a de 63.2, 66.3 and 91.2 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para antocianinas de zanahoria negra, acai y mora respectivamente (Zozio *et al.*, 2011), por lo cual las betalainas de la pitaya roja *S. stellatus* son menos termosensibles que las antocianinas de la mora y una sensibilidad similar a las del acai y zanahoria negra.

Los resultados de estabilidad permiten asegurar que las betalaínas de la pitaya son estables a pH 3.97 – 5.12 (ligeramente ácido) con una E_a que coincide con lo reportado para los pigmentos de otras cactáceas.

6.13 Análisis de las betalaínas de la pitaya *S. stellatus*.

6.13.1 Análisis de betalaínas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-DAD).

Como resultado del proceso de limpieza del extracto de pitaya (Sección 5.7.2.1) se obtuvieron fracciones de betalaínas no retenidas (amarillas) y retenida (roja); dichas fracciones fueron analizadas para obtener los cromatogramas correspondientes (Figura 44).

Las fracciones no retenidas 4–8 presentaron el mismo perfil cromatográfico por lo cual fueron evaporadas juntas para obtener la fracción A (pigmentos no retenidos). Se determinó que en esta fracción; hay dos betaxantinas (Figura 44a), lo cual se confirmó con los espectros de absorción de las señales a 6.3 y 6.6min cuyos λ_{max} fueron 484 y 480nm (Anexo VI); además presentó señales de muy baja intensidad a 538nm (Figura 44b).

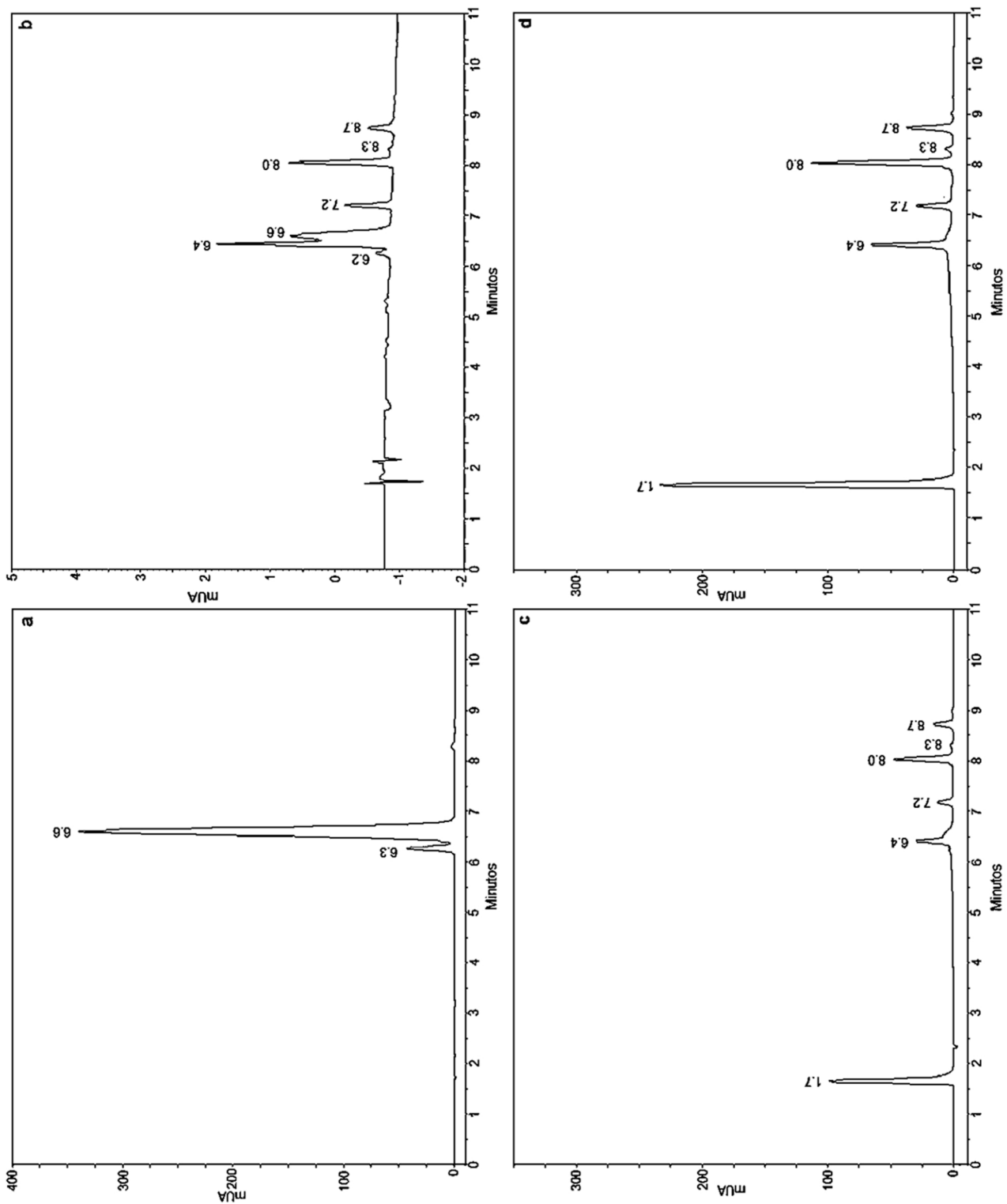


Figura 44. Cromatogramas de la fracción no retenida (A), (a) 483 y (b) 538nm y de la fracción retenida (B) (c) 483 y (d) 538nm del extracto de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenidos por HPLC-DAD.

La fracción retenida (B) presentó un color rojo-violeta; en el cromatograma obtenido a 483nm se observaron 6 señales (Figura 44c) al igual que a 538nm (Figura 44d). Los espectros de absorción de dichas señales permitieron comprobar que se trata de betacianinas cuyos λ_{\max} en la región del UV-Vis se encontraron a 532 y 534nm. Se observó que los pigmentos presentes en la fracción B presentan señales con alturas considerables a 486nm; esto se debe a que la banda de absorción de las betacianinas (pico) va desde 450–600nm con un máximo (Anexo VI) que coincide con lo reportado por otros autores.

Debido a que en la fracción A se encontraron betaxantinas y en la B betacianinas (en mayor proporción); se consideró viable realizar el análisis de los pigmentos por espectroscopia de masas para obtener los pesos moleculares y avanzar con la identificación de las betalaínas presentes en la pitaya roja *S. stellatus*.

6.13.2 Análisis de betalaínas por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC-MS).

El análisis por UPLC-MS confirmó la presencia de diferentes betalaínas; en la fracción A se observaron dos señales con absorbancia en el UV-Vis a 480 nm (betaxantinas); se obtuvo en la señal con tiempo de retención (t_r) de 0.68 min resultados de m/z de 471, 380, 309, 263, 235 y 180 $[M+H]^+$ y λ_{\max} de 208, 206 y 480 nm; al mismo tiempo la señal de 0.94 min tuvo una m/z de 380, 309 y 263 $[M+H]^+$ y λ_{\max} de 260 y 480 nm. Algunas de las características del espectro de absorción y masa del ion molecular con m/z de 309, coinciden con lo reportado para indicaxantina (Khan y Giridhar, 2015) sin embargo; no fue posible identificar los compuestos presentes en esta fracción. Para conseguir la identificación de los pigmentos presentes en la fracción no retenida, se debe aplicar un proceso de purificación más exhaustiva.

Por otro lado, en la fracción B fue posible analizar 5 pigmentos de acuerdo con el cromatograma obtenido (Figura 45). Este estudio preliminar evidenció la presencia de al menos cinco betacianinas presentes en pulpa de pitaya roja; los resultados de MS (Cuadro 36) concuerdan parcialmente con los patrones de fragmentación de betanina, isobetanina, filocactina e isofilocactina previamente reportados por Herbach *et al.*, (2005). En jugo de pitaya *S. queretaroensis* se identificaron 4

betalaínas indicaxantina, betanina, filocactina y 2'-O- apiosylfilocactina (Strack et al., 2003).

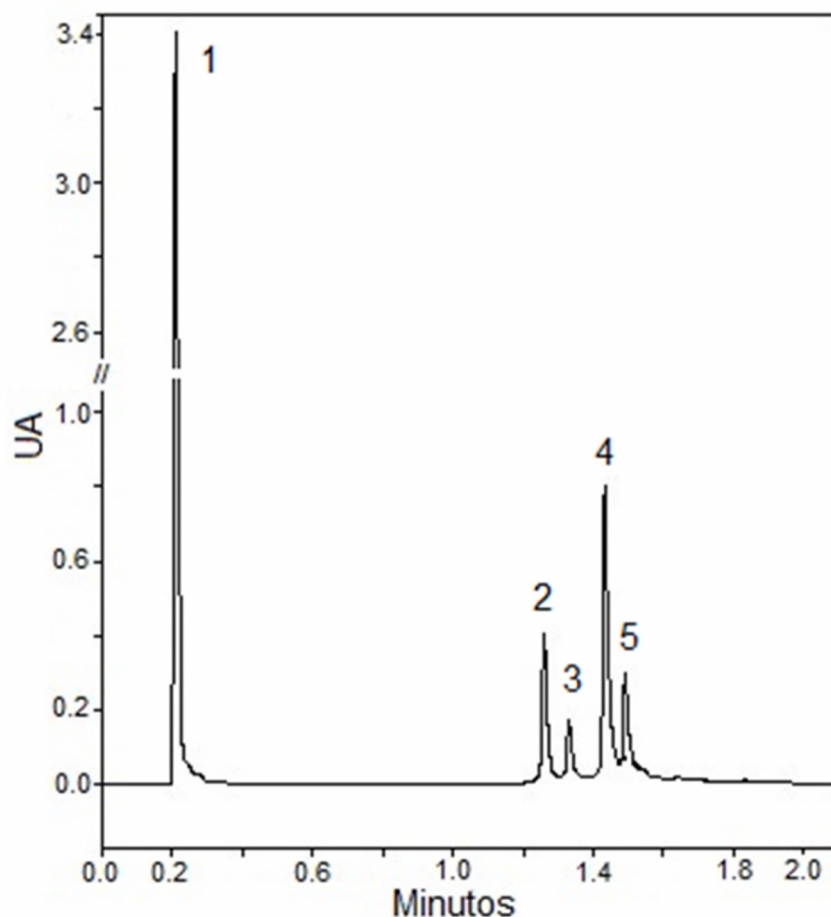


Figura 452. Cromatograma a 534nm de la fracción B (betacianinas) de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* obtenido por UPLC-DAD-MS.

Cuadro 36. Datos cromatográficos, espectrofotométricos y de espectroscopia de masas de las betacianinas de la pulpa de pitaya roja *S. stellatus*.

Señal	tr (min)	λ_{\max} (nm)			$[M+H]^+$ <i>m/z</i>	MS^2 <i>m/z</i> (% base peak)
		I	II	III		
1	0.21	209	267	534	551	$MS^2[551]$: 390(13)389(100)345(19)343(13)
2	1.29	---	267	534	551	$MS^2[551]$: 390(15)389(100)343(13)195(6)
3	1.35	---	267	534	551	$MS^2[551]$: 390(15)389(100)343(16)195(7)
4	1.45	---	267	534	637	$MS^2[637]$: 593(9)390(7)389(100)345(10)343(8)
5	1.51	---	266	534	637	$MS^2[637]$: 593(15)390(13)389(100)345(47)343(19)

tr: tiempo de retención.

Se ha reportado que algunos pigmentos son característicos de un género o cultivo específico; por lo cual es común la presencia de las mismas betalaínas en frutos de la misma familia como en el caso del amaranto (Strack *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2005); con base en los resultados obtenidos será necesario profundizar en los estudios del género *Stenocereus* para identificar cuáles son las betalaínas características.

7. Conclusiones.

- El análisis de componentes principales de los resultados de la caracterización física, fisicoquímica y química de las frutas *S. stellatus* de Puebla, México, puso en evidencia que cada cultivar tiene características específicas; aunque los cuatro tipos de frutas analizadas son del mismo género, especie y lugar de producción.
- El análisis estadístico del contenido de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales, en frutas de cactus incluyendo las pitayas amarillas, violetas y rojas *S. stellatus*, permitió clasificar a la pitaya roja *S. stellatus* como una buena fuente de pigmentos.
- El análisis por HPLC-DAD en extractos crudos mostró diferencias en la altura de las señales y la diversidad de compuestos presentes en las cuatro variedades de pitayas *S. stellatus*. Fue posible identificar la presencia de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides y fenoles simples.
- Con respecto a los pigmentos en el análisis por HPLC-DAD, se obtuvo evidencia de la presencia de diferentes betalaínas en los frutos rojo, amarillo y violeta.
- Se seleccionó la pitaya roja *S. stellatus* como fuente de pigmentos; porque presentó el mayor contenido de betalaínas totales ($2968.8 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) y de acuerdo a los intervalos propuestos en el presente trabajo, se clasificó como una buena fuente de betacianinas.
- La aplicación de pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimas hidrolíticas afectó el rendimiento de extracción de betalaínas, fenoles y actividad antioxidante de la pitaya roja (*S. stellatus*). La selección del pretratamiento más adecuado para la extracción de compuestos bioactivos específicos dependerá de la matriz y el objetivo del estudio.
- Para lograr un mejor aprovechamiento de la pitaya como fuente de compuestos bioactivos, la pulpa debe separarse de las semillas y se recomienda el uso combinado de los tratamientos de ultrasonido y pectinasa.

- La combinación de los pretratamientos de ultrasonido 15 min y pectinasa 0.5% $p \cdot p^{-1}$ incubación a 40 °C por 3h con agitación a 150 rpm, permite incrementar el contenido de fenoles totales (47%) y la capacidad antioxidante (21%) con una pérdida del 18% en el contenido de betalaínas totales con relación a la muestra sin tratamiento.
- Las condiciones óptimas para la extracción de compuestos bioactivos fueron la aplicación del pretratamiento combinado y de acuerdo al diseño central compuesto debe realizarse la extracción con una relación sólido-disolvente de $0.46g \cdot mL^{-1}$ y 85% de etanol; obteniéndose un extracto con mayor contenido de pigmentos que lo reportado para extractos de tuna y un incremento del 17% respecto a lo reportado para pitaya roja *S. stellatus*.
- Las betalaínas de la pitaya roja (*S. stellatus*) presentan su mayor estabilidad a pH entre 4.5–5.1, con energía de activación de 65.6–70.2 $KJ \cdot mol^{-1}$.
- Mediante los resultados de HPLC-DAD se determinó que la pulpa de pitaya roja *S. stellatus* contiene 2 betaxantinas y 6 betacianinas; por otro lado, mediante los análisis por UPLC-MS se llevó a cabo la identificación preliminar de 4 betacianinas (betanina, isobetanina, filocactina e isofilocactina) y al menos una betaxantina (indicaxantina).
- Fue posible optimizar la extracción de las betacianinas de pulpa de pitaya roja *S. stellatus* sin sacrificar su capacidad antioxidante, al aplicar un pretratamiento combinado de ultrasonido–pectinasa, una relación sólido-disolvente de $0.46g \cdot mL^{-1}$ y 85% de etanol obteniendo un pigmento que puede aplicarse en alimentos con acidez entre 4.5–5.1.
- El conocimiento generado en este trabajo de investigación contribuye con la revalorización de los alimentos producidos en zonas desérticas del país y con altos niveles de marginación y contribuye a sentar bases para continuar con el desarrollo de alimentos más sanos donde se disminuya y en un futuro elimine el uso de colorantes sintéticos.

8. Referencias.

- Abdullah, M.Z., Guan, L.C., Lim, K.C. y Karim, A.A. (2004). The applications of computer vision and tomographic radar imaging for assessing physical properties of food. *Journal of Food Engineering*, 61: 125-135.
- Aberoumand, A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 6(1), 71–78.
- Adobe Systems Inc. (2000). Color Models. Recuperado el día 10 de febrero de 2017 en: http://dba.med.sc.edu/price/irf/Adobe_tg/models/cielab.html
- Agbo, M. O., Ezealisiji, K. M., Elijah, J., Ukekwe, F. I., y Obonga, W. O. (2015). Gallic acid derivatives (GADs) from *Loranthus micranthus* Linn. parasitic on *Hevea brasiliensis* with antioxidative capacity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 139–145.
- AMA (2003) Asociación Mexicana del Amaranto. Importancia y características del amaranto, en: El Portal del Amaranto. Disponible en www.amaranto.org.mx (Consultado el 10 de marzo 2017)
- Almaraz-Abarca, N., Da Graça C., M., Delgado-Alvarado, A., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral J., Filipa T., A., Almeida, A. J. y Vieira A. (2007). Fenoles del polen de *Stenocactus*, *Echinocereus* y *Mammillaria* (Cactaceae). *Polibotánica*, 23, 37-55.
- Alupului, A., Călinescu, I., y Lavric, V. (2012). Microwave Extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 74(2), 129–142. <https://doi.org/10.3303/CET0917171>
- Amalan, V., Vijayakumar, N., Indumathi, D., y Ramakrishnan, A. (2016). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.039>
- AOAC Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry; Helrich K. Ed.; 15th ed. Association of Official Analytical Chemists Inc.: Arlington, Virginia, USA; 1990; 1298 pp.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., y Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

- Azeredo H., M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 2365-2376.
- Beltrán-Orozco, M. C., Oliva-Coba, T. G., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G. (2009). Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia*, 43, 153–161.
- Barrows, J. N., Lipman, A. L. y Bailey C. J. (2003). FDA Color Additives: FDA's regulatory process and historical perspectives. U. S. Food and Drug Administration. Disponible en: <http://www.fda.gov>
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., y Weber, P. (2009a). Bioactive compounds: Safety and efficacy. *Nutrition*, 25(11), 1206–1211. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.014>
- Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., y Weber, P. (2009b). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- Boaventura, B. C. B., Murakami, A. N. N., Prudencio, E. S., Maraschin, M., Murakami, F. S., Amante, E. R., y Amboni, R. D. (2013). Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. *Food Research International*, 53 (2), 686-692.
- Braga, C. M., Zielinski, A. A. F., Silva, K. M. D., Souza, F. K. F. D., Pietrowski, G. D. A. M., Couto, M., Granato, D., Wosiacki, G., y Nogueira, A. (2013). Classification of juices and fermented beverages made from unripe, ripe, and senescent apples based on the aromatic profile using chemometrics. *Food Chemistry*, 141, 967–974.
- Bravo, H. H. y Sánchez, M., H., (1991). Las cactáceas de México. Vol. III. UNAM. 3ra ed. México pp. 64.
- Cai, Y. Z., Sun, M., y Corke, H. (1998). Colorant Properties and Stability of *Amaranthus* Betacyanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4491–4495. <https://doi.org/10.1021/jf980457g>
- Cai, Y. Z., Sun, M., y Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>
- Cai, Y. Z., Sun, M., Schliemann, W., y Corke, H. (2001). Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from *Celosia argentea*. *Journal of*

- Cai, Y. Z., Sun, M. y Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amarantaceae*. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 370-376.
- Campos-Rojas, E., Pinedo-Espinoza, J. M., Campos-Montiel, R. G., y Hernández-Fuentes, A. D. (2011). Evaluación de plantas de pitaya (*Stenocereus* spp) de poblaciones naturales de Monte Escobedo, Zacatecas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(3), 173–181.
- Cardoso-Ugarte, G. A., Sosa-Morales, M. E., Ballard, T., Liceaga, A., y San Martín-González, M. F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.025>
- Casas, A., Pickersgill, B., Caballero, J., y Valiente-Banuet, A. (1997) Ethnobotany and the process of domestication of the xoconochтли *Stenocereus stellatus* (*Cactaceae*) in the Tehuacán Valley and La Mixteca Baja, Mexico. *Economic Botany* 51, 279–292.
- Casas, A., Caballero, J., Valiente-Banuet, A., Soriano, J. A. y Dávila, P. (1999) Morphological variation and the process of domestication of *Stenocereus stellatus* (*Cactaceae*) in Central Mexico. *American Journal of Botany*, 86(4), 522–533.
- Castellanos-Santiago, E., y Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758–5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>
- Castellar, M. R., Obón, J. M., y Fernández-López, J. A. (2006). The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 122–128. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2285>
- Castellar M. R., Obón J. M., Alacid M., y Fernández-López J. A. (2008). Fermentation of *Opuntia stricta* (Haw.) fruits for betalains concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4253-4257.
- Ceballos, S. R. (2003). El potencial productivo y comercial de la pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* Haworth) en la Mixteca Baja. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo México. pp 4-5.

- Cejudo-Bastante, M. J., Hurtado, N., y Heredia, F. J. (2015). Potential use of new Colombian sources of betalains. Colorimetric study of red prickly pear (*Opuntia dillenii*) extracts under different technological conditions. *Food Research International*, 71, 91–99.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.011>
- CIE. (2004) 15. Technical report, colorimetry. Commission Internationale de L'Eclairage.
- Chaouch, M. A., Hafsa J., Rihouey C., Le Cerf D., y Majdoub H. (2015). Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: Antioxidant and antiglycated activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 779–786.
- Cheesman, K. H. y Slater, T. F. (1998). Free Radicals in Medicine. *British Medical Bulletin*, 49, 118-121.
- Combo, A., Aguedo M., y Paquot M. (2011). Pectic oligosaccharides: production and potential applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment Journal*, 15, 153-164.
- Coria Cayupán, Y. S., Ochoa, M. J., y Nazareno, M. A. (2011). Health-promoting substances and antioxidant properties of *Opuntia* sp. fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process. *Food Chemistry*, 126(2), 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.033>
- Coronado H., M., Vega, L., S., Gutiérrez T., R., Vázquez F., M. y Radilla V. C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 42(2), 206–212.
- Corral-Aguayo, R. D., Yahia, E. M, Carrillo-Lopez, A., y González-Aguilar, G. (2010). Correlation between some nutritional components and the total antioxidant capacity measured with six different assays in eight horticultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10498–10504.
<https://doi.org/10.1021/jf801983r>
- Coskuner, Y., Turker, N., Ekiz, H. I., Aksay, S., y Karababa, E. (2000). Effect of pH and temperature on the thermostability of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) yellow-orange pigments. *Nahrung*, 44(4), 261–263.
- Cuyckens, F., y Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1002/jms.585>
- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002). Aditivos alimentarios. Mundi Prensa, España, pp.11-14.

- de Andrade S., R. H., do Nascimento S., L., Pereira, G. E., Hallwass F., Silveira P., A. P. (2013). Anthocyanic composition of Brazilian red wines and use of HPLC-UV-Vis associated to chemometrics to distinguish wines from different regions. *Microchemical Journal*, 110, 256–262.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., y Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-López O. (2002) Chapter 1: Colorant, Chapter 2: The color phenomenon, Chapter 4: Pigments as food colorants, Chapter 5: Inorganic and synthetic pigments, Chapter 8: Anthocyanins and Betalains En Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press, USA, pp 1- 7-26, 35-59, 63-91, 167-211.
- Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A., y Pranzetti V. (2010). El color en los alimentos: Determinación de color en mieles. *Invenio* 13(25), 145-152.
- De Rijke, E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., y Brinkman, U. A. Th. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.019>
- Downham, A., y Collins, P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(1), 5–22. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x>
- Dey, P. M., y Harborne, J. B. In *Methods in Plant Biochemistry*, Vol I, Plant Phenolics, ed Harborne, J.B. Academic Press, Londres 1989, pp 1–29
- Ebrahimzadeh-Bideskan, A.-R., Hami, J., Alipour, F., Haghiri, H., Fazel, A.-R., y Sadeghi, A. (2016). Protective effects of ascorbic acid and garlic extract against lead-induced apoptosis in developing rat hippocampus. *Metabolic Brain Disease*, 31(5), 1123–1132. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9837-7>
- Engels, C., Knodler, M., Zhao, Y., Carle, R., y Schieber, A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(17), 7712-7718.
- Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C. L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., y Burrowes, J. (2007). Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of Nutrition*, 137, 718S–737S.

- Escarpa, A., y Gonzalez, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119–127. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01188-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01188-0)
- Esquivel, P. y Araya, Q. Y. (2012). Pitahaya (*Hylocereus* sp.): fruit characteristics and its potential use in the food industry. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1): 113-129.
- Esquivel, P., Stintzing, F. C. y Carle R. (2007). Phenolic compound profiles and their corresponding antioxidant capacity of purple pitaya (*Hylocereus* sp.) genotypes. *der Zeitchrift für naturforschung*, 62, 636-644.
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z., y Gu, F. (2008). Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *LWT - Food Science and Technology*, 41(8), 1412–1416. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.09.003>
- FDA (2002). Food and Drug Administration. Summary of food color additives listed for use in the United States in food, drugs, cosmetics and medical devices. Disponible en: www.fda.gov
- FDA (2010). Food and Drug Administration (2010) Food ingredients and colors. FDA International Food Information Council Foundation. Disponible en: www.fda.gov
- FDA (2015). Food and Drug Administration. Additives Approved for Use in Human Food. Color Additive Status List <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm106626.htm> (accessed February 19, 2017).
- Fernández-López, J. A., Castellar, R., Obón, J. M., y Almela, L. (2002). Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia*, 56, 591–595. <https://doi.org/10.1007/BF02497675>
- Fernández-López, J. A., Almela, L., Obón, J. M., y Castellar, R. (2010). Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 253–259. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0189-x>
- Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C. y Zou. C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2574-2589.
- Figuroa-Cares, I., Martínez-Damián, M. T., Rodríguez-Pérez, E., Colinas-León, M. T., Valle-Guadarrama, S., Ramírez-Ramírez, S., y Gallegos-Vázquez, C. (2010). Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante

en 12 cultivares de tuna (*Opuntia* spp.) de México. *Agrociencia*, 44(7), 763–771.

Foong, J. H., Hon, W. M., y Ho, C. W. (2012). Bioactive Compounds Determination in Fermented Liquid Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Borneo Science*, September, 31–48.

Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., y Ritieni, A. (1999) Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035–1040.

Freitas, S. P., Hartman, L., Couri, S., Jablonka, F. H. y de Carvalho, C. W. P. (1997). The combined application of extrusion and enzymatic technology for extraction of soybean oil. *Fett/Lipid*, 99, 333–337.

Fukuji, T. S., Tonin, F. G., y Tavares, M. F. M. (2010). Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.05.014>

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., y García-Carmona, F. (2010). Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232(2), 449–460. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1191-0>

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., y García-Carmona, F. (2012). Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *Journal of Natural Products*, 75(6), 1030–1036. <https://doi.org/10.1021/np200950n>

Gandía-Herrero y García-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*, 18(6), 334–343.

García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., y Valle-Guadarrama, S. (2012). Betalains, phenolic compounds and antioxidant activity in pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35, 1–5.

García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., y Joaquín-Cruz, E. (2013). Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(4), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0391-8>

Ghafoor, K., Hui, T., y Choi, Y. H. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, 35(3), 735–746. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00413.x>

- Gómez-García, R., Martínez-Ávila, G. C. G., y Aguilar, C. N. (2012). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech*, 2, 297–300. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0055-7>
- Gorinstein, S., Caspi, A., Libman, I., Lerner, H.T., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Tashma, Z., Katrich, E., Feng, S. y Trakhtenberg, S. (2006) Red grapefruit positively influences serum triglyceride level in patients suffering from coronary atherosclerosis: studies in *vitro* and in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1887-1892. <http://dx.doi.org/10.1021/jf058171g>
- Gorinstein, S., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Namiesnik, J., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Ham, K. S., Kang, S. G., Vearasilp, K., y Suhaj, M. (2013). Application of analytical methods for the determination of bioactive compounds in some berries. *Food Analytical Methods*, 6, 432–444. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9453-z>
- Güneşer, O. (2016). Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment. *Food Chemistry*, 196, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.033>
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J. y Willett, W. C. (2002) A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 94, 391-398. <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/94.5.391>
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V, y Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), 2023–2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Harborne, J. B., Baxter, H. y Moss, G. P. (1999). *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants*. 2a Ed. London: Taylor y Francis.
- Harivaindaran, K. V., Rebecca, O. P. S. y Chandran S. (2008). Study of optimal temperature, pH, and stability of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel for use as potential natural colorant. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(8), 2259-2263.
- Harnly, J. M., Bhagwat, S., y Lin, L.-Z. (2007). Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 47–61. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1424-7>

- Hari, R. K., Patel, T. R., y Martin, A. M. (1994). An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Reviews International*, 10, 49–70.
- Hayat, K., Zhang, X., Farooq, U., Abbas, S., Xia, S., Jia, C., Zong, F. y Zhang, J. (2010). Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food Chemistry*, 123, 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.060>
- Herbach, M. K., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2004). Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Brittonv & Rose] monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. *European Food Research and Technology*, 219, 377–385. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0948-8>
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2005). Identification of heat-induced degradation products from purified betanin, phyllocactin and hylocerenin by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2603–2616. <https://doi.org/10.1002/rcm.2103>
- Herbach K. M., Stintzing F. C. y Carle R. (2006). Betalain stability and degradation-structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71, R41-R50.
- Herbach, K. M., Maier, C., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2007). Effects of processing and storage on juice colour and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice. *European Food Research and Technology*, 224, 649–658. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0354-5>
- Hobson, G.E. (1993). Maduración del fruto. En: Fisiología y Bioquímica Vegetal. Azcon-Bieto (ed.), J. Interamericana McGrawhill. España, pp. 463-478.
- Hong, C. y Haiyun, W. (2010). Optimization of volatile fatty acid production with cosubstrate of food wastes and dewatered excess sludge using response surface. *Bioresource Technology*, 14, 5487-5493
- Hou, Z., Qin, P., Zhang, Y., Cui, S., y Ren, G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza sativa* L.) and their degradation kinetics. *Food Research International*, 50, 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.037>
- Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., y Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73, 48–65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00716.x>

- Huang, A. S., y Von Elbe, J. H. (1986). Stability comparison of two betacyanine pigments—amaranthine and betanine. *Journal of Food Science*, 51, 670–674.
- Hunterlab (2015). CIE Standard observers and calculation of CIE X, Y, Z color values. Application Note 1002.01
- Hunter, R. S. y Harold, R. W. (1987). Color order systems en: The measurement of appearance, 2nd ed., John Wiley and Sons, Inc. New York, NY USA. Pp 10-13.
- Ignat, I., Volf, I., y Popa, V. I. (2011) A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126:1821-1835.
- Il-Hyoung, C., Kyung-Duk, Z. (2007). Photocatalytic degradation of azo dye (*Reactive Red 120*) in TiO₂/UV system: Optimization and modeling using a response surface methodology (RSM) based on the central composite design. *Dyes and Pigments*, 75, 533-543.
- Jack, B. U., Malherbe, C. J., Huisamen, B., Gabuza, K., Mazibuko-Mbeje, S., Schulze, A. E., Joubert, E., Muller, C. J. F., Louw, J. y Pheiffer, C. (2016). A polyphenol-enriched fraction of *Cyclopia intermedia* decreases lipid content in 3T3-L1 adipocytes and reduces body weight gain of obese db/db mice. *South African Journal of Botany*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.08.007>
- Jiménez-Aparicio, A., Del Villar-Martínez, A. A., Dávila-Ortiz, G., Rodríguez-Monroy, M., y Gutiérrez-López, G. F. (1997). Estabilidad fisicoquímica de la betanina producida por cultivo de células de betabel (*Beta vulgaris* L.). *Acta mexicana de ciencia y tecnología*, 42, 67-80.
- Jung, U. J., Lee, M. K., Park, Y. B., Kang, M. A., y Choi, M. S. (2006). Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38, 1134–1145.
- Kara, D. (2009). Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis. *Food Chemistry*, 114, 347–354.
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., y Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 98, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.016>
- Khan, M. I., Sri Harsha, P. S. C., Giridhar, P., y Ravishankar, G. A. (2012). Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and *in vitro* cancer

- cell cytotoxicity of *Rivina humilis* L. berries, potential source of betalains. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 315–323.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.025>
- Khan, M. I., y Giridhar, P. (2014). Enhanced chemical stability, chromatic properties and regeneration of betalains in *Rivina humilis* L. berry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 58, 649–657.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.027>
- Khan, M. I., y Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267–295.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.008>
- Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, 197, 1280–1285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>
- Koley, T. K., Singh, S., Khemariya, P., Sarkar, A., Kaur, C., Chaurasia, S. N. S., y Naik, P. S. (2014). Evaluation of bioactive properties of Indian carrot (*Daucus carota* L.): A chemometric approach. *Food Research International*, 60, 76–85.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.006>
- Laroze, L., Soto, C., y Zúñiga, M. E. (2010). Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-12>
- Latha, R. C. R., y Daisy, P. (2011). Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from *Terminalia bellerica* Roxb. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 189, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.11.005>
- Letellier, M., y Budzinski, H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27, 259–271.
- Li, B. B., Smith, B., y Hossain, M. M. (2005). Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48, 189–196.
- Li, R., Cao, S., Dai, J., Wang, L., Li, L., Wang, Y., Ying, W., y Ye, Y. (2014). Effect of caffeic acid derivatives on polychlorinated biphenyls induced hepatotoxicity in male mice. *Journal of Biomedical Research*, 28(5), 423–428.
<https://doi.org/10.7555/JBR.28.20120109>
- Liaotrakoon, W., de Clercq, N., van Hoed, V., van de Walle, D., Lewille, B., y Dewettinck, K. (2013). Impact of Thermal Treatment on Physicochemical, Antioxidative and Rheological Properties of White-Flesh and Red-Flesh

- Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) Purees. *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 416–430. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0722-4>
- Liu, S., y Edwards, D. S. (2001). Stabilization of ⁹⁰Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjugate Chemistry*, 12, 554–558. <https://doi.org/10.1021/bc000145v>
- Lizada, C. (1993). Mango. En: Seymour, J. G. (ed.) *Biochemistry of fruit ripening* Chapman y May. Londres, pp. 255-271.
- Mallick, N., Khan, R. A., Riaz, A. y Afroz, S. (2016). Anticoagulant, antiplatelet and antianemic effects of *Citrus paradisi* (grape fruit) juice in rabbits. *Pharmacology & Pharmacy*, 7, 397- 406. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2016.71047>
- Nemzer, B., Pietrkowski, Z., Spórna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michałowski, T., y Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root *Beta vulgaris* L. dried extracts. *Food Chemistry*, 127, 42–53.
- Manchali, S., Chidambara, M. K. N., Nagaraju, S. y Neelwarne, B. (2012) Stability of Betalain Pigments of Red Beet. In: Neelwarne B. ed. *Red Beet Biotechnology: Food and Pharmaceutical Applications*, New York: Springer Science, p 55-74. DOI 10.1007/978-1-4614-3458-0_3
- Mello, F. R., Bernardo, C., Odebrecht, D. C., Gongaza, L., Amante, E. R., Fett, R. y Bileski C., L. M. (2015). Antioxidant properties, quantification and stability of betalains from pitaya (*Hylocereus undatus*) peel. *Ciencia Rural, Santa Maria*, 45(2), 323-328.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C. y Carle, R. (2005a) Colour studies on fruit juice blends from *Opuntia* and *Hylocereus* cacti and betalain-containing model solutions derived therefrom. *Food Research International*, 38, 975–981.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2005b). Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 221–231. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.02.001>
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2006). Impact of thermal treatment and storage on color of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. cv. 'Gialla') juices. *Journal of Food Science*, 71, C400-C406. doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00134.x
- Moßhammer, M. R., Rohe, M., Stintzing, F. C., y Carle, R. (2007). Stability of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. cv. "Gialla") betalains

as affected by the juice matrix and selected food additives. *European Food Research and Technology*, 225, 21–32. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0378-x>

Naderi, N., Stintzing, F. C., Ghazali, H. M., Manap, Y. A., y Jazayeri, S. D. (2010). Betalain extraction from *Hylocereus polyrhizus* for natural food coloring purposes. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 12, 143–154.

Nair, G. G., y Nair, C. K. K. (2013). Radioprotective effects of gallic acid in mice. *BioMed Research International*, 2013, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2013/953079>

Naselli, F., Tesoriere, L., Caradonna, F., Bellavia, D., Attanzio, A., Gentile, C., y Livrea, M. A. (2014). Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16^{INK4a} gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450, 652–658. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.029>

Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A. y Scaccini C. (2002). Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79, 119–124.

Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., y Khodir, M. (2015). Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chemistry*, 187, 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>

Ochoa-Velasco, C. E., y Guerrero B., J. Á. (2013). Short-wave Ultraviolet-C light effect on pitaya (*Stenocereus griseus*) juice inoculated with *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Food Engineering*, 117, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.020>

Osorio-Esquivel, O., Alicia-Ortiz-Moreno, Álvarez, V. B., Dorantes-Álvarez, L., y Giusti, M. M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*, 44, 2160–2168. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.011>

Otálora, M. C., Carriazo, J. G., Iturriaga, L., Nazareno, M. A., y Osorio, C. (2015). Microencapsulation of betalains obtained from cactus fruit (*Opuntia ficus-indica*) by spray drying using cactus cladode mucilage and maltodextrin as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 187, 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.090>

- Pasquet, V., Chérourvier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Kass, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J. P. y Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46, 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A. y Sirichakwal. P. (2008) Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, 241–248.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L. y Bravo, J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 31, 61–85.
- Pereira, C., Barros, L., y Ferreira, I. C. (2015). Extraction, identification, fractionation and isolation of phenolic compounds in plants with hepatoprotective effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 1068–1084. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7446>
- Pérez-Loredo, M. G., García-Ochoa, F., y Barragán-Huerta, B. E. (2016). Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis. *International Journal of Food Properties*, 19, 326–338.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1022259>
- Peyravi A., Firouzi Z. y Meshkibaf M.H. (2016). The protective effects of vitamins C and E on the oxidative stress induced by sodium metabisulfite on the kidney tissue in adult rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, 6(2), 146-154.
- Prakash M., J., y Manikandan, S. (2012). Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *Dyes and Pigments*, 95, 465–472.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2012.06.007>
- Puri, M., Sharma, D., y Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30, 37–44.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>
- Quintanar, M. y Calderón, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones. *Revista Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101.
- Ranganna, S. Xylene Extraction Method. In: Handbook of Analysis and Quality for fruits and Vegetable Products; Ranganna, S. Ed.; 2nd ed. McGraw Hill: New Delhi, India, 1986; 107–110.

- Ravichandran, K., Saw, N. M. M. T., Mohdaly, A. A. A., Gabr, A. M. M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D. y Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International*, 50, 670–675. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.002>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rebecca, O. P. S., Boyce, A. N., y Chandran, S. (2010). Pigment identification and antioxidant properties of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *African Journal of Biotechnology*, 9(10), 1450–1454. <https://doi.org/10.5897/AJB09.1603>
- Reyes, A., Galicia, M. y Carrillo, M. (2011) Antioxidantes: la magia de lo natural. *Revista Tlatemoani*, 8, 1-16.
- Reynoso, R., Garcia, F. A., Morales, D., y Gonzalez de Mejia, E. (1997). Stability of betalain pigments from a cactacea fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2884–2889. <https://doi.org/10.1021/jf960804r>
- Robards, K., y Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids A review. *Analyst*, 122, 11R–34R. <https://doi.org/10.1039/a606499j>
- Roberfroid, M. (1996). Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutrition Reviews*, 54, S38-S42.
- Rosenthal, A., Pyle, D. L., y Niranjana, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 402–420.
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C. Winterhalter, P. y Von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6081–6089.
- Saeed, U., Alsadi, J., Ahmad, S., Rizvi, G., y Ross D. (2014). Polymer color properties: Neural network modeling. *Advances in Polymer Technology*. DOI: 10.1002/adv.21462.
- Sáenz, C., Cancino, B., y Robert, P. (2012). Red betalains from *Opuntia* spp.: Natural colorants with potential applications in foods. *Israel Journal of Plant Sciences*, 60 (3), 291–299. <https://doi.org/10.1560/IJPS.60.2.291>

- SAGARPA (2013) Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera - Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIAP- SIACON). Disponible en <http://www.siap.gob.mx>.
- Sainani, K. L. (2014). Introduction to principal components analysis. *The American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation*, 6, 275–278. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2014.02.001>
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., y Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571–581. <https://doi.org/10.1021/jf020926l>
- Santos G., J., Barros, M., Fernandes, P., Pires, P., y Bardsley, R. (2013). Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. *Food Chemistry*, 136, 1526–1532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.066>
- Schieber, A., Keller, P., y Carle, R. (2001). Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 910, 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)01217-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01217-6)
- Schweiggert, R. M., Villalobos-Gutierrez, M. G., Esquivel, P., y Carle, R. (2009). Development and optimization of low temperature enzyme-assisted liquefaction for the production of colouring foodstuff from purple pitaya (*Hylocereus* sp. [Weber] Britton & Rose). *European Food Research and Technology*, 230, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1167-0>
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., y Barroso, C. G. (2015). Optimisation and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*, 169, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.128>
- Sharma, S., Khan, N., y Sultana, S. (2004). Modulatory effect of gentisic acid on the augmentation of biochemical events of tumor promotion stage by benzoyl peroxide and ultraviolet radiation in Swiss albino mice. *Toxicology Letters*, 153, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.048>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

- Sivakumar, V., Anna, J. L., Vijayeeswarri, J., y Swaminathan, G. (2009). Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 782–789. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.03.009>
- Sivakumar, V., Vijaeeswarri, J., y Anna, J. L. (2011). Effective natural dye extraction from different plant materials using ultrasound. *Industrial Crops and Products*, 33, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.09.007>
- Sönmez, M., Türk, G., y Yüce, A. (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, 63, 2063–2072. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.003>
- Socaciu, C. ed. (2008) Food colorants chemical and functional properties. 1a edicion. CRC Press, Boca Raton, FL. 633 pag.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Steglich, W. y D. Strack. 1991. Betalains, in *The Alkaloids*, Vol. 39. A. Brossi, Ed. Academic Press, Orlando, FL, pp. 1–62.
- Stintzing, F. C., Schieber, A., y Carle, R. (2003). Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. *European Food Research and Technology*, 216, 303–311. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0657-0>
- Stintzing, F. C., y Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.07.004>
- Stintzing, F.C., Herbach, K. M., Mobhammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., y Felker, P. (2005) Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442–451.
- Stintzing, F. C., y Carle, R. (2007). Betalains - emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 514–525. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.012>
- Stuppner, H. y Egger, R. (1996). Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris*. *Journal of Chromatography*, 735, 409–413.

- Strack, D., Vogt, T. y Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247–269.
- Suh, H. J., Noh, D. O., Kang, C. S., Kim, J. M., y Lee, S. W. (2003). Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract. *Nahrung - Food*, 47, 132–135. <https://doi.org/10.1002/food.200390024>
- Sun, Y., Ma, G., Ye, X., Kakuda, Y., y Meng, R. (2010). Stability of all-*trans*- β -carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.12.005>
- Swamy, G. J., Sangamithra, A. y Chandrasekar V. (2014). Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box-Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64-74.
- Tenore, G. C., Novellino, E., y Basile, A. (2012). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of Functional Foods*, 4, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.003>
- Trezzini, G. F. y Zryd, J. P. (1991). Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochemistry*, 30, 1901–1903.
- Tsuda, S., Murakami, M., Kano, K., Taniguchi, K., y Sasaki, Y. F. (2001) DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Science*, 61, 92–99.
- Urias-Orona, V., Huerta-Oros, J., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza J., Rascón-Chu, A. y Gardea, A. A. (2010). Component analysis and free radicals scavenging activity of *Cicer arietinum* L. husk pectin. *Molecules*, 15, 6948-6955.
- USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods> (accessed July 10, 2014).
- Uttara, B.; Singh, A.V.; Zamboni, P. y Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7, 65-74.
- Vaillant, F., Pérez, A., Davila, I., Dornier, M., y Reynes, M. (2005). Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*, 60, 3–12.
- Venereo, G.J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medico Militar*, 31(2), 126-133.

- Villalobos-Castillejos, F., Cerezal-Mezquita, P., Hernández-De Jesús, M. L., y Barragán-Huerta, B. E. (2013). Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma*. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 1243–1251. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12083>
- Voća, S., Žlabur, J. S., Dobričević, N., Jakobek, L., Šeruga, M., Galić, A., y Pliestić, S. (2014) Variation in the bioactive compound content at three ripening stages of strawberry fruit. *Molecules*, 19, 10370–10385.
- Wang, L. and Weller C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 300-312.
- Wang, P., Ye, X., Liu, R., Chen, H., Liang, X., Li, W., Zang, X., Qin, X., Bai, H., Zhang, W., Wang, X. y Hai, C. (2013). Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65, 311–318. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.10.001>
- Wang, X., Hasegawa, J., Kitamura, Y., Wang, Z., Matsuda, A., Shinoda, W., Miura, N., y Kimura, K. (2011). Effects of hesperidin on the progression of hypercholesterolemia and fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 117, 129–138.
- Wanitchang, J., Terdwongworakul, A., Wanitchang, P., y Noypitak, S. (2010). Maturity sorting index of dragon fruit: *Hylocereus polyrhizus*. *Journal of Food Engineering*, 100, 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.025>
- Woo, K. K., Ngou, F. H. Ngo, L. S., Soong, W. K., y Tang P. Y. (2011) Stability of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *American Journal of Food Technology*, 6(2), 140-148. DOI:10.3923/ajft.2011.140.148
- Wu, L. C., Hsu, H. W., Chen, Y. C., Chiu, C. C., Lin, Y. I., y Ho, J. A. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95, 319–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.002>
- Wysocki G. y Stiles W.S. (1982). *Color Science. Concepts and methods quantitative data and formulae*. 2nd Edition. John Wiley & Son, New York, pp 117-248.
- Xu, G., Ye, X., Liu, D., Ma, Y., y Chen, J. (2008). Composition and distribution of phenolic acids in Ponkan (*Citrus poonensis* Hort ex Tanaka) and Huyou (*Citrus paradisi* Macf. Changshanhuoyou) during maturity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 382–389.

- Yahia, E. M., y Mondragon-Jacobo, C. (2011). Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). *Food Research International*, 44, 2311–2318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.042>
- Yang, B., Jiang, Y., Shi, J., Chen, F., y Ashraf, M. (2011). Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit - A review. *Food Research International*, 44, 1837–1842. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.019>
- Zhao, J., Guang-Ping, L., Yi-Wen, C., y Shao-Ping, L. (2011) Advanced development in analysis of phytochemicals from medicine and food dual purposes plants used in China. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7453-7475.
- Zozio, S., Pallet, D., y Dornier, M. (2011). Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and black carrot (*Daucus carota* L.). *Fruits*, 66, 203–215. <https://doi.org/DOI 10.1051/fruits/2011030>

ANEXO I. Resultados del análisis de componentes principales de las propiedades físicas, fisicoquímicas y químicas de frutas de *S. stellatus*.

Análisis de componente principal: pH, Acidez (% Ac, L, a, b, Betacianinas, Beta

Análisis de los valores y vectores propios de la matriz de correlación

Valor propio	7.1643	2.8765	1.4402	0.2368	0.2118	0.0420	0.0160	0.0090
Proporción	0.597	0.240	0.120	0.020	0.018	0.003	0.001	0.001
Acumulada	0.597	0.837	0.957	0.976	0.994	0.998	0.999	1.000

Valor propio	0.0031	0.0002	0.0001	-0.0000
Proporción	0.000	0.000	0.000	-0.000
Acumulada	1.000	1.000	1.000	1.000

Valores de cargas en cada variable por componente principal

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
pH	-0.230	-0.455	0.053	0.012	0.071	0.624
Acidez (% Acido malico)	0.328	0.098	-0.054	-0.896	-0.149	0.144
L	0.362	0.117	-0.081	0.088	0.194	-0.118
a	-0.302	-0.317	-0.185	-0.106	0.069	-0.013
b	0.154	-0.036	-0.747	0.111	0.297	-0.151
Betacianinas (µg/g)	-0.295	0.326	0.170	0.056	-0.354	-0.123
Betaxantinas (µg/g)	-0.297	0.238	-0.370	-0.066	-0.128	0.054
Betalainas (µg/g)	-0.318	0.294	-0.101	0.002	-0.246	-0.043
Fenoles totales (mgEAG/g)	-0.154	0.441	0.316	-0.088	0.758	0.127
ABTS (µmol ET/g)	0.191	0.468	-0.230	0.229	-0.154	0.537
Ácido ascorbico (mg/g)	0.364	-0.027	0.096	0.254	-0.145	0.386
Azúcares (%)	0.351	-0.059	0.240	0.183	-0.145	-0.284

Variable	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12
pH	-0.405	0.234	-0.223	-0.211	0.161	0.065
Acidez (% Acido malico)	-0.054	0.102	0.062	-0.122	-0.027	0.022
L	-0.030	0.052	-0.062	-0.056	0.870	0.148
a	0.091	-0.108	0.830	-0.050	0.194	0.093
b	-0.056	0.217	-0.068	-0.392	-0.283	0.067
Betacianinas (µg/g)	0.019	0.163	0.009	-0.490	0.008	0.606
Betaxantinas (µg/g)	-0.110	0.432	-0.028	0.670	0.076	0.201
Betalainas (µg/g)	-0.039	0.223	0.040	-0.297	0.227	-0.740
Fenoles totales (mgEAG/g)	-0.043	0.199	0.166	-0.037	-0.111	-0.008
ABTS (µmol ET/g)	-0.259	-0.454	0.226	-0.002	-0.051	0.030
Ácido ascorbico (mg/g)	0.559	0.506	0.218	-0.016	-0.071	-0.034
Azúcares (%)	-0.652	0.330	0.347	0.050	-0.146	-0.054

Valores de scores para cada muestra por componente principal

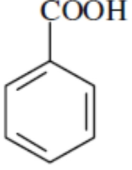
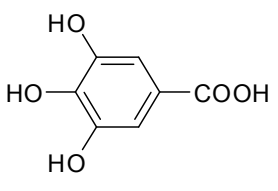
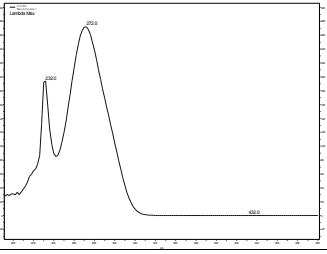
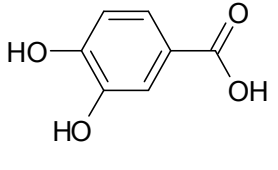
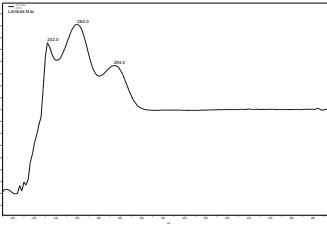
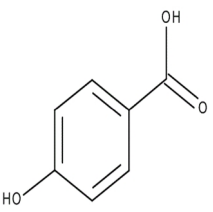
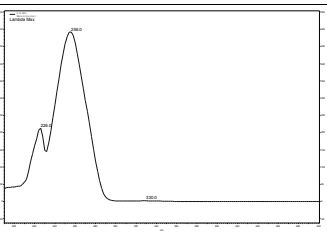
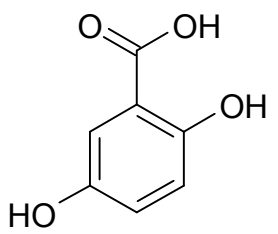
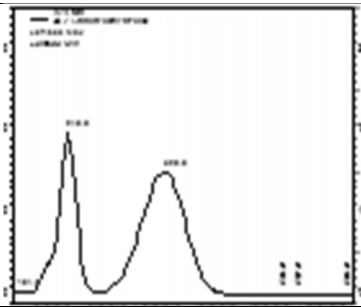
Samples	SPC1	SPC2	SPC3	SPC4	SPC5
1 (SSBM)	4.26987	0.98856	0.23778	0.27935	-0.053763
2	3.76893	1.03541	0.49279	0.08814	0.714755
3	4.38982	0.68428	-0.08353	-0.14884	-0.574856
4 (SSAM)	-0.25134	-0.79230	-1.38879	-1.27525	0.473288
5	-0.19128	-1.72843	-1.92640	0.36094	-0.385133
6	-0.69598	-1.53127	-1.74014	0.66550	0.301839
7 (SSVM)	-0.36697	-1.70384	1.42572	-0.45465	-0.576004
8	-1.25619	-1.74094	1.43126	0.18795	0.021686

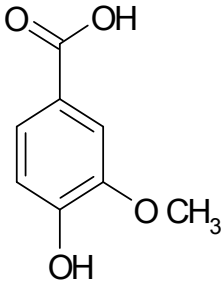
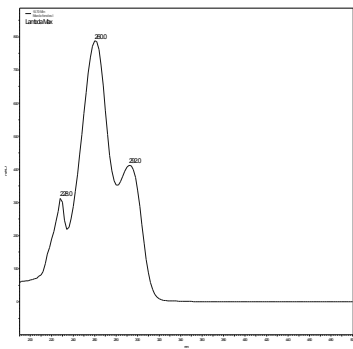
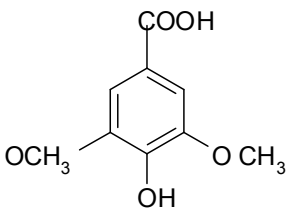
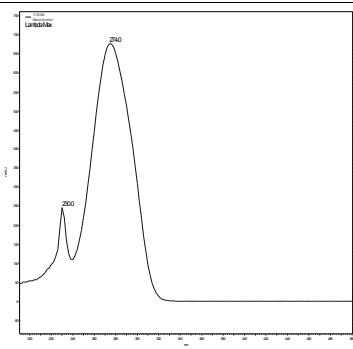
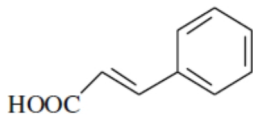
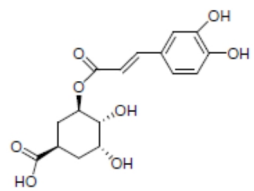
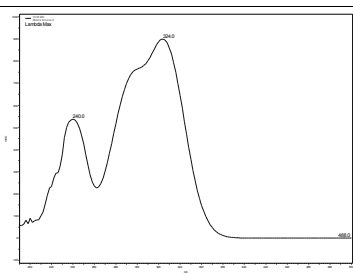
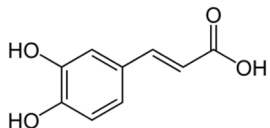
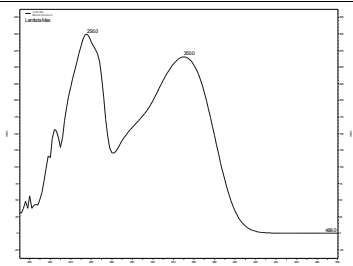
9	-1.42723	-1.66489	1.65917	0.20044	0.439767
10 (SSRM)	-2.58538	2.31864	0.00633	-0.02612	-0.252812
11	-3.04678	2.58403	0.06093	0.11981	0.407739
12	-2.60748	1.55076	-0.17513	0.00273	-0.516504

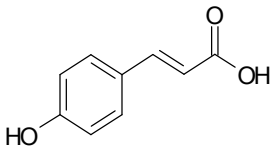
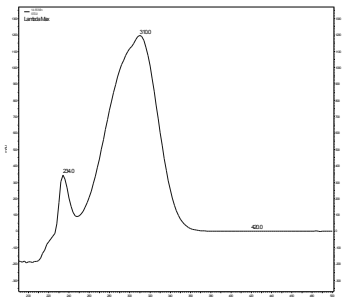
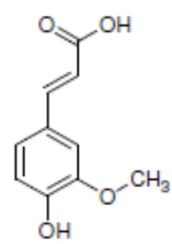
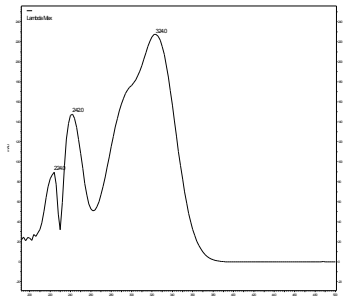
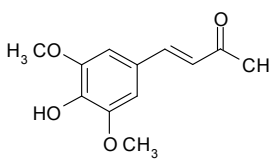
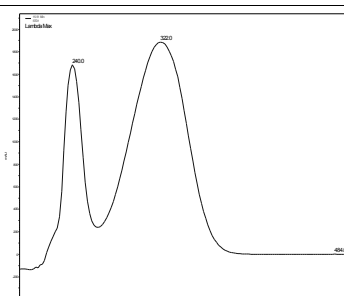
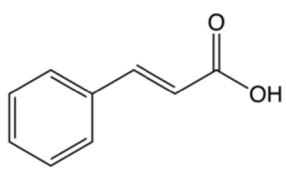
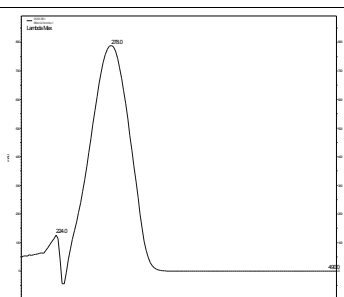
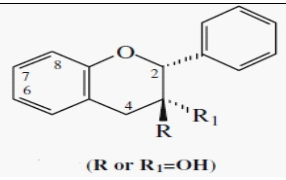
Samples	SPC6	SPC7	SPC8	SPC9	SPC10
1 (SSBM)	0.239197	-0.060861	0.005496	0.115127	0.0093981
2	-0.115908	-0.030751	0.134031	-0.061393	-0.0165419
3	-0.182655	0.088935	-0.151353	-0.055305	0.0058810
4 (SSAM)	0.014621	-0.019345	-0.043748	0.027162	-0.0001341
5	0.055402	0.048406	0.061659	0.038704	-0.0199247
6	0.001533	-0.036291	-0.010265	-0.063443	0.0207805
7 (SSVM)	0.127243	0.034118	0.170210	-0.035617	0.0140615
8	0.026592	0.172009	-0.096038	0.008033	-0.0172400
9	-0.109798	-0.174885	-0.083047	0.027037	0.0045898
10 (SSRM)	0.375636	-0.146761	-0.062497	-0.063170	-0.0100016
11	-0.002632	0.247875	0.026951	0.025318	0.0113277
12	-0.429231	-0.122448	0.048600	0.037549	-0.0021964

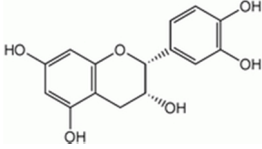
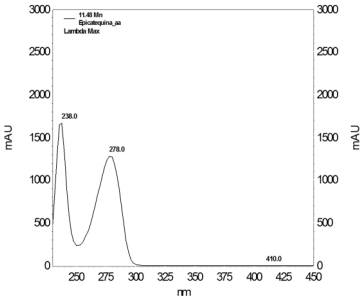
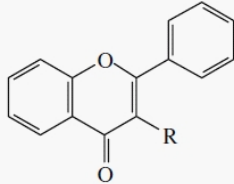
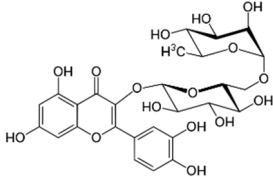
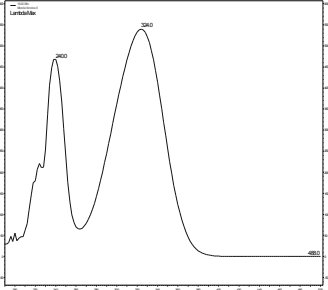
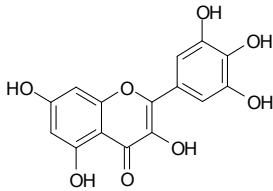
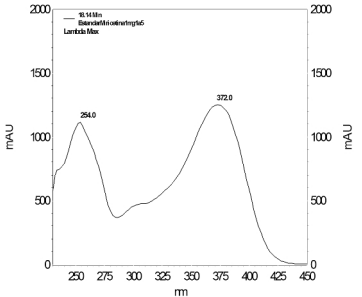
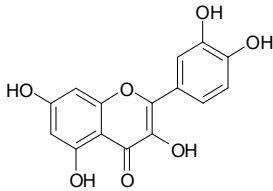
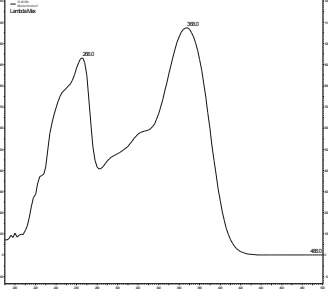
Samples	SPC11	SPC12
1 (SSBM)	0.0074568	-0.0000000
2	0.0009362	0.0000000
3	-0.0079657	-0.0000000
4 (SSAM)	0.0035902	0.0000000
5	-0.0145533	0.0000000
6	0.0106810	-0.0000000
7 (SSVM)	-0.0012690	-0.0000000
8	0.0173298	0.0000000
9	-0.0168601	-0.0000000
10 (SSRM)	-0.0003412	0.0000000
11	-0.0093479	-0.0000000
12	0.0103434	0.0000000

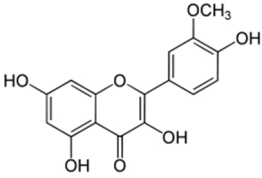
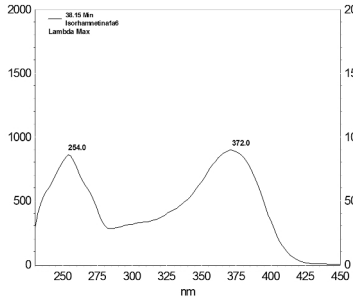
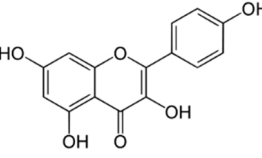
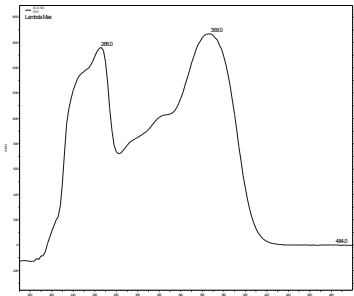
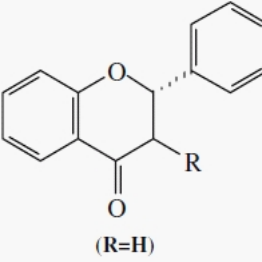
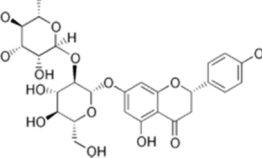
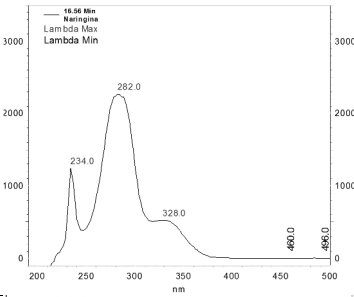
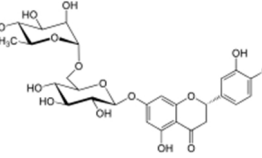
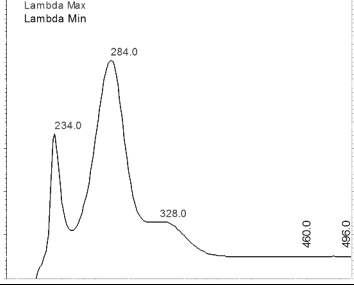
Anexo II. Características de compuestos fenólicos.

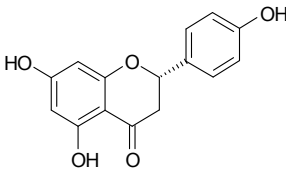
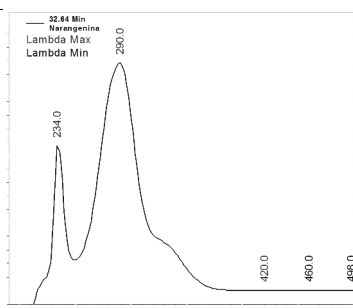
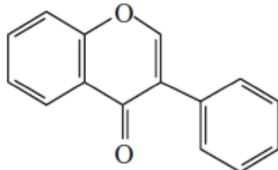
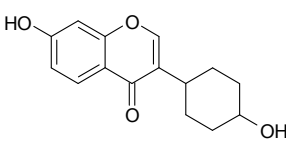
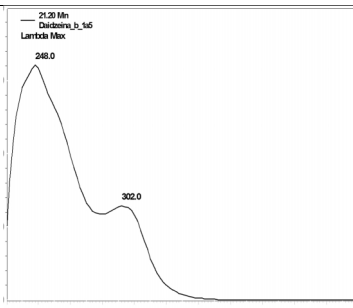
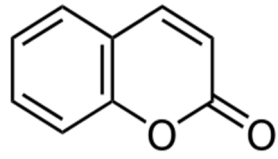
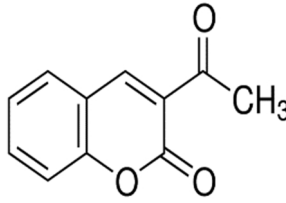
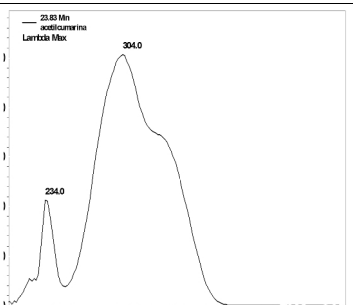
Estándar	tr (min) 260nm	Área _{260nm} [1mg·mL ⁻¹]	$\lambda_1/\lambda_2/\lambda_3$ (nm)	Fórmula	Espectro de absorción
Ácidos hidroxibenzoicos					
Ácido gálico	1.91/3.66	38 371 624	232/272		
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	6.24	187 622 627	232/260/294		
Ácido 4-hidroxibenzoico	9.02	199 283 824	226/256		
Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	9.29	3 018 005	240/328		

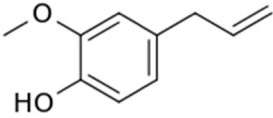
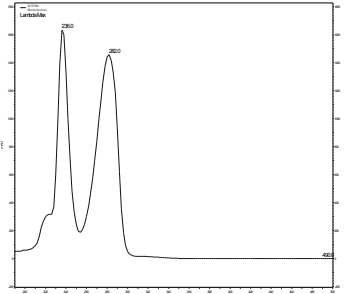
Estándar	tr (min) 260nm	Área _{260nm} [1mg·mL ⁻¹]	λ ₁ / λ ₂ / λ ₃ (nm)	Fórmula	Espectro de absorción
Ácido vanílico	10.60	164 042 086	228/260/292		
Ácido siríngico	11.31	72 635 536	230/274		
Ácidos hidroxicinámicos					
Ácido clorogénico	9.44	15 596 576	240/324		
Ácido cafeico	10.77	61 816 335	256/350		

Estándar	tr (min) 260nm	Área _{260nm} [1mg·mL ⁻¹]	λ ₁ / λ ₂ / λ ₃ (nm)	Fórmula	Espectro de absorción
Ácido p-cumárico	13.77	82 165 408	234/310		
Ácido ferúlico	14.93	79 354 754	224/242/324		
Ácido sinápico	15.03	25 142 828	240/322		
Ácido trans-cinámico	25.49	161 949 424	224/278		
Flavonas					
Flavan-3-oles / flavanes					

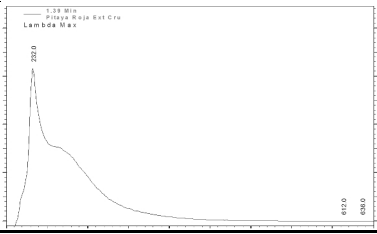
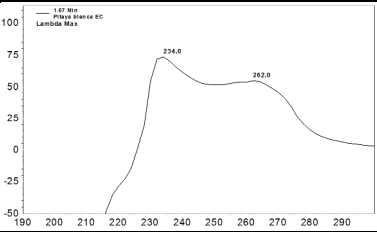
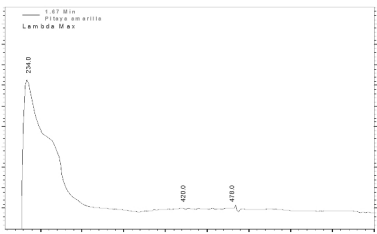
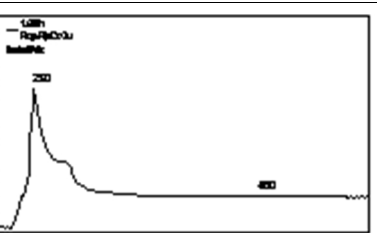
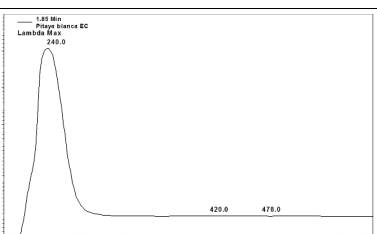
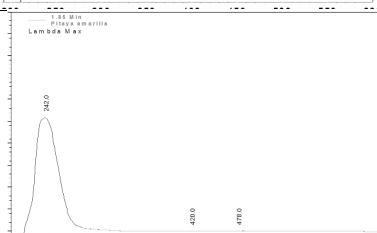
Estándar	tr (min) 260nm	Área _{260nm} [1mg·mL ⁻¹]	λ ₁ / λ ₂ / λ ₃ (nm)	Fórmula	Espectro de absorción
Epicatequina	11.47	7 891 666	238/278		
Flavonoles				 (R=OH, Ogly)	
Rutina hidratada	14.39	72 940 202	240/324		
Miricetina	18.14	32 437 623 (0.2 mg/mL)	264/372		
Quercetina	24.05	177 298 358	266/368		

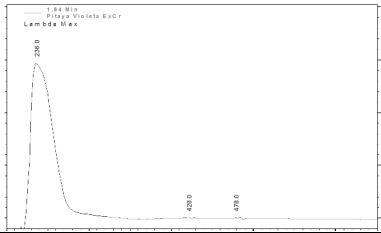
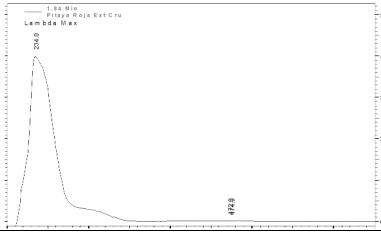
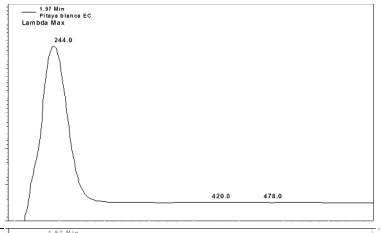
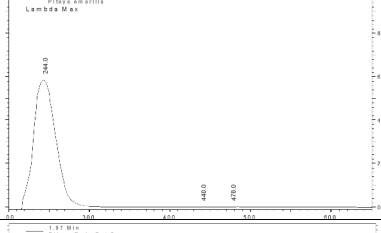
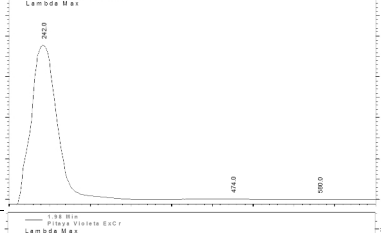
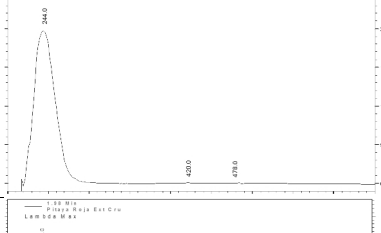
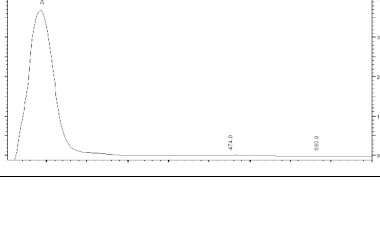
Estándar	tr (min) 260nm	Área _{260nm} [1mg·mL ⁻¹]	λ ₁ / λ ₂ / λ ₃ (nm)	Fórmula	Espectro de absorción
Isorhamnetina	38.13	8 395 745 (0.166 g/ml)	254/372		
Kaempferol	37.63	112 987 500	266/368		
Flavanonas					
Naringina	16.55	22 191 017	234/282/328		
Hesperidina	16.96	5 425 789	234/284/328		

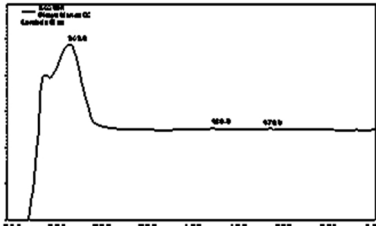
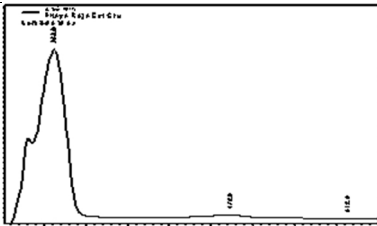
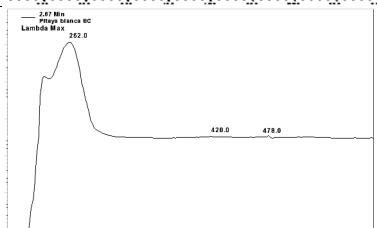
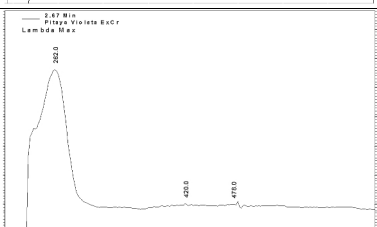
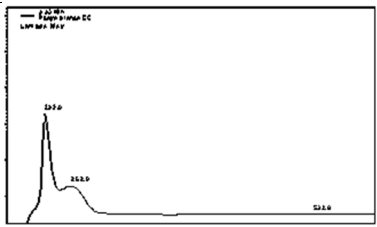
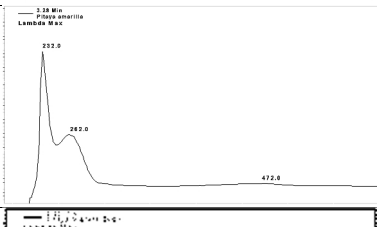
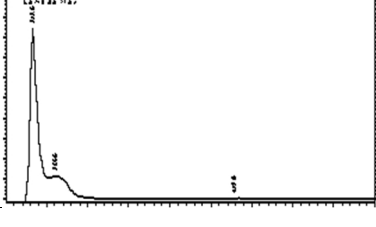
Estándar	tr (min) 260nm	Área _{260nm} [1mg·mL ⁻¹]	λ ₁ / λ ₂ / λ ₃ (nm)	Fórmula	Espectro de absorción
Naringenina	32.60	32 851 359	234/290		
Isoflavonas					
Daidzeina	21.27	59 285 941	248/302		
Cumarinas					
3- acetil cumarina	23.83	20 081 299	234/304		

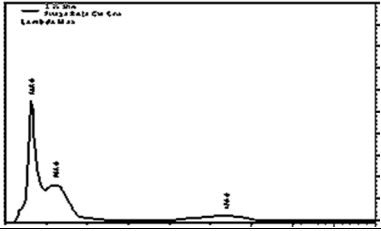
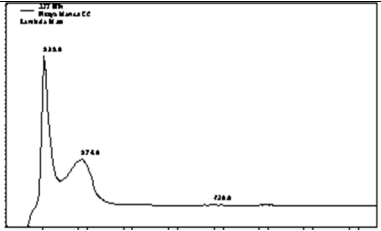
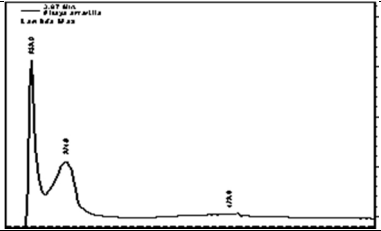
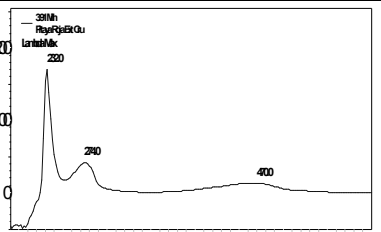
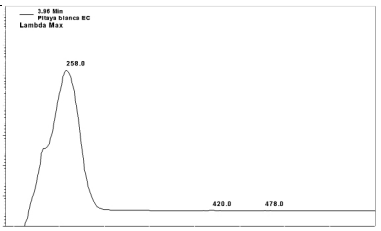
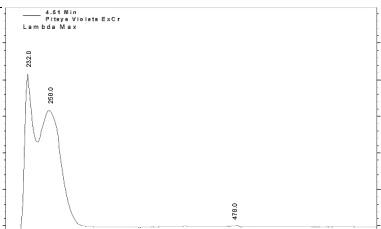
Estándar	tr (min) 260nm	Área _{260nm} [1mg·mL ⁻¹]	$\lambda_1/ \lambda_2/ \lambda_3$ (nm)	Fórmula	Espectro de absorción
Alilbencenos o fenol simple					
Eugenol	38.85	12 899 395	236/282		

Anexo III. Espectros de absorción de señales del extracto crudo.

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{max} (nm)	Espectro	Identificación
1.39	1840099	Roja	232 / 270		Ácido gálico
1.67	634994	Blanca	234 / 262		3,4-dihidroxibenzoico
	553228	Amarilla	234 / 262		Ácido gálico
	834527	Roja	232 / 265		Ácido gálico
1.85	2460993	Blanca	240		Ácido ascórbico
	2715529	Amarilla	242		Ácido ascórbico

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{max} (nm)	Espectro	Identificación
1.84	832824	Violeta	236		Ácido ascórbico
	2158813	Roja	234		Ácido ascórbico
1.97	2894768	Blanca	244		Ácido ascórbico
	3688718	Amarilla	244		Ácido ascórbico
	2473856	Roja	242		Ácido ascórbico
1.98	1302428	Violeta	244		Ácido ascórbico
	732253	Roja	242		Ácido ascórbico

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{\max} (nm)	Espectro	Identificación
2.65	4678103	Blanca	231 / 262		Ácido gálico
	3736843	Roja	235 / 262		Ácido gálico
2.67	855512	Blanca	235 / 262		Ácido gálico
	625222	Violeta	235 / 262		Ácido gálico
3.33	1550442	Blanca	232 / 262		4-hidroxi benzoico
3.28	1433342	Amarilla	232 / 262		4-hidroxi benzoico
3.29	538782	Violeta	232 / 262		4-hidroxi benzoico

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{\max} (nm)	Espectro	Identificación
	1620638	Roja	232 / 262		4-hidroxibenzoico
3.77	894602	Blanca	232 / 274		Ácido siríngico
3.86	667235	Amarilla	232 / 274		Ácido siríngico
3.91	647209	Roja	232 / 274		Ácido siríngico
3.97	5133586	Blanca	232 / 258		4-hidroxibenzoico
4.50	1659700	Violeta	232 / 258		4-hidroxibenzoico

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{max} (nm)	Espectro	Identificación
4.51	1929061	Roja	232 / 258		4-hidroxibenzoico
4.63	1204828	Amarilla	232 / 255		4-hidroxibenzoico
4.61	333707	Violeta	232 / 256		4-hidroxibenzoico
	1064025	Roja	232 / 256		4-hidroxibenzoico

4.81	663169	Amarilla	232 / 286		Naringina
4.80	128525	Violeta	232 / 284		Naringina
	664762	Roja	232 / 284		Naringina

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{\max} (nm)	Espectro	Identificación
4.91	1118191	Blanca	232 / 264		4-hidroxibenzoico

5.13	831298	Amarilla	232 / 262		4-hidroxibenzoico
------	--------	----------	-----------	--	-------------------

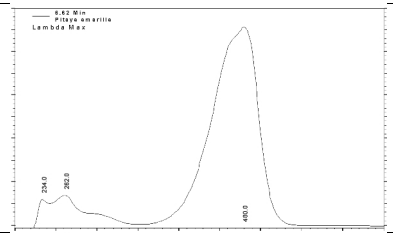
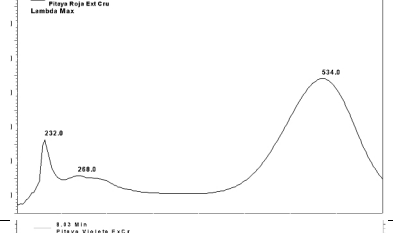
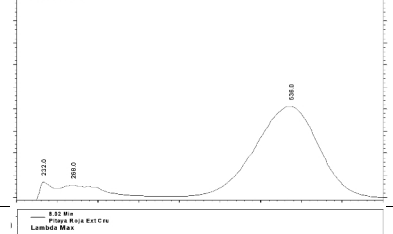
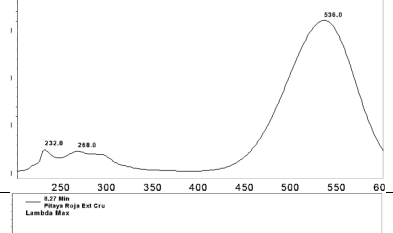
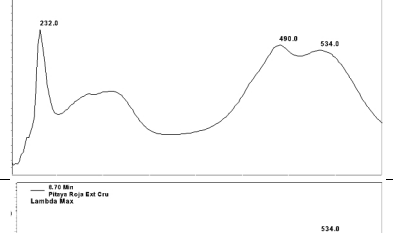
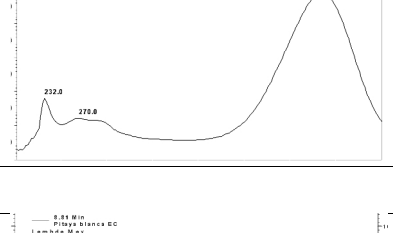
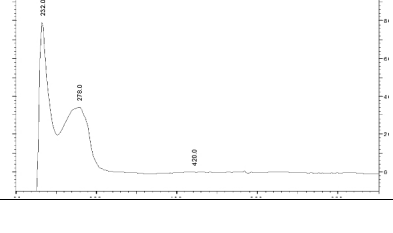
5.12	472426	Violeta	232 / 266		4-hidroxibenzoico
------	--------	---------	-----------	--	-------------------

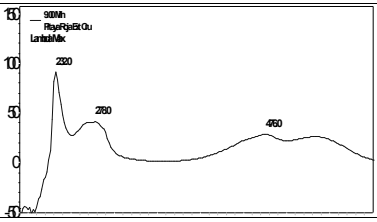
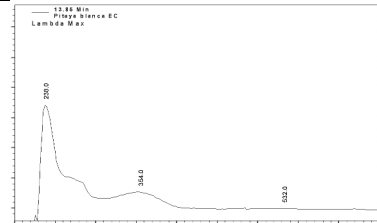
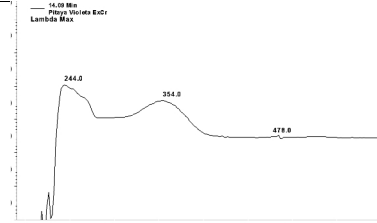
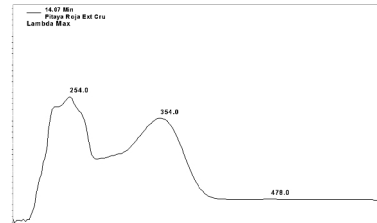
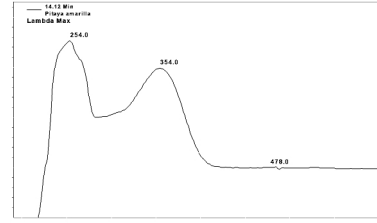
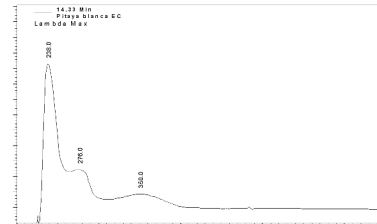
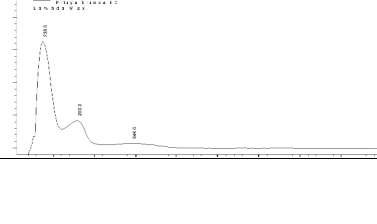
	1410394	Roja	232 / 270		4-hidroxibenzoico
--	---------	------	-----------	--	-------------------

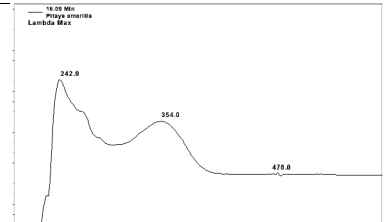
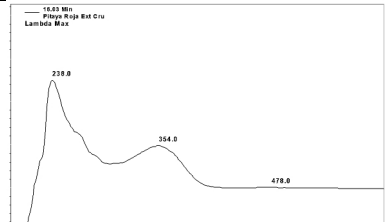
6.28	599998	Amarilla	232 / 262 / 480		Betaxantina
------	--------	----------	-----------------	--	-------------

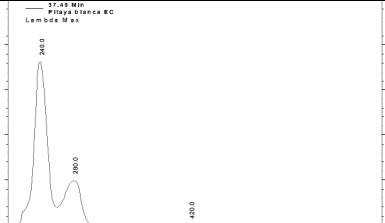
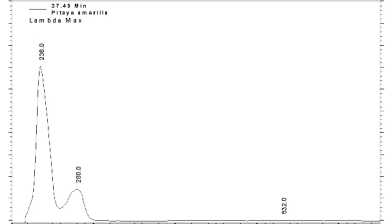
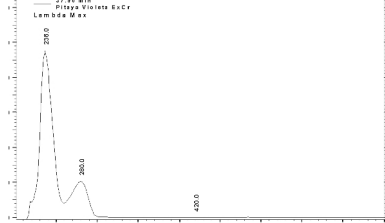
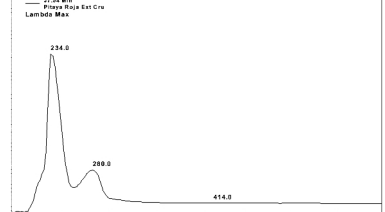
6.25	809150	Roja	232 / 262 / 480		Betaxantina
------	--------	------	-----------------	--	-------------

6.59	6631120	Roja	232 / 262 / 480		Betaxantina
------	---------	------	-----------------	--	-------------

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{\max} (nm)	Espectro	Identificación
6.62	3656368	Amarilla	234 / 262 / 480		Betaxantina
7.17	709691	Roja	232 / 262 / 534		Betacianina
8.03	567243	Violeta	232 / 268 / 536		Betacianina
8.02	2457114	Roja	232 / 268 / 536		Betacianina
8.27	764810	Roja	232 / 490 / 534		Betaxantina / Betacianina
8.70	875607	Roja	232 / 270 / 534		Betacianina
8.81	551191	Blanca	232 / 278		Siríngico

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{max}	Espectro	Identificación
9.00	735102	Roja	232 / 476 / 532		Betaxantina / Betacianina
13.85	602240	Blanca	238 / 354		Síringico
14.09	312456	Violeta	244 / 354		Ácido cafeico
14.07	2224152	Roja	254 / 354		Ácido cafeico
14.12	1582301	Amarilla	254 / 354		Ácido cafeico
14.33	615116	Blanca	238 / 350		Ácido síringico
15.81	1297747	Blanca	238 / 346		Ácido síringico

tr (min)	Área	Pitaya	λ_{\max} (nm)	Espectro	Identificación
16.09	1085423	Amarilla	266 / 354		Ácido cafeico
16.03	1549207	Roja	268 / 354		Ácido cafeico

	5776880	Blanca	240 / 280		Eugenol
37.49	1871210	Amarilla	236 / 280		Eugenol
	2104878	Violeta	236 / 280		Eugenol
37.53	2147084	Roja	234/280		Eugenol

Anexo IV. Resultados del análisis de componentes principales del contenido de compuestos bioactivos en extractos de pitaya *S. stellatus* sometidos a diferentes pretratamientos.

IVa. Pulpa de pitaya roja *S. stellatus* sin semillas.

Análisis de componente principal: Bc, Bx, BT, CFT, CA en pulpa de pitaya

Análisis de los valores y vectores propios de la matriz de correlación

Valor propio	3.5816	1.2356	0.1237	0.0589	0.0002
Proporción	0.716	0.247	0.025	0.012	0.000
Acumulada	0.716	0.963	0.988	1.000	1.000

Valores de cargas en cada variable por componente principal

Variable	PC1	PC2	PC3
Bc	0.441	-0.466	-0.323
Bx	0.510	-0.172	0.254
BT	0.498	-0.296	0.030
CFT	-0.406	-0.534	-0.604
CA	-0.363	-0.616	0.682

Valores de scores para cada muestra por componente principal

Tratamiento	SPC1	SPC2	SPC3
C	0.89299	-0.17602	0.515968
M1	1.64493	-0.38670	0.214083
M2	1.62622	-0.85587	0.479468
U1	1.57734	0.33946	-0.409770
U2	2.02137	-0.68349	-0.649449
U3	2.04554	-0.70744	0.360197
U4	1.73758	0.42084	0.193723
U5	1.48295	0.59111	-0.036181
U6	1.41704	0.55236	-0.220078
U7	1.07045	1.33553	0.073030
E1	-1.14136	-2.18345	-0.074869
E2	-2.23790	-2.60085	-0.117616
E3	-0.52006	0.95413	-0.579366
E4	-1.98291	0.81780	0.051949
E5	-1.47083	0.47623	-0.431672
E6	-3.21779	-0.30319	-0.002011
E7	-2.05526	1.38036	0.264028
E8	-2.89031	1.02919	0.368568

IVb. Pulpa de pitaya roja *S. stellatus* con semillas.

Análisis de componente principal: Bc, Bx, BT, CFT, CA en pulpa con semilla de pitaya

Análisis de los valores y vectores propios de la matriz de correlación

Valor propio	4.1049	0.7602	0.0729	0.0620	0.0000
Proporción	0.821	0.152	0.015	0.012	0.000
Acumulada	0.821	0.973	0.988	1.000	1.000

Valores de cargas en cada variable por componente principal

Variable	PC1	PC2	PC3
Bc	0.463	-0.322	0.616
Bx	0.471	-0.272	-0.652
BT	0.476	-0.299	-0.178
CFT	-0.348	-0.801	0.178
CA	-0.465	-0.303	-0.363

Valores de scores para cada muestra por componente principal

Tratamiento	SPC1	SPC2	SPC3
C	1.92384	0.51617	0.003339
M1	1.85845	0.59973	-0.015735
M2	0.17118	-1.53376	-0.006343
U1	1.58932	0.13455	-0.142043
U2	1.90826	0.05659	-0.091258
U3	1.71735	0.47530	-0.242935
U4	1.97931	-0.30112	-0.016838
U5	1.82931	0.04067	-0.141170
U6	1.87410	-0.02561	-0.096324
U7	1.62764	-0.93837	0.179750
E1	-1.44774	-0.47422	0.105604
E2	-1.39315	-0.38802	0.396973
E3	-1.26878	-0.25940	0.311650
E4	-2.15141	-0.39493	-0.160800
E5	-2.05967	-0.11744	0.369708
E6	-1.57813	2.83872	0.137492
E7	-2.45312	0.00083	0.188304
E8	-4.12678	-0.22969	-0.779375

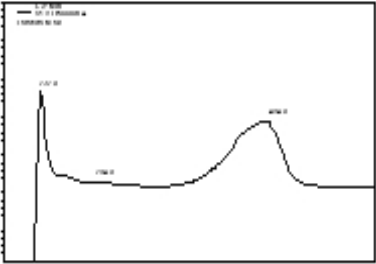
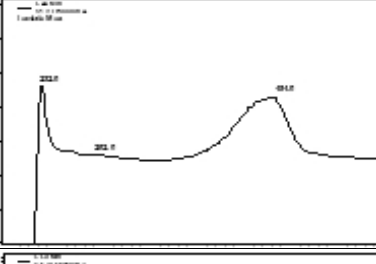
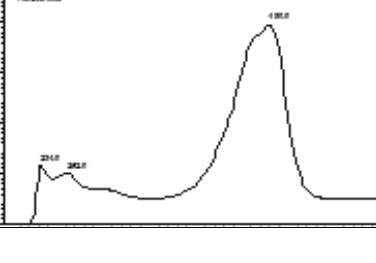
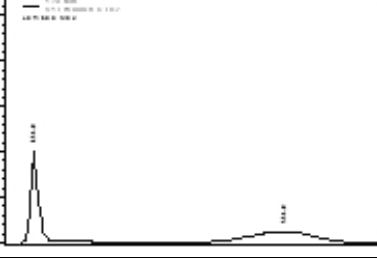
Anexo V. Contenido de pigmentos, compuestos fenólicos totales y valores de capacidad antioxidante en pulpa de pitaya roja *S. stellatus* sometida a diferentes pretratamientos.

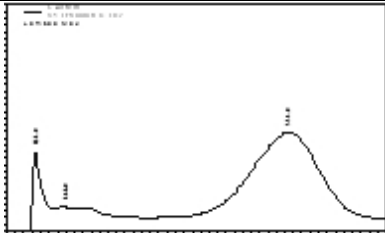
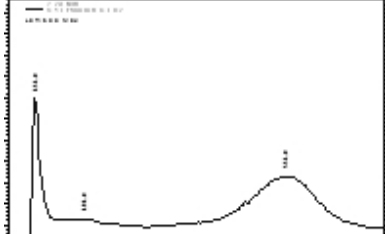
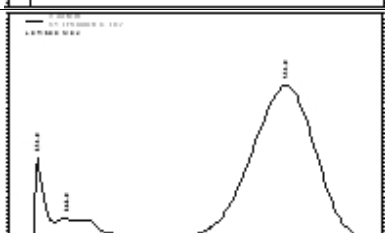
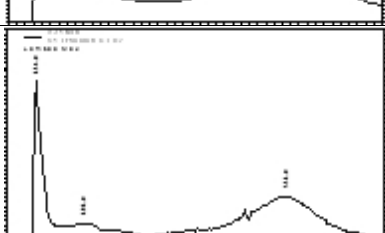
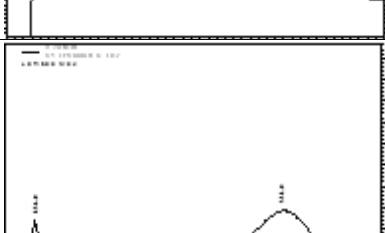
Pigmentos (Bc, Bx y BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) en extractos de pitaya aplicando un diseño factorial 2².

Variable	Control (C)	Ultrasonido (U)	Pectinasa (PC)	Ultrasonido + Pectinasa (UPC)
Bc (PS) (mg 100 g ⁻¹)	171.37 ± 4.67 ^C	195.12 ± 1.55 ^A	178.80 ± 2.09 ^B	181.26 ± 3.01 ^B
Bx (PS) (mg 100 g ⁻¹)	194.74 ± 5.12 ^B	219.79 ± 1.50 ^A	149.53 ± 2.11 ^C	149.13 ± 4.89 ^C
BT (Bc + Bx) (PS) (mg 100 g ⁻¹)	366.12 ± 9.79 ^B	414.92 ± 2.89 ^A	327.96 ± 4.01 ^C	330.39 ± 7.69 ^C
CFT (PS) (mg EAG 100 g ⁻¹)	473.57 ± 8.67 ^C	542.68 ± 13.04 ^B	842.50 ± 46.19 ^A	803.91 ± 20.20 ^A
CA (PS) (μmol ET g ⁻¹)	52.74 ± 3.57 ^B	54.88 ± 2.27 ^B	86.54 ± 0.62 ^A	89.30 ± 0.54 ^A

Media ± DE, n = 3, diferentes superíndices significan diferencias entre pretratamientos, PS: peso seco.

Anexo VI. Espectros de absorción de las betalainas de pitaya roja *S. stellatus*.

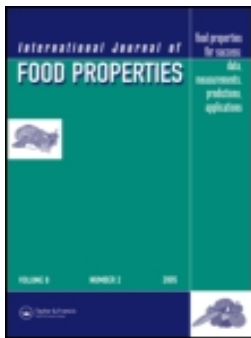
tr (min)	Área	λ_{\max} (nm)	Espectro	Identificación
Fracción A				
6.3	548393 (486 nm)	232 / 484		Betaxantinas
6.4	30657 (486 nm)	232 / 484		Betaxantinas
6.6	8034149 (486 nm)	234 / 262 / 480		Betaxantinas
7.2	7385	-----	-----	-----
8.0	18349	-----	-----	-----
8.7	5484	-----	-----	-----
Fracción B				
1.7	3000849	234 / 534		Betacianinas

tr (min)	Área	λ_{\max} (nm)	Espectro	Identificación
6.4	647458	232 / 268 / 534		Betacianinas
7.2	313871	232 / 292 / 532		Betacianinas
8.0	1323828	234 / 268 / 534		Betacianinas
8.3	85234	234 / 292 / 532		Betacianinas
8.7	448833	236 / 268 / 532		Betacianinas

En tres señales de la fracción A (con tiempos de retención de: 7.2, 8.0 y 8.7 min) no fue posible observar los espectros de absorción.

Anexo VII. Artículo 1

Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis




Comparative Analysis of Betalain Content in Stenocereus Stellatus Fruits and Other Cactus Fruits Using Principal Component Analysis

María Guadalupe Pérez-Loredo, Felipe García-Ochoa & Blanca E. Barragán-Huerta


To cite this article: María Guadalupe Pérez-Loredo, Felipe García-Ochoa & Blanca E. Barragán-Huerta (2016) Comparative Analysis of Betalain Content in Stenocereus Stellatus Fruits and Other Cactus Fruits Using Principal Component Analysis, International Journal of Food Properties, 19:2, 326-338, DOI: [10.1080/10942912.2015.1022259](https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1022259)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2015.1022259>

 View supplementary material 

 Accepted author version posted online: 18 May 2015.
Published online: 18 May 2016.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 44

 View related articles 

 View Crossmark data 

Comparative Analysis of Betalain Content in *Stenocereus Stellatus* Fruits and Other Cactus Fruits Using Principal Component Analysis

María Guadalupe Pérez-Loredo¹, Felipe García-Ochoa², and Blanca E. Barragán-Huerta¹

¹Departamento de Ingeniería en Sistemas Ambientales, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico

²Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Santo Tomás, Mexico

Stenocereus stellatus fruits from Puebla, Mexico, with red, purple, yellow, and white pulp were characterized regarding their total betalain content, and physicochemical properties. The total betalain content was 856.07–2968 μg per gram of pulp dry weight. Using principal component analysis, the levels of pigments in *S. stellatus* fruits were compared with 32 samples from other cactus fruits. As a result, three confidence intervals for total betalain content ($\mu\text{g g}^{-1}$) were calculated: low (<1208), medium (2935–3288), and high (4488–9248). Thus, the cactus fruits can be categorized as a poor, good, and excellent source of betalain pigments.

Keywords: *Stenocereus stellatus*, Antioxidant capacity, Ascorbic acid, Betalain, Principal component analysis.

INTRODUCTION

In the food industry, pigments are used to standardize the appearance foods when there are natural variations in raw products, to correct the color loss that occurs during processing, or to make some foods more attractive (e.g., beverage and confectionery) in order to encourage their consumption.^[1] The most used synthetic pigments are those that impart a yellow and red tinge to foods, but only two yellow pigments (FD and C Yellow 5 and FD and C Yellow 6) and 2 red pigments (FD and C 3 and FD and C 40) were approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for use in foods.^[2] There is an increasing concern about the use of synthetic dyes because some of them have shown carcinogenic effects on laboratory animals.^[3] Hence, consumers are looking for more natural food products. Anthocyanins and betalains are natural pigments present in some fruits or vegetables and have been proposed as substitutes of red synthetic colorants; thus, intensive research has been recently done on the potential sources

Received 29 September 2014; accepted 19 February 2015.

Address correspondence to Blanca E. Barragán-Huerta, Departamento de Ingeniería en Sistemas Ambientales, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Av. Wilfrido Massieu, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, D.F. 07738, Mexico. E-mail: bbarraga59@yahoo.com or bbarraganh@ipn.mx

of these pigments.^[4–7] In addition to their tinctorial properties, the natural pigments possess antioxidant, anticancer, and antimicrobial properties.^[8] Research into cactus fruits has been growing because they are a promising source of phytochemicals and pigments (such as betalains) for the food industry.^[9] The fruits of *Opuntia*^[10,11] and *Hylocereus*^[12,13] are the most studied sources of bioactive compounds from cacti. The fruits of the *Stenocereus* genus, commonly named pitayas, are another source of pigments. Pitayas are cherished by the local people due to the delicious taste and a variety of attractive colors. Geographical distribution of the *Stenocereus* genus is limited to the American continent, with a great diversity of species; some of them are endemic to Central Mexico.^[14] Recently, a few studies on the fruits of *S. griseus* and *S. pruinosus* regarding their antioxidant capacity (AC), total phenolic compounds (TPC), betalains, and minerals^[4,15] have been published, but the research into the functional properties of *S. stellatus* has been scarce.

To our knowledge, the nutrient composition, AC, TPC, pigment content, and color properties of white-, yellow-, purple-, and red-pulp types of fruits of *S. stellatus* from the State of Puebla, Mexico, have not been reported. Therefore, in this work, we evaluated those parameters. Furthermore, using principal component analysis (PCA), the pigment content values of *S. stellatus* fruits were compared with that reported in the literature for fruits of other cacti.

PCA is a statistical tool that allows a researcher to group variables into subsets that are relatively independent from one another. Accumulated variables, called principal components (PCs), represent underlying processes responsible for a relationship among variables in the original dataset.^[16] This methodology has been used for differentiation of food products on the basis of geographical distribution^[17] and levels of bioactive compounds^[18] and for identification of food adulteration.^[19] In the present work, PCA was used to differentiate 4 types of *S. stellatus* fruits by color parameters and by the level of ascorbic acid (AA), AC, TPC, and pigments.

PCA was also used in this work to analyze the concentration of total betalains (TB), betaxanthin (Bx), and betacyanin (Bc) in the *S. stellatus* fruits and to compare these data with those reported for fruits of other genera—*Stenocereus*, *Opuntia*, and *Hylocereus*—to distinguish different groups based on those characteristics and thereby, to find confidence intervals (CI) for cactus fruits with high, medium, and low pigment content. This way, we evaluated the potential of *S. stellatus* fruits as a source of food colorants.

MATERIALS

Chemicals

All the reagents used here were of analytical grade. Gallic acid, ABTS [2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline 6-sulphonic acid)], Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), AA, and 2,6-dichloroindophenol sodium salt were obtained from Sigma-Aldrich (Mexico).

Plant Material

The *S. stellatus* fruits were collected in Santiago Tonahuiztla Puebla (18° 12' 5.35" N latitude, 97° 53' 50.75" W longitude) during the harvest season from August to September 2013. **Figure 1** shows the plant of pitaya (*S. stellatus*) and the four types of fruits analyzed in this work. The collected fruits weighed between 76.22 and 100.58 g and were 5.05 to 6.08 cm long, with a diameter 5.04 to 5.77 cm. Samples of yellow- and red-pulp fruits of *S. pruinosus* were collected for betalain analysis, in the same area of production in May 2014.

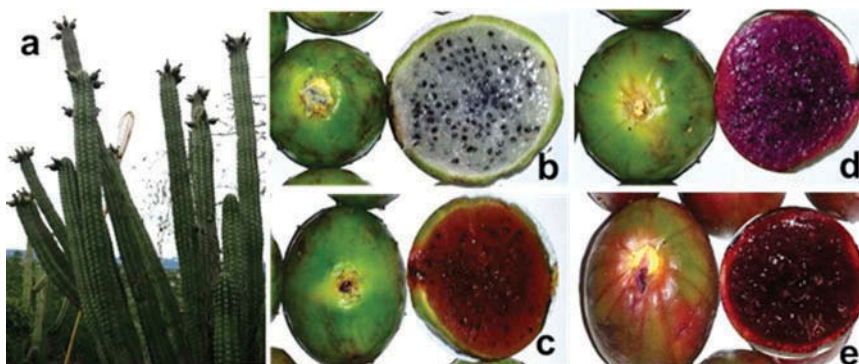


FIGURE 1 (a) The *S. stellatus* cactus and its fruits: white (b), yellow (c), purple (d), and (e) red pitayas.

METHODS

Sample Selection and Preparation

Healthy fruits without blemishes or bumps were selected, and their spines were removed. After that, the fruits were packaged in polyethylene bags under vacuum and stored at -20°C until analysis. Prior to the analysis the samples was thawed at 4°C for 24 h; the skin of the fruit was removed, and the pulp was sieved through $710\text{-}\mu\text{m}$ mesh (No. 25) to homogenize the pulp and to eliminate the seeds.

Proximate Analysis

The Kjeldahl method was used to quantify total nitrogen (AOAC method 920.152); the protein concentration was estimated using the nitrogen factor of 6.25. Fat was measured by means of extraction with petroleum ether using a Soxhlet apparatus (AOAC method 920.39). Water content was determined according to the loss of weight of the sample after drying in an oven at 110°C (AOAC method 934.06); ash content was calculated by heating the sample at 550°C to constant weight (AOAC method 942.05). Crude fiber was determined based on acidic and alkaline digestion (AOAC method 962.09). Reducing sugars (RS), and total RS (carbohydrates) were quantified using the Lane-Eynon volumetric method (AOAC method 923.09). All assays were performed in triplicate, and the results were expressed as a percentage of fresh weight (FW).

Physicochemical Analysis

All assays of fruit pulp were performed according to the official methods of the AOAC.^[20] The soluble solids (SS) were quantified using an ABBE refractometer (AOAC method 932.12) and expressed as $^{\circ}\text{Brix}$. Acidity was measured by titration (AOAC method 942.15) and expressed as malic-acid content. The pH levels were measured using a pH-meter (Denver Instrument UB-10 Colorado, USA; AOAC method 981.12).

Color Measurements

Twenty-five grams of homogenized fruit pulp without seeds was placed in the colorimeter sample container. The color parameters L^* , a^* , and b^* were measured using the colorimeter (Hunter Lab CFEZ1005, Virginia, USA) with a measuring area of 8 mm, D65 illuminant, and a 10° observer

angle against a white background. The hue angle (H°) and Chroma (C^*) values were calculated using Eqs. 1 and 2:^[21]

$$H^\circ = \tan^{-1} \left[\frac{b^*}{a^*} \right] \quad (1)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (2)$$

Preparation of the Extracts of the *S. stellatus* Fruits

A portion (2.5 g) of the homogenized fruit pulp was added to 5 mL of a methanol:water mixture (80:20), and the suspension was placed in 50-mL test tubes with screw caps. These suspensions were vortexed for 1 min at the maximum speed and then centrifuged at $1010 \times g$ for 20 min. The supernatant was kept, and extraction of the remaining solid was repeated one more time under the same conditions to extract most of the bioactive compounds from the fruit pulp. The resulting extracts were placed in a 10-mL volumetric flask, and the full volume of the tubes was filled with the methanol:water mixture (80:20) to obtain methanolic extracts (ME). These extracts were used for measurement of TPC and AC and for acquisition of absorption spectra. Aqueous extracts (WE) were prepared as described above using distilled water as a solvent to quantify TB, Bx, and Bc.

Absorption Spectra of the ME Extracts

An absorbance scan of ME extracts was performed between 190 and 700 nm on a UV-Vis spectrophotometer (HACH DR 5000, Mexico, Mexico).

Quantification of TPC

Four hundred microliters of ME extracts was mixed with 3 mL of distilled water, 200 μ L of the Folin-Ciocalteu reagent solution, and 400 μ L of a 20% sodium carbonate solution.^[22] The mixture was vortexed for 30 s and kept in the dark for 30 min at $20 \pm 2^\circ\text{C}$; the absorbance was measured at 765 nm. TPC values were presented as a milligram of a gallic acid equivalent (GAE) per gram of dry weight (DW) of pulp.

AC by the ABTS Antioxidant Assay

The radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was generated by incubating an ABTS solution (7 mM) with potassium persulfate (2.45 mM).^[23] The mixture was allowed to stand in the dark for 16 h before use. One milliliter of the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical solution was diluted with 100 mL of 0.01 M potassium phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, to attain absorbance of approximately 0.7 ± 0.02 (mean \pm SD) at 734 nm. A 200- μ L aliquot of ME was taken and added to 3.8 mL of the ABTS radical solution; the mixture was vortexed for 10 s and was allowed to stand in the dark for 7 min at $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Its absorbance was measured at 734 nm (A_t). A blank for each sample was 200 μ L of methanol (its absorbance, A_0 , at 734 nm was measured). The percentage of radical inhibition was calculated and interpolated using a calibration curve of 3–20 μ M Trolox. The results were expressed as μ moles of Trolox equivalent (TE) per gram of pulp DW.

Pigment Quantification

Bx and Bc content of the WE extracts was quantified by measuring their absorbance^[24] at 538 and 483 nm, respectively, on a spectrophotometer UV-Vis (Hach DR5000, Mexico, Mexico). Bx and Bc concentrations were calculated using Eq. 3. TB was calculated by adding up Bx and Bc.

$$B = \frac{(A \times DF \times MW \times V)}{(\varepsilon \times P \times L)} \quad (3)$$

where, B = Bc or Bx expressed in milligrams of betanin or indicaxanthin per 100 grams of pulp DW; A = absorbance at 538 nm for Bc and at 483 nm for Bx; DF = dilution factor; MW = molecular weight (betanin 550 g·mol⁻¹ and indicaxanthin 308 g·mol⁻¹); V = volume of the extract (mL); ε = the molar extinction coefficient (betanin = 60,000 L·[mol·cm]⁻¹ and indicaxanthin = 48,000 L·[mol·cm]⁻¹); P = the amount of a sample (g); L = the length of the cell (1 cm). The results were expressed as μg per gram of pulp DW.

AA

The xylene extraction method was used.^[25] One gram of a sample was added to 10 mL of 3% H₃PO₃, and the suspension was vortexed for 1 min and centrifuged at 1010 × g for 20 min. A 400 μL aliquot of the supernatant was added to 400 μL of 3.04 M acetate buffer pH 4.0, 600 μL of a 0.0007 M 2,6-dichloroindophenol solution, and 3 mL of xylene. The mixture was stirred for 10–15 s; after that, the xylene phase was separated and its absorbance was measured at 520 nm using xylene as a blank sample. A calibration curve for AA was constructed and tested under similar conditions. The results were expressed in milligrams of AA per gram of pulp DW.

Statistical Analysis

The assays of the *S. stellatus* samples were performed in triplicate. The data were expressed as mean \pm standard deviation (SD), and then analysis of variance (ANOVA) was performed and the least significant difference ($p < 0.05$) to compare the means. PCA was used to explore the relationships among the 4 types of pitayas with respect to their physicochemical properties (pH, acidity, L*, a*, b*, AC, and concentrations of Bc, Bx, TB, TPC, AA, carbohydrates [CHO], and RS).

In this work, the variables were standardized by units of SD. The standardized data of each sample were then subjected to PCA. This way, the data could be reduced to a set of new latent variables called PCs. The loadings represented the relative contribution of each variable in the PCs, and the score values showed the location of each sample within a PC.^[26] The relationship between the variables and samples was shown in PCA graphs.

Values of Bc, Bx, and TB content reported in the literature from 2006 to 2013 for 30 types of fruits of the genera *Opuntia*, *Hylocereus*, and *Stenocereus* from several countries were collected and compared with those obtained in the present work for *S. stellatus* and *S. pruinosus* using PCA. To standardize the pigment content data on the DW basis, average moisture content of 84.47% for *Opuntia* and 89.99% for *Hylocereus* was assumed when it was necessary. The graphs showed the grouping of the samples by pigment content. In addition, a grouping of the samples was performed by Bc, Bx, and TB content in intent-to-propose CIs.^[27] Data processing was performed in the Minitab 16 (Minitab Inc., Pennsylvania, USA) and Unscrambler X software (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate Analysis of *S. stellatus* Fruits

Demand for cactus fruits has been increasing worldwide due to their delicious taste and nutritional properties. Nonetheless, many of them are consumed regionally; therefore, they have not been well characterized. The pitayas of *S. stellatus* are cultivars whose economic importance is high in semiarid regions of the State of Puebla, Mexico, but the nutrient composition of these fruits is unknown. In this work, the composition of white, red, yellow, and purple types of pitayas was determined (Table 1) in order to determine the contribution of these fruits to the dietary intake of various nutrients by the consumer and to encourage their consumption and utilization. The water content (85.39–86.65%) and total carbohydrate content (9.65–10.85%) were the main components in *S. stellatus* analysis, and they were similar to other fruits from *Stenocereus* genera^[4,28] and other fruit plants, such as apples, apricots, oranges, and cactus pears.^[29]

Physicochemical Characterization

Physicochemical properties of fruits, such as SS and acidity are related to their ripeness and may become a harvest or quality index.^[30] A good balance among pH, sugars, and titratable acidity is necessary for optimal taste. It was suggested that a sugar:acid ratio between 10:1 and 18:1 is indicative of a good taste and acceptability of a fruit.^[31] In the present study, sugar:acid ratios for *S. stellatus* fruits ranged from 12 to 20; this finding means that the pitayas have a pleasant sweet-sour taste. Our titratable acidity values are higher than those reported for *S. pruinosus*, *S. queretaroensis*,

TABLE 1
Proximate analysis, physicochemical characteristics, and color properties of white, yellow, purple, and red types of *S. stellatus* fruits in Mexico

Variable	SSWM	SSYM	SSPM	SSRM
Proximate analysis (FW)				
Moisture (%)	86.58 ± 0.02 ^{AB}	85.39 ± 0.12 ^C	86.65 ± 0.13 ^A	86.43 ± 0.07 ^B
Carbohydrates (%)	9.82 ± 0.00 ^B	10.85 ± 0.00 ^A	9.65 ± 0.02 ^C	9.82 ± 0.00 ^B
Reducing Sugars (%)	6.46 ± 0.09 ^A	4.81 ± 0.15 ^C	5.31 ± 0.18 ^B	4.33 ± 0.27 ^D
Protein (%)	1.08 ± 0.02 ^B	1.23 ± 0.14 ^A	1.30 ± 0.02 ^A	1.29 ± 0.06 ^A
Lipids (%)	0.47 ± 0.03 ^A	0.49 ± 0.06 ^A	0.47 ± 0.08 ^A	0.39 ± 0.04 ^A
Crude fiber (%)	1.63 ± 0.00 ^A	1.58 ± 0.06 ^A	1.39 ± 0.00 ^B	1.58 ± 0.00 ^A
Ash (%)	0.48 ± 0.01 ^D	0.58 ± 0.01 ^A	0.55 ± 0.00 ^B	0.53 ± 0.01 ^C
Physicochemical analysis				
Soluble solids (°Brix)	9.73 ± 0.30 ^A	9.53 ± 0.50 ^A	9.60 ± 0.20 ^A	9.67 ± 0.11 ^A
Titratable acidity (% malic acid)	0.81 ± 0.06 ^A	0.57 ± 0.15 ^B	0.50 ± 0.09 ^B	0.48 ± 0.05 ^B
pH	3.37 ± 0.01 ^D	3.59 ± 0.02 ^B	3.64 ± 0.01 ^A	3.48 ± 0.02 ^C
Color measurements				
Lightness (<i>L</i> *)	67.3 ± 0.9 ^A	26.8 ± 1.0 ^B	13.9 ± 1.9 ^C	12.6 ± 0.6 ^C
<i>a</i> *	2.2 ± 0.1 ^D	33.9 ± 1.1 ^A	29.9 ± 2.5 ^B	24.4 ± 2.2 ^C
<i>b</i> *	22.0 ± 0.7 ^B	33.3 ± 3.1 ^A	-1.5 ± 0.4 ^D	8.7 ± 1.5 ^C
Hue angle (<i>H</i> °)	84.3 ± 0.2 ^A	44.4 ± 1.9 ^B	2.9 ± 1.1 ^C	19.4 ± 1.6 ^D
Chroma (<i>C</i> *)	22.1 ± 0.7 ^C	47.5 ± 2.9 ^A	30.0 ± 2.4 ^B	25.9 ± 2.6 ^{BC}

The data are presented as a mean of 3 measurements ± SD (*p* < 0.05);

Different superscript letters indicate significant differences among fruit types;

White (SSWM), yellow (SSYM), purple (SSPM), and red type (SSRM). SS: *S. stellatus*; W: white; Y: yellow; P: purple; R: red; M: Mexico; FW: fresh weight.

or *O. ficus-indica* fruits.^[4,31] The pH of the pulp samples was acidic (3.37–3.64); this situation enhances their microbiological stability. These values are higher than those reported for *Opuntia* and *Hylocereus* fruits.^[31]

Color Properties

The chromatic parameters L^* , a^* , b^* , H^o , and C^* of the pulp of *S. stellatus* fruits from Puebla, Mexico, showed significant differences ($p < 0.05$) among fruit types (Table 1). The purple and red pitayas were darker (lower L^* value) than the other fruit types. Hue angle values for pitaya pulp were in the yellowish-reddish region, but the purple pitaya had a lower H^o value and a higher a^*/b^* ratio, indicative of stronger coloration.^[32] The values of L^* , H^o , and C^* of the yellow and red *S. stellatus* fruits were similar to those reported by García-Cruz et al.^[4] for *S. pruinosus* orange ($L^* = 25.7$, $H^o = 28.9$, Chroma = 35.0) and red fruits ($L^* = 19.4$, $H^o = 19.8$, Chroma = 24.7).

Absorption Spectra

Cactus fruits frequently contain mixtures of betalains and Bxs with diverse structures, according to spectrophotometric and mass-spectrometric analysis.^[24] Analysis of absorption curves of pitaya extracts showed differences in the UV-Vis profile among all samples (Online Resource 1). In the ultraviolet (UV) region, a maximum peak (λ_1) was displayed at 218, 220, 224, and 228 nm for purple, yellow, white, and red fruit samples, respectively. The pulp of SSWM pulp is colorless and it did not show absorbance in the visible spectrum region. In contrast, SSRM, SSYM, and SSPM samples displayed a second peak (λ_2) at 484, 484, and 490 nm, respectively, which are characteristic wavelengths of Bx. Additionally, both SSRM and SSPM displayed a third peak (λ_3) at 536 nm, which matched Bc pigments. Nonetheless, the λ_2/λ_3 ratio was indicative of changes in the tinge of each type of fruit.^[31] The highest λ_2/λ_3 ratio in SSYM suggested that the fruit tinge is yellow-orange and demonstrated that Bxs predominate in its pulp. In contrast, the lowest λ_2/λ_3 ratio was in SSPM, meaning that Bcs are the predominant pigments there.

TPC, AA, Pigments, and AC of *S. stellatus* Pulp

The results on the bioactive compounds of pitaya pulp are shown in Table 2. There were significant differences ($p < 0.05$) in AC, AA, and pigment content among fruit types. The biological functions of betalains, phenolic compounds, and AA are centered mainly on their antioxidant properties:

TABLE 2

Total phenolic content (TPC), antioxidant capacity (AC), pigments, and ascorbic-acid (AA) content of *Stenocereus stellatus* fruits with white (SSWM), yellow (SSYM), purple (SSPM), and red pulp (SSRM)

Variable	SSWM	SSYM	SSPM	SSRM
TPC, AC, Pigments and AA (DW)				
Total Phenols (mg GAE g ⁻¹)	4.47 ± 0.96 ^A	3.72 ± 0.89 ^A	4.48 ± 0.59 ^A	5.79 ± 0.87 ^A
ABTS assay (μmol TE g ⁻¹)	128.69 ± 11.94 ^A	85.39 ± 3.29 ^B	57.20 ± 3.79 ^C	109.67 ± 15.00 ^{AB}
Bc (μg betanin g ⁻¹)	nd	135.2 ± 3.5 ^C	538.3 ± 26.7 ^B	1457.2 ± 55.2 ^A
Bx (μg indicaxanthin g ⁻¹)	nd	928.7 ± 11.9 ^B	277.8 ± 18.8 ^C	1511.3 ± 62.2 ^A
TB ^a (Bc + Bx; μg g ⁻¹)	nd	1063.6 ± 8.4 ^B	856.1 ± 64.2 ^C	2968.6 ± 117.4 ^A
Ascorbic acid (mg AA g ⁻¹)	4.11 ± 0.17 ^A	3.05 ± 0.26 ^B	3.12 ± 0.27 ^B	2.61 ± 0.07 ^B

The data are means of three measurements ± SD ($p < 0.05$);

^aWater was used as extraction and reference solvent. Different letters represent significant differences among fruit types; SS: *S. stellatus*; W: white; Y: yellow; P: purple; R: red; M: Mexico; nd: not detected; DW: dry weight.

They protect to the humans from various chronic diseases that have their origins in oxidative stress. The principal source of these compounds is fruits and vegetables; therefore, high concentrations of these nutrients are desirable. The fruits in this study contain the lowest amounts of TPC than what was reported for different berries, with values between 25 and 84.8 mg GAE g⁻¹ DW.^[33] TPC of *S. stellatus* pitayas is higher than that reported for *Hylocereus* and *S. griseus* and for prickly pear fruits from the USA^[4,15,24,35–38] (Table 3).

AC of pitayas (determined using the ABTS method) was similar to that reported by Gorinstein et al.^[33] for berries (80–620 μM TE per g DW), except for SSPM; and higher compared to prickly pear fruits^[4,15,24,35–38] (Table 3). The highest AA content was found in SSWM fruits (4.11 mg per g pulp DW), Table 2. The AA values for *S. stellatus* were in agreement with those reported by Ruiz et al.^[34] for calafate fruits (1.36–4.89 mg·g⁻¹).

PCA of Physicochemical Properties of *S. stellatus* Fruits

PCA was used to identify any possible clusters within the analyzed pitaya samples. The scores of the first three PCs for four pitaya cultivars are presented in Fig. 2. Four classes were separated well (Fig. 2a), corresponding to SSWM (white), SSYM (yellow), SSPM (purple), and SSRM (red) pitaya. The first three PCs accounted for 95.70% of the total variation (PC1: 59.70%; PC2: 24.00%; PC3: 12.00%).

The clustering was most likely caused by small-to-medium differences in many factors: pH, acidity, *L**, *a**, *b**, Bc, Bx, TB, TPC, AA, CHO, RS, and AC but not by large differences any individual parameter. Therefore, the four pitaya cultivars could be effectively specified by PCA. Figure 2 shows a 3-dimensional plot of these PCs.

Figure 2b illustrates the relationship between the variables and the cultivars. The PC plot clearly discriminated two groups (Fig. 2a): samples with pigments (SSRM, SSPM, and SSYM) and without pigments (SSWM). Not surprisingly, TB, Bc, and Bx were clustered together on the positive area of PC1, as was TPC.

SSRM was closer than SSYM and SSPM to TB, Bc, and Bx, indicating that SSRM has the highest betalain content. As expected, the colorless SSWM was the furthest of these points and closer to *L**. Moreover, SSWM was closer to AA, RS, and acidity (negative PC1, positive PC2), meaning that white pitayas are sweeter and more acidic fruits containing a higher concentration of AA than do the other *S. stellatus* cultivars.

Grouping of Cactus Fruits in PCA by Pigment Content

Because of some technological disadvantages of beetroot (*Beta vulgaris*) as a source of betalains, cactus fruits of the genera *Opuntia* and *Hylocereus* have been proposed as an alternative natural food pigment source. As demonstrated in our study, *S. stellatus* fruits are rich in pigments and antioxidants and could be used to obtain red pigments. Concentrations of phytochemicals (including pigments) in fruits depended mainly on the genus, species, ripeness, cultivar (strain), season, and growth region of the plant. Comparison of reported pigment content data is a difficult task because there are no standard extraction or analysis methods or a standard way to present the results. Nonetheless, the Bx, Bc, and TB data of 35 types of cactus fruits of *Stenocereus* and other genera from different regions of the world^[4,15,24,35–38] (Table 3) were tested using PCA in order to group these cactus fruits by their pigment content. Additionally, CIs for sample grouping on the basis of the pigment content were proposed in order to determine the usefulness of *S. stellatus* as a betalain source.

Figure 3 shows a 2-dimensional plot of 2 PCs (PCs: PC1: 82.2% and PC2: 17.8%) that explained 100% of the data variability. The structure of PC loadings (PCL) showed that the highest content of Bc was in the lower right area (PCL1: 0.55; PCL2: -0.669), corresponding to the

TABLE 3
Pigments, total phenolic compounds (TPC), and antioxidant capacity (AC) of cactus fruits from different countries

ID	Fruit	Bc DW (μg betanin g^{-1})	Bx DW (μg indicaxanthin g^{-1})	TB DW (Bc + Bx; μg g^{-1})	TPC DW (mg GAE g^{-1})	ABTS DW ($\mu\text{mol TE}$ g^{-1})	References
Mexico							
1	SSYM	135.2 \pm 3.5	928.7 \pm 11.9	1063.6 \pm 8.4 ^a	3.7 \pm 0.9	85.4 \pm 3.2	This work
2	SSPM	538.3 \pm 26.7	277.8 \pm 18.8	856.1 \pm 64.2 ^a	4.5 \pm 0.6	57.2 \pm 3.7	
3	SSRM	1457.2 \pm 55.2	1511.3 \pm 62.2	2968.6 \pm 117.4 ^a	5.8 \pm 0.9	109.7 \pm 15.0	
4	SPYM	377.8 \pm 2.2	3195.5 \pm 18.6	3573.4 \pm 68.7 ^a	9.4 \pm 0.2	74.1 \pm 0.5	[15]
5	SPRM	3448.9 \pm 33.8	4646.1 \pm 76.5	8095.0 \pm 17.0 ^a	9.1 \pm 0.2	117.9 \pm 5.9	
6	SGOM	376.0 \pm 75.4	1773.7 \pm 301.8	2149.7 \pm 377.2	0.5 \pm 0.0	nr	[4]
7	SGRM	1996.0 \pm 14.3	1476.1 \pm 182.1	3473.0 \pm 209.8	1.6 \pm 0.1	nr	
8	SPYM	470.0 \pm 222.0	2670.0 \pm 270.0	3140.0 \pm 492.0	1.2 \pm 0.2	735.4 \pm 111.6	[24]
9	SPRM	2860.0 \pm 380.0	3210.0 \pm 560.0	6070.0 \pm 940.0	1.6 \pm 0.2	1090.6 \pm 152.8	
10	ORRM	5290.0 \pm 350.0	2860.0 \pm 240.0	8150.0 \pm 590.0	nr	nr	[24]
11	ORRM	2060.0 \pm 60.0	990.0 \pm 30.0	3050.0 \pm 90.0	nr	nr	
12	OTRM	2040.0 \pm 200.0	1040.0 \pm 90.0	3080.0 \pm 290.0	nr	nr	[24]
13	OFRM	710.0 \pm 40.0	440.0 \pm 30.0	1150.0 \pm 70.0	nr	nr	
14	OFPM	390.0 \pm 30.0	140.0 \pm 10.0	530.0 \pm 40.0	nr	nr	[24]
15	OFRM	270.0 \pm 10.0	230.0 \pm 20.0	500.0 \pm 30.0	nr	nr	
16	OMOM	65.0 \pm 10.0	160.0 \pm 20.0	225.0 \pm 30.0	nr	nr	[24]
17	OFYM	72.0 \pm 1.0	140.0 \pm 20.0	212.0 \pm 21.0	nr	nr	
18	OFYM	71.0 \pm 1.0	410.0 \pm 20.0	481.0 \pm 21.0	nr	nr	[24]
19	OAWM	50.0 \pm 20.0	120.0 \pm 10.0	170.0 \pm 30.0	nr	nr	
Spain							
20 ^{b,d}	OFRS	978.7 \pm 51.5	1635.5 \pm 122.3	2614.3 \pm 174.0	14.1 \pm 0.2	43.1 \pm 4.7	[35]
21 ^{b,d}	OSRS	5157.7 \pm 360.6	nr	5157.7 \pm 360.6	13.2 \pm 0.3	38.5 \pm 1.5	
22 ^{b,d}	OURS	1584.0 \pm 135.2	1146.2 \pm 58.0	2730.2 \pm 193.2	10.6 \pm 0.2	10.2 \pm 2.6	
Argentina							
23 ^b	OMYA	70.8 \pm 5.8	103.0 \pm 6.4	173.7 \pm 12.2	3.5 \pm 0.6	nr	[36]
24 ^b	OMOA	115.9 \pm 6.4	341.3 \pm 26.0	457.2 \pm 32.0	6.4 \pm 0.6	nr	
25 ^b	OPPA	2073.4 \pm 115.6	965.9 \pm 90.2	3039.3 \pm 203.0	7.7 \pm 0.4	nr	
26 ^b	OPIA	373.5 \pm 19.3	302.6 \pm 19.3	676.1 \pm 38.6	5.1 \pm 0.6	nr	
27 ^b	OFPA	2215.1 \pm 90.2	901.5 \pm 77.3	3116.5 \pm 167.4	7.1 \pm 0.6	nr	
28 ^b	OFPA	1802.1 \pm 77.3	759.8 \pm 64.4	2562.8 \pm 141.7	5.8 \pm 0.6	nr	
29 ^b	OFGA	5.1 \pm 0.6	19.1 \pm 1.9	25.1 \pm 2.6	3.9 \pm 0.6	nr	
United States							
30 ^b	OF GU	0.4 \pm 0.0	1.7 \pm 0.1	2.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	14.4 \pm 0.6	[37]
31 ^b	OF OU	31.9 \pm 0.2	368.5 \pm 1.8	400.3 \pm 2.0	1.2 \pm 0.1	14.9 \pm 0.2	
32 ^b	OF RU	540.9 \pm 2.0	306.0 \pm 0.9	846.9 \pm 2.8	1.5 \pm 0.1	16.7 \pm 2.1	
33 ^b	OF PU	2026.6 \pm 4.9	920.4 \pm 2.0	2946.1 \pm 6.9	3.1 \pm 0.2	23.4 \pm 1.7	
Taiwan							
34 ^c	HP RT	1101.9 \pm 219.8	nr	1101.9 \pm 219.8	4.2 \pm 0.0	nr	[38]
Belgium							
35 ^c	HP RB	1651.3 \pm 17.0	nr	1651.34 \pm 17.0	1.6 \pm 0.0	nr	[6]

The values are mean \pm SD;

ID: sample identification;

SS: *Stenocereus stellatus*; SP: *S. pruinosus*; SG: *S. griseus*; OR: *Opuntia robusta*; OT: *O. streptacantha*; OF: *O. ficus-indica*; OM: *O. megacantha*; OA: *O. albicarpa*; OS: *O. stricta*; OU: *O. undulata*; OP: *Opuntia spp.*; HP: *Hylocereus polyrhizus*; W: white; Y: yellow; P: purple; R: red; O: orange; I: pink; G: green; M: Mexico; S: Spain; A: Argentina; U: United States; T: Taiwan; B: Belgium; DW: dry weight; nr: not reported;

^aWater was used as extraction and reference solvent;

^bdata expressed in DW based on water content 84.47%;

^cdata expressed in DW based on water content 89.99%;

^dwhole fruit.

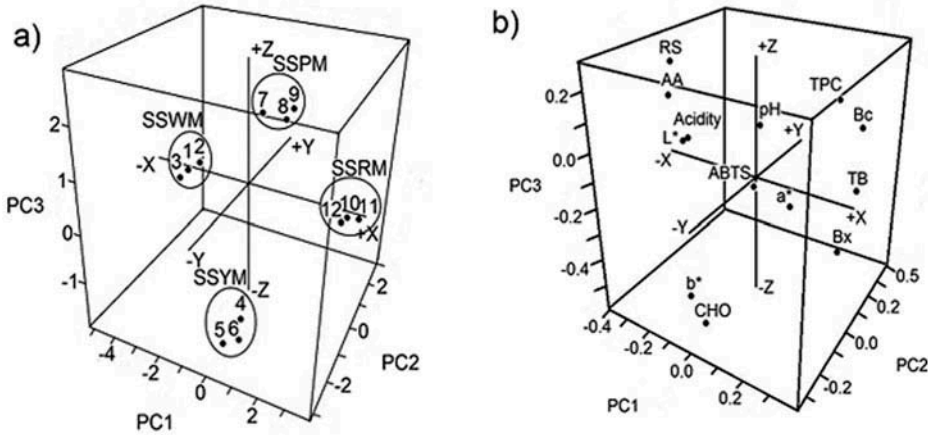


FIGURE 2 Three-dimensional plots of the principal components PC1, PC2, and PC3 for (a) scores of the samples; (b) loadings of the variables. SS: *Stenocereus stellatus*; W: white; Y: yellow; P: purple; R: red.

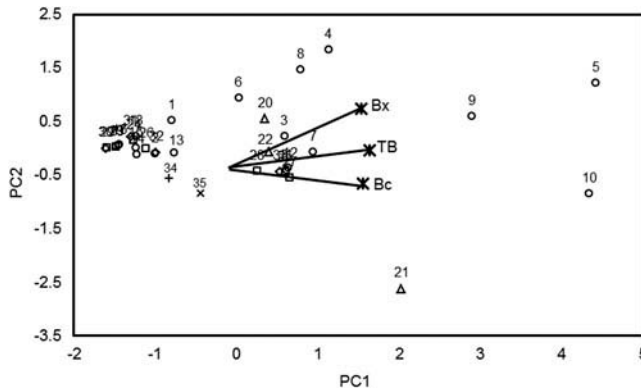


FIGURE 3 A 2-dimensional plot of the principal components PC1 and PC2 for scores and loadings of principal component analysis (PCA) regarding pigment content of cactus fruits. Numbers represent the ID of a sample.

samples ORRM and OSRS from Mexico and Spain, respectively. The samples with the highest Bx content were in the upper right area (PCL1: 0.533; PCL2: 0.742) corresponding to samples 4 (SPYM), 5 (SPRM), and 9 (SPRM) from Mexico (Fig. 3, Table 3). Consequently, the samples with the highest TB were on the right-hand side (PCL1: 0.639, PCL2: -0.038) matching the samples ORRM, SPRM, and SPRM from Mexico and OSRS from Spain. The 95% CIs for low, medium, and maximum levels of Bc, Bx, and TB are shown in Table 4.

As a result, the cactus fruits can be classified as a poor, good, and excellent source of TB, Bc, or Bx if the pigment content is low, medium, or high, respectively. Eighty-three percent of the samples were within Bc and TB levels. Only 73% of the samples were consistent with the proposed Bx levels. This relatively poor matching of Bx data could be due to overestimation of this kind of pigments during their spectrophotometric analysis.^[31] It is likely, however, that there is a good agreement of the reported data with the proposed CIs. Only 14% of the samples were between the minimum and medium TB levels and 3% were between the medium and maximum TB levels.

TABLE 4
Confidence intervals for the sample grouping by pigment content

Range	Bc ($\mu\text{g betanin g}^{-1}$)	Bx ($\mu\text{g indicaxanthin g}^{-1}$)	TB (Bc + Bx; $\mu\text{g g}^{-1}$)
Low	<693.86	<615.98	<1208.98
Medium	1874.70–2686.00	1727.40–2742.20	2935.30–3288.3
High	5059.60–5388.10	2776.70–4591.10	4488.30–9248.10

According to this notion, the betalain content of red fruits of *S. stellatus* (Sample 3) and yellow fruits of *S. pruinosus* (Sample 4) from Puebla, Mexico, can be considered a good source of betalains because they are near the medium level, whereas the red fruit of *S. pruinosus* (Sample 5) from the same crop area can be considered an excellent source of betalains because it is near the high TB level.

CONCLUSIONS

S. stellatus fruits from Puebla, Mexico, contain bioactive compounds with antioxidant properties, which are important for human nutrition to combat oxidative stress and the related diseases. Although the four types of fruits analyzed are from the same genus, species, and production location, each cultivar has specific characteristics according to PCA analysis. Statistical analysis of TB, Bx, and Bc data for cactus fruits of several species of the genera *Opuntia*, *Hylocereus*, and *Stenocereus*, including those obtained in this work, allowed us to calculate CIs for the reported pigment concentration data and thereby, to classify the cactus fruits as a poor, good, or excellent pigment source. The type of cultivar is the characteristic that allowed categorizing the cactus fruits regarding their pigment content. In this case, the origin of the cultivars was not significant to classify them. According to this notion, the betalain content of red fruits of *S. stellatus* and yellow fruits of *S. pruinosus* from Puebla, Mexico, can be considered a good source of betalains. Red-pulp fruits of *S. pruinosus* from the same crop area can be considered an excellent source of betalains.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Oscar Rene López-Mendiola for assistance with the gathering of fruits and Luis Enrique Ruíz-Molina for assistance in the identification of fruits species.

FUNDING

The present research was financially supported by the Instituto Politécnico Nacional (Project SIP-20141275) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project CB-2011-01-169779). M.G. Pérez-Loredo received a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

REFERENCES

- Downham, A.; Collins, P. Colouring Our Foods in the Last and Next Millennium. *International Journal of Food Science and Technology* **2000**, *35*, 5–22.
- Food and Drug Administration. Additives Approved for Use in Human Food. <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm> (accessed July 10, 2014).

3. Tsuda, S.; Murakami, M.; Kano, K.; Taniguchi, K.; Sasaki, Y.F. DNA Damage Induced by Red Food Dyes Orally Administered to Pregnant and Male Mice. *Toxicological Science* **2001**, *61*, 92–99.
4. García-Cruz, L.; Valle-Guadarrama, S.; Salinas-Moreno, Y.; Joaquín-Cruz, E. Physical, Chemical, and Antioxidant Activity Characterization of Pitaya (*Stenocereus Pruinosis*) Fruits. *Plant Foods for Humans Nutrition* **2013**, *68*, 403–410.
5. Abeorubad, A. A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources As Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences* **2011**, *6*(1), 71–78.
6. Liaotrakoon, W.; De Clercq, N.; Van Hoed, V.; Van de Walle, D.; Lewille, B.; Dewettinck, K. Impact of Thermal Treatment on Physicochemical, Antioxidative, and Rheological Properties of White-Flesh and Red-Flesh Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) Purees. *Food Bioprocess Technology* **2013**, *6*, 416–430.
7. Haj Koubaier, H.B.; Snoussi, A.; Essaidi, I.; Moncef Chaabouni, M.; Thonart, P.; Bouzouita, N. Betalain and Phenolic Compositions, Antioxidant Activity of Tunisian Red Beet (*Beta Vulgaris* L. *Conditiva*) Roots and Stems Extracts. *International Journal of Food Properties* **2014**, *17*(9), 1934–1945.
8. Khan, M.I.; Sri Harsha, P.S.C.; Giridhar, P.; Ravishankar, G.A. Pigment Identification, Nutritional Composition, Bioactivity, and In Vitro Cancer Cell Cytotoxicity of *Rivina Humilis* L. Berries, Potential Source of Betalains. *LWT—Food Science and Technology* **2012**, *47*, 315–323.
9. Hounsome, N.; Hounsome, D.; Tomos, D.; Edwards-Jones, G. Plant Metabolites and Nutritional Quality of Vegetables. *Journal of Food Science* **2008**, *73*(4), R48–R65.
10. Osorio-Esquivel, O.; Ortiz-Moreno, A.; Álvarez, V.B.; Dorantes-Álvarez, L.; Giusti, M.M. Phenolics, Betacyanins, and Antioxidant Activity in *Opuntia Joconostle* Fruits. *Food Research International* **2011**, *44*, 2160–2168.
11. Yeddes, N.; Kalthoum Chérif, J.; Guyot, S.; Baron, A.; Trabelsi-Ayadi, M. Phenolic Profile of Tunisian *Opuntia Ficus Indica* Thornless Form Flowers via Chromatographic and Spectral Analysis by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-UV-Photodiode Array and Electrospray Ionization-Mass Spectrometer. *International Journal of Food Properties* **2014**, *17*(4), 741–751.
12. Woo, K.K.; Ngou, F.H.; Ngo, L.S.; Soong, W.K.; Tang, P.Y. Stability of Betalain Pigment from Red Dragon Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*). *American Journal of Food Technology* **2011**, *6*(2), 140–148.
13. Moshfeghi, N.; Mahdavi, O.; Shahhosseini, F.; Malekifar, S.; Taghizadeh, S.K. Introducing a New Natural Product from Dragon Fruit into the Market. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences* **2013**, *15*(2), 269–272.
14. Casas, A.; Valiente-Banuet, A.; Rojas-Martínez, A.; Dávila, P. Reproductive Biology and the Process of Domestication of the Columnar Cactus *Stenocereus Stellatus* in Central Mexico. *American Journal of Botany* **1999**, *86*(4), 534–542.
15. García-Cruz, L.; Salinas-Moreno, Y.; Valle-Guadarrama, S. Betalains, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Pitaya de Mayo (*Stenocereus Griseus* H.). *Revista Fitotecnia Mexicana* **2012**, *35*(5), 1–5.
16. Sainani, K.L. Introduction to Principal Components Analysis. *Physical Medicine and Rehabilitation* **2014**, *6*(3), 275–278.
17. Soares de Andrade, R.H.; Samara do Nascimento, L.; Elias Pereira, G.; Hallwass, F.; Silveira Paim, A.P. Anthocyanin Composition of Brazilian Red Wines and Use of HPLC-UV-Vis Associated to Chemometrics to Distinguish Wines from Different Regions. *Microchemical Journal* **2013**, *110*, 256–262.
18. Koley, T.K.; Singh, S.; Khemariya, P.; Sarkar, A.; Kaur, C.; Chaurasia, S.N.; Naika, P.S. Evaluation of Bioactive Properties of Indian Carrot (*Daucus carota* L.): A Chemometric Approach. *Food Research International* **2014**, *60*, 76–85.
19. Santos, G.J.; Barros, M.; Fernandes, P.; Pires, P.; Bardsley, R. Principal Component Analysis of Proteolytic Profiles As Markers of Authenticity of PDO Cheeses. *Food Chemistry* **2013**, *136*, 1526–1532.
20. AOAC *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry*; Helrich K. Ed.; 15th ed. Association of Official Analytical Chemists Inc.: Arlington, Virginia, USA; 1990; 1298 pp.
21. Kha, T.C.; Nguyen, M.H.; Roach, P.D. Effects of Spray Drying Conditions on the Physicochemical and Antioxidant Properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) Fruit Aril Powder. *Journal of Food Engineering* **2010**, *98*, 385–392.
22. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* **1999**, *299*, 152–178.
23. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*, 1231–1237.
24. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 5758–5764.
25. Ranganna, S. Xylene Extraction Method. In: *Handbook of Analysis and Quality for fruits and Vegetable Products*; Ranganna, S. Ed.; 2nd ed. McGraw Hill: New Delhi, India, 1986; 107–110.

26. Braga, C.M.; Zielinski, A.A.F.; Silva, K.M.D.; Souza, F.K.F.D.; Pietrowski, G.D.A.M.; Couto, M.; Granato, D.; Wosiacki, G.; Nogueira, A. Classification of Juices and Fermented Beverages Made from Unripe, Ripe, and Senescent Apples Based on the Aromatic Profile Using Chemometrics. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 967–974.
27. Kara, D. Evaluation of Trace Metal Concentrations in Some Herbs and Herbal Teas by Principal Component Analysis. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 347–354.
28. Campos-Rojas, E.; Pinedo-Espinoza, J.M.; Campos-Montiel, R.G.; Hernández-Fuentes, A.D. Evaluation of Pitaya Plants (*Stenocereus* spp) of Natural Populations of Monte Escobedo, Zacatecas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* **2011**, *17*(3), 173–182.
29. USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods> (accessed July 10, 2014).
30. Wanitchang, J.; Terdwongworakul, A.; Wanitchang, P.; Noypitak, S. Maturity Sorting Index of Dragon Fruit: *Hylocereus Polyrhizus*. *Journal of Food Engineering* **2010**, *100*, 409–416.
31. Stintzing, F.C.; Schieber, A.; Carle, R. Evaluation of Colour Properties and Chemical Quality Parameters of Cactus Juices. *European Food Research and Technology* **2003**, *216*, 303–311.
32. Voća, S.; Žlabur, J.S.; Dobričević, N.; Jakobek, L.; Šeruga, M.; Galić, A.; Plietić, S. Variation in the Bioactive Compound Content at Three Ripening Stages of Strawberry Fruit. *Molecules* **2014**, *19*, 10370–10385.
33. Gorinstein, S.; Arancibia-Avila, P.; Toledo, F.; Namiesnik, J.; Leontowicz, H.; Leontowicz, M.; Ham, K.S.; Kang, S.G.; Vearasilp, K.; Suhaj, M. Application of Analytical Methods for the Determination of Bioactive Compounds in Some Berries. *Food Analytical Methods* **2013**, *6*, 432–444.
34. Ruiz, A.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Mardones, C.; Vergara, C.; Herlitz, E.; Vega, M.; Dorau, C.; Winterhalter, P.; Von Baer, D. Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis Microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 6081–6089.
35. Fernández-López, J.A.; Almela, L.; Obón, J.M.; Castellar, R. Determination of Antioxidant Constituents in Cactus Pear Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition* **2010**, *65*, 253–259.
36. Coria, C.Y.S.; Ochoa, M.J.; Nazareno, M.A. Health-Promoting Substances and Antioxidant Properties of *Opuntia* sp. Fruits. Changes in Bioactive-Compound Contents during Ripening Process. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 514–519.
37. Stintzing, F.C.; Herbach, K.M.; Mobhammer, M.R.; Carle, R.; Yi, W.; Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Bunch, R.; Felker, P. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 442–451.
38. Wu, L.C.; Hsu, H.W.; Chen, Y.C.; Chiu, C.C.; Lin, Y.I.; Ho, J.A. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Red Pitaya. *Food Chemistry* **2006**, *95*, 319–327.

Anexo VIII. Artículo 2

Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos

Extraction of red pitaya (*Stenocereus stellatus*) bioactive compounds applying microwave, ultrasound and enzymatic pretreatments

EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE PITAYA ROJA (*Stenocereus stellatus*) APLICANDO PRETRATAMIENTOS CON MICROONDAS, ULTRASONIDO Y ENZIMÁTICOS

EXTRACTION OF RED PITAYA (*Stenocereus stellatus*) BIOACTIVE COMPOUNDS APPLYING MICROWAVE, ULTRASOUND AND ENZYMATIC PRETREATMENTS

María G. Pérez-Loredo, Lourdes Hernández-De Jesús, Blanca E. Barragán-Huerta*

Departamento de Ingeniería en Sistemas Ambientales, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Avenida Wilfrido Massieu, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, D.F. 07738, México. (bbarraga59@hotmail.com) (bbarraganh@ipn.mx)

RESUMEN

La demanda de aditivos naturales en alimentos ha aumentado en años recientes. La pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) se puede usar como fuente de betalainas y compuestos fenólicos, pero no existen informes sobre la extracción de estos compuestos usando estos frutos. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los pretratamientos por microondas, ultrasonido y enzimáticos en el aumento de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalainas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y la capacidad antioxidante (CA) en los extractos de pulpa con y sin semillas del fruto de *S. stellatus*. El diseño experimental fue completamente al azar y los resultados se analizaron mediante un ANDEVA y un análisis de componentes principales (ACP). La mayor concentración de compuestos bioactivos se obtuvo utilizando la pulpa sin semillas y, para esta muestra, el pretratamiento con ultrasonido por 15 min aumentó ($p \leq 0.05$) la cantidad de Bc, Bx y BT 13.5, 12.7 y 13.1 % respecto al testigo. La aplicación de pectinasa al 0.5 % aumentó ($p \leq 0.05$) los valores de CFT en un 109.7 % y CA en 102.6 %. El pretratamiento con ultrasonido maximizó el contenido de pigmentos (480.3 mg BT 100 g⁻¹ de pulpa seca) y con 0.5 % pectinasa, 2 h, 40 °C, pH 4.0 se maximizó el contenido de CFT (804.5 mg equivalentes de ácido gálico 100 g⁻¹ de pulpa seca) y la CA (4925.7 mg equivalentes de Trolox g⁻¹ de pulpa seca). De acuerdo con el ACP existe una relación directa entre el contenido de CFT y la CA de la pitaya roja *S. stellatus*. Por lo tanto, se concluye que el uso combinado de los tratamientos de ultrasonido y pectinasa maximiza la extracción de compuestos bioactivos de la pitaya.

ABSTRACT

In recent years, the demand for natural food additives has increased. Although they can be used as a source of betalains and phenolic compounds, there is no information about the extraction of these compounds from red pitayas (*Stenocereus stellatus*). Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of microwave, ultrasound, and enzymatic pretreatments in the increase of betacyanins (Bc), betaxanthins (Bx), total betalains (TB), total phenolic compounds (TPC), and antioxidant capacity (AC) in the extracts of *S. stellatus* fruit pulp (with and without seeds). The experimental design was completely randomized and the results were analyzed using ANOVA and Principal Components Analysis (PCA). The highest concentration of bioactive compounds was obtained using seedless pulp. In this sample, 15 min ultrasound pretreatment increased ($p \leq 0.05$) the amount of Bc, Bx, and TB by 13.5, 12.7, and 13.1 %, respectively, in relation to control. The application of 0.5 % pectinase increased ($p \leq 0.05$) TPC and AC values by 109.7 %, and 102.6 %, respectively. The ultrasound pretreatment maximized the pigment content (480.3 mg TB 100 g⁻¹ dry pulp) and with 0.5 % pectinase, 2 h, 40 °C, pH 4.0, the TPC content was maximized (804.5 mg equivalents of Gallic acid 100 g⁻¹ dry pulp), as well as the AC (4925.7 mg equivalents of Trolox g⁻¹ dry pulp). According to the PCA, there is a direct relation between the red pitaya *S. stellatus* TPC and AC content. Therefore, we conclude that the combined use of ultrasound and pectinase treatments maximizes the extraction of bioactive compounds from the pitaya.

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2016. Aprobado: diciembre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 135-151. 2017.

Key words: extraction, *Stenocereus stellatus*, betalain, ultrasound, microwaves, enzymatic.

Palabras clave: Extracción, *Stenocereus stellatus*, betalainas, ultrasonido, microondas, enzimáticos.

INTRODUCCIÓN

La pitaya (*Stenocereus stellatus*) se consume como producto fresco y no se encontraron estudios sobre la aplicación de este fruto en productos industrializados que permitan su explotación comercial. La obtención de extractos de pitaya con concentraciones altas de compuestos bioactivos puede ayudar a superar este inconveniente al permitir su aprovechamiento como fuente de pigmentos y antioxidantes para la industria de los alimentos.

Las investigaciones en frutos del género *Stenocereus*, o pitayas, son escasas. García-Cruz *et al.* (2012) y García-Cruz *et al.* (2013) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante, betalainas y minerales en pitayas *S. griseus* y *S. pruinosus*, respectivamente. Pérez-Loredo *et al.* (2016) clasificaron como pobres, buenas y excelentes fuentes de betalainas a los frutos de 30 cactáceas de diversos géneros, e indican que los frutos rojos de *S. stellatus* de Puebla, México, son una buena fuente de pigmentos. Para extraer betalainas de frutos de *Opuntia* se usa el fruto sin semillas, aunque éstas contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante que la pulpa (Morales *et al.*, 2012). Esto sugiere que sería más conveniente usar el fruto completo para obtener la mayor cantidad posible de compuestos bioactivos.

Las semillas del fruto de la pitaya son pequeñas y frágiles, durante la maceración de la fruta se rompen fácilmente y le confieren un color oscuro a la pulpa macerada, lo cual puede afectar la extracción de los pigmentos. Las semillas representan 31 % en peso de la fracción comestible de la pitaya y si son separadas de la pulpa podrían eliminarse del extracto algunos componentes bioactivos de la fruta. Por lo tanto, es necesario determinar el efecto de la presencia de semillas en los rendimientos de extracción de pigmentos y otros compuestos de interés.

Los frutos de cactáceas son fuente de diversos fitoquímicos, en especial pigmentos, por lo cual hay varios estudios sobre frutos de cactáceas para establecer las mejores condiciones para su extracción y aplicación. Los frutos más estudiados como fuente de compuestos bioactivos son del género *Hylocereus*

INTRODUCTION

The pitaya (*Stenocereus stellatus*) is consumed as a fresh product. No studies were found about its application in industrialized products that would enable its commercial exploitation. Obtaining pitaya extracts with high bioactive compounds concentrations may help to overcome this disadvantage by allowing its exploitation as a source of pigments and anti-oxidants for the food industry.

Research on *Stenocereus* genus fruits (pitayas) is limited. García-Cruz *et al.* (2012) and García-Cruz *et al.* (2013) evaluated the content of total phenolic compounds, antioxidant capacity, betalains, and minerals in *S. griseus* and *S. pruinosus* pitayas. Pérez-Loredo *et al.* (2016) classified the fruits of 30 cactaceous from different genera as poor, good, and excellent sources of betalains. According to this study, the *S. stellatus* red fruits from Puebla, Mexico, are a good source of pigments. Seedless *Opuntia* fruits are used to extract betalains, although seeds contain more total phenolic compounds and antioxidant capacity than the pulp (Morales *et al.*, 2012). This suggests that it would be more convenient to use the whole fruit to obtain the largest possible number of bioactive compounds.

Pitaya seeds are small and fragile; they break easily during the fruit maceration, and give a dark color to the macerated pulp, which can affect pigment extraction. Weight-wise, the seeds represent 31 % of the pitaya's edible fraction and, if they are separated from the pulp, some fruit bioactive compounds could be removed from the extract. Therefore, we need to determine the effect of the seeds' presence on the extraction performance of the pigments and other compounds of interest.

Cactaceae fruits are the source of various phytochemicals (particularly pigments); for that reason, there are several studies about Cactaceae fruits in order to establish the best extraction and application conditions. The most studied fruits as a bioactive compounds source belong to the *Hylocereus* (Naderi *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2011) and *Opuntia* genera (Prakash and Manikandan, 2012; Cejudo-Bastante *et al.*, 2015).

Conventional extraction methods (maceration, reflux, or Soxhlet extraction) require long extraction times, their performances are low, and their energy

(Naderi *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2011) y *Opuntia* (Prakash y Manikandan, 2012; Cejudo-Bastante *et al.*, 2015).

Los métodos de extracción convencionales (maceración, reflujo o extracción Soxhlet) requieren tiempos largos de extracción, los rendimientos son bajos y el consumo energético es alto, pero son populares porque son fáciles de operar y el costo es bajo (Yang *et al.*, 2011). Los métodos de extracción no convencionales son más amigables con el medio ambiente porque reducen el uso de químicos y el tiempo de extracción, además mejoran el rendimiento y la calidad del extracto. Los métodos de ultrasonido, pulsos eléctricos, digestión enzimática, extrusión, microondas y fluidos supercríticos se usan para mejorar el rendimiento y la selectividad de la extracción de compuestos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013).

El ultrasonido es un tipo especial de onda sonora, su frecuencia de 20-100 MHz está más allá de la audición humana, y al igual que otras ondas comprime y expande el material expuesto. Al aplicar ultrasonido se favorece la difusión a través de la pared celular y el lavado del contenido celular una vez que las células están rotas (Azmir *et al.*, 2013). El ultrasonido se ha estudiado para extraer pigmentos naturales de betabel y otras fuentes vegetales (Sivakumar *et al.*, 2009).

Las microondas son campos electromagnéticos en un rango de frecuencia de 300 Mhz a 300 GHz. Alupului *et al.* (2012) propusieron tres etapas secuenciales de la extracción asistida por microondas: 1) separación de los solutos de los sitios activos de la matriz debido al incremento de temperatura y presión, 2) difusión del disolvente a través de la matriz y, 3) liberación de solutos de la matriz al disolvente. La extracción con microondas se estudia para obtener polifenoles en cáscara de cítricos (Nayak *et al.*, 2015), como pretratamiento en la extracción de astaxantina de *Phaffia rhodozyma* (Villalobos-Castillejos *et al.*, 2013) y en la extracción de betalainas de betabel (Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

La adición de celulasa, α -amilasa y pectinasa mejora la extracción de algunos compuestos bioactivos al romper las paredes celulares e hidrolizar estructuras de polisacáridos donde se encuentran enlazados (Puri *et al.*, 2012). Además de la composición, concentración y tipo de enzima, otros factores como el tamaño de partícula de los materiales vegetales, la

consumption is high, but they are popular because they are easy to operate and they are economical (Yang *et al.*, 2011). Non-conventional extraction methods are more environmentally-friendly, because they reduce the use of chemicals and the extraction time, and they also improve the extract's performance and quality. Methods such as ultrasound, electrical pulses, enzymatic digestion, extrusion, microwaves, and supercritical fluids are used to improve the performance and selectivity of bioactive compounds extraction (Azmir *et al.*, 2013).

Ultrasound is a special kind of sound wave: its 20-100 MHz frequency is beyond human hearing, and —like other waves— it compresses and expands the exposed material. When ultrasound is used, the breaking down of the cells contributes to the diffusion through the cell wall and the cell content washing (Azmir *et al.*, 2013). Other studies have considered the use of ultrasound to extract natural pigments from beetroot and other vegetal sources (Sivakumar *et al.*, 2009).

Microwaves are electromagnetic fields with a frequency range of 300 MHz to 300 GHz. Alupului *et al.* (2012) proposed three sequential stages for microwave assisted extraction: 1) solutes separation from the matrix' active sites, due to temperature and pressure increase; 2) solvent diffusion through the matrix and, 3) solutes release, from the matrix to the solvent. Microwave extraction has been studied to obtain polyphenols in citrus peels (Nayak *et al.*, 2015), as pretreatment in the extracion of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* (Villalobos-Castillejos *et al.*, 2013), and the extraction of betalains from beetroot (Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

The addition of cellulase, α -amylase, and pectinase improves the extraction of some bioactive compounds, because it breaks down cell walls and hydrolyzes the polysaccharide structures that connect them (Puri *et al.*, 2012). Besides the enzyme composition, concentration, and kind, other factors —such as the particle size of the plant materials, the solid-water ratio, and the hydrolysis time— also affect the extraction process (Azmir *et al.*, 2013). The enzymatic hydrolysis has been studied in order to extract phenolic compounds from grape residues (Gómez-García *et al.*, 2012), raspberry solid residues (Laroze *et al.*, 2010) and betalains in fruits of the *Hylocereus* genus (Naderi *et al.*, 2010).

relación sólido-agua y el tiempo de hidrólisis afectan el proceso de extracción (Azmir *et al.*, 2013). La hidrólisis enzimática se ha estudiado para extraer compuestos fenólicos desde desperdicios de uva (Gómez-García *et al.*, 2012), residuos sólidos de frambuesa (Laroze *et al.*, 2010) y betalainas en frutos del género *Hylocereus* (Naderi *et al.*, 2010).

La demanda de compuestos naturales ha aumentado por sus propiedades benéficas en la salud, pero los procesos de extracción con temperaturas altas o con ciertos disolventes pueden ser inadecuados. La extracción de esos compuestos debe realizarse en condiciones que no alteren sus propiedades bioactivas, y un método de extracción ideal debe ser rápido, cuantitativo y no destructivo (Yang *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue aplicar los pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimas (proteasa, celulasa, pectinasa) para aumentar el rendimiento de extracción de los compuestos bioactivos de la pitaya roja (*S. stellatus*) y determinar el efecto de la presencia de semillas sobre la extracción de betacianinas, betaxantinas, betalainas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Ácido gálico, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazolina 6-ácido sulfónico)] y Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México). Para los tratamientos enzimáticos se usaron preparaciones comerciales de proteasa, celulasa y pectinasa de grado alimentario adquiridas en ENMEX (México).

Material vegetal

Los frutos de pitaya roja se recolectaron durante la temporada de cosecha de agosto a septiembre del 2013 en Santiago Tonahuixtla, Puebla (18° 12' 5.35" N, 97° 53' 50.75" O). Las características físicas de los frutos fueron: peso de 45.1 a 103.1 g, longitud de 4.6 a 5.6 cm y diámetro de 3.9 a 5.8 cm. Los frutos seleccionados eran sanos, sin daños o manchas. Para almacenar los frutos se retiraron las espinas y se empacaron en bolsas de polietileno al vacío y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

The demand for natural compounds has increased due to their beneficial health properties, but extraction processes with high temperatures or with certain solvents may be inadequate. The extraction of these compounds must be carried out under conditions that do not affect their bioactive properties. An ideal extraction method should be quick, quantitative, and non-destructive (Yang *et al.*, 2011).

Therefore, the objective of this study was to apply microwaves, ultrasound, and enzymes (protease, cellulase, pectinase) pretreatments, in order to increase the extraction performance of the red pitaya (*S. stellatus*)'s bioactive compounds and to determine the effect of the seeds' presence in the extraction of betacyanins, betaxanthins, total betalains, and total phenolic compounds, as well as their antioxidant capacity.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

All reagents used were analytical grade reagents. Gallic Acid, ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)], and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were obtained from Sigma-Aldrich (Mexico). For the enzymatic treatments, food-grade commercial protease, cellulose, and pectinase preparations purchased in ENMEX (Mexico) were used.

Vegetal material

The red pitaya fruits were harvested during the harvest season (from August to September 2013), in Santiago Tonahuixtla, Puebla (18° 12' 5.35" N, 97° 53' 50.75" W). The fruits had the following physical characteristics: weight (45.1-103.1 g), length (4.6-5.6 cm), and diameter (3.9-5.8 cm). The selected fruits were healthy, without damage or spots. In order to store the pitayas, their spines were removed, the fruits were vacuum-packed in polyethylene bags, and stored at -20 °C until they were analyzed.

Preparation of samples

Before they were analyzed, samples were removed from the freezer and placed 24 h in cooling conditions (4-10 °C). The studies were carried out in pulp with and without seeds. For that purpose, the peel was separated from the fruits and the pulp was

Preparación de las muestras

Las muestras se retiraron del congelador y se colocaron 24 h en refrigeración (4-10 °C) antes de su análisis. Los estudios se realizaron en pulpa con o sin semillas, para lo cual se separó la piel de los frutos y la pulpa se separó en dos porciones. Una de ellas se tamizó con una malla del # 25 (710 μm) para eliminar las semillas y después se homogeneizó con un procesador de alimentos para obtener la muestra de pulpa sin semillas. La otra parte se homogeneizó completa y se tamizó para obtener la pulpa con semillas.

Contenido de agua

El contenido de agua se determinó en la pulpa con y sin semillas, con la pérdida de peso de las muestras después de secar en horno a 110 °C (método AOAC 942.05) (AOAC, 1990).

Determinación de pH

El pH se midió en una solución acuosa de pulpa macerada con y sin semillas al 10 % p v⁻¹ usando un potenciómetro (Denver Instrument UB-10 Colorado, EE.UU.; método AOAC 981.12).

Pretratamientos de la muestra

Los tres tipos de pretratamientos evaluados fueron: microondas, ultrasonido e hidrólisis enzimática. Porciones de 6.2 g de muestra se colocaron en tubos de ensayo de 20 mL con tapa de rosca y se sometieron a los diversos pretratamientos. En todos los casos se analizó una muestra sin pretratamiento o muestra control (C), usada para evaluar el efecto del pretratamiento.

Microondas

La muestra se colocó en el centro de un horno de microondas de uso doméstico (Acros AM1007Q, China, 1050 W) y se aplicó el pretratamiento a 105 W (10 % de la potencia máxima) por 62 min (M1, M2). Después del tratamiento la temperatura fue 36 \pm 1 °C para M1 y 45 \pm 1 °C para M2.

Ultrasonido

Las muestras se mantuvieron dentro de un baño de ultrasonido con control de temperatura (Bransonic CPX5800H, EE.UU., 40 KHz) a 20 °C durante 5 (U1), 10 (U2), 15 (U3), 20 (U4), 25 (U5), 30 (U6) y 35 (U7) min.

divided in two portions. One of them was sieved with a #25 mesh (710 μm) to remove the seeds and then homogenized with a food processor, in order to obtain the seedless pulp sample. The other part was homogenized as a whole and sieved to obtain the pulp with seeds.

Water content

The water content—in pulp with and without seeds—was determined by weight loss after samples had been oven-dried at 110 °C (AOAC method 942.05) (AOAC, 1990).

Determination of pH

The pH was measured using a potentiometer in a 10 % p v⁻¹ aqueous solution of macerated pulp with and without seeds (Denver Instrument UB-10 Colorado, USA; AOAC official method 981.12).

Pretreatment of the sample

The three kinds of pretreatments evaluated were: microwave, ultrasound, and enzymatic hydrolysis. Sample portions of 6.2 g were placed in 20 mL test tubes with screw caps and underwent various pretreatments. In all cases, a sample was analyzed without pretreatment or control sample (C), in order to evaluate the pretreatment effect.

Microwaves

The sample was placed in the center of a domestic microwave oven (Acros AM1007Q, China, 1050 W) and the pretreatment was applied at 105 W (10 % of the maximum power) during 62 min (M1, M2). After the treatment, the temperature was 36 \pm 1 °C for M1 and 45 \pm 1 °C for M2.

Ultrasound

The samples were kept in an ultrasonic bath (Bransonic CPX5800H, USA 40 KHz), with temperature control at 20 °C, for 5 (U1), 10 (U2), 15 (U3), 20 (U4), 25 (U5), 30 (U6) and 35 (U7) minutes.

Enzymatic hydrolysis

Prior to the pretreatment, the pH of the samples was measured and the result was 4.0 \pm 0.5 (within the range recommended by the enzymes supplier). Samples of pulp (with and without seeds) were mixed separately with a 0.5 % p v⁻¹ rate

Hidrólisis enzimática

Previo al pretratamiento, se midió el pH de las muestras y fue 4.0 ± 0.5 , el cual está dentro del intervalo recomendado por el proveedor de las enzimas. Las muestras de pulpa con y sin semillas se mezclaron por separado con las preparaciones enzimáticas de proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL) y las tres enzimas juntas (PPC) en una proporción de 0.5% p p⁻¹. Las mezclas se incubaron en un baño de calentamiento con agitación (Aquatherm G-86, New Brunswick Scientific, EE. UU.) por 2 h y 24 h a 150 rpm y 40 ± 1 °C. Al terminar la incubación, la reacción enzimática se detuvo calentando la mezcla de reacción en un baño maría a 95 °C por 5 min y luego enfriamiento con baño de hielo a 2 ± 2 °C por 10 min (Naderi *et al.*, 2010).

Después de la aplicación de los pretratamientos, las muestras se extrajeron según el procedimiento descrito en la sección "Preparación de los extractos" y se midieron betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

Preparación de los extractos

Muestras de 6.2 g de pulpa con o sin semillas, con o sin pretratamiento se colocaron por separado en un tubo de 50 mL con tapa de rosca y se adicionaron 10 mL de agua destilada. Las mezclas se agitaron en vortex (GEMMY VM-300 Taipei, Taiwan) por 1 min a velocidad máxima (3200 rpm) y después se centrifugaron a 10576 xg por 20 min (Dynamica Velocity 14R, Londres, Reino Unido). El sobrenadante se separó y los sólidos remanentes se usaron para una segunda extracción bajo las mismas condiciones, adicionando 5 mL de agua. Los extractos obtenidos de la primera y segunda extracción se colocaron en un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó el volumen con agua y la solución se usó para determinar betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

Cuantificación de los pigmentos

El contenido de betaxantinas (Bx) y betacianinas (Bc) se cuantificó midiendo la absorbancia a 483 y 538 nm, respectivamente (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008) con un espectrofotómetro UV-Vis (HACH DR5000, México). Las concentraciones de cada pigmento se calcularon con la Ecuación 1. Las betalaínas totales se calcularon sumando Bc y Bx.

$$B = \frac{(A \times FD \times PM \times V)}{(\epsilon \times P \times L)} \quad (1)$$

enzymatic preparation of protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), and the three enzymes together (PPC). The mixtures were incubated in a stirring heating bath (Aquatherm G-86, New Brunswick Scientific, USA) for 2 h and 24 h, at 150 rpm, and 40 ± 1 °C. At the end of the incubation, the enzymatic reaction was stopped, heating the reaction mixture in a water bath at 95 °C for 5 min and then cooled with an ice-water bath at 2 °C for 10 min (Naderi *et al.*, 2010).

After the pretreatments were applied, the samples were extracted according to the procedure described in the "Preparation of the extracts" section below and the betacyanins, betaxanthins, total betalains, total phenolic compounds, and antioxidant capacity were measured.

Preparation of the extracts

Pulp samples of 6.2 g —with or without seeds, with or without pretreatment— were placed separately in a 50 mL tube with screw cap and 10 mL of distilled water were added. The mixtures were vortexed (GEMMY VM-300 Taipei, Taiwan) for 1 min at full speed (3200 rpm) and then centrifuged at 10576 xg for 20 min (Dynamica Velocity 14R, London, UK). The supernatant was removed and the remaining solids were used for a second extraction under the same conditions, adding 5 mL of water. The extracts obtained from the first and second extractions were placed in a 25 mL volumetric flask; the volume was adjusted with water and the solution was used to determine betacyanins, betaxanthins, total betalains, total phenolic compounds, and antioxidant capacity.

Quantification of pigments

The betaxanthins (Bx) and betacyanins (Bc) content was quantified by measuring absorbance at 483 and 538 nm, respectively (Castellanos-Santiago and Yahia, 2008), with a UV-Vis spectrophotometer (HACH DR5000, Mexico). Each pigment's concentration was calculated using Equation 1. Total betalains were calculated by adding Bc and Bx.

$$B = \frac{(A \times DF \times MW \times V)}{(\epsilon \times P \times L)} \quad (1)$$

where *B*: Bx or Bc were expressed in terms of indicaxanthin or betanin mg, respectively, per 100 g of sample in dry weight (dw); *A*: absorbance at 483 nm for Bx and at 538 nm for Bc; *DF*: dilution factor; *MW*: molecular weight (indicaxanthin 308 g mol⁻¹ and betanin 550 g mol⁻¹); *V*: Extract volume (mL); *ε*: molar attenuation coefficient (indicaxanthin=48 000 L mol⁻¹ cm⁻¹ and betanin=60 000 L mol⁻¹ cm⁻¹); *P*: quantity of sample (g); *L*: cell length (1 cm).

donde B : B_x o B_c se expresaron en términos de mg de indicaxantina o betanina, respectivamente, por 100 g de muestra en peso seco (ps); A : absorbancia a 483 nm para B_x y a 538 nm para B_c ; FD : factor de dilución; PM : peso molecular (indicaxantina 308 g mol⁻¹ y betanina 550 g mol⁻¹); V : volumen del extracto (mL); ϵ : coeficiente de extinción molar (indicaxantina=48 000 L mol⁻¹ cm⁻¹ y betanina=60 000 L mol⁻¹ cm⁻¹); P : cantidad de muestra (g); L : la longitud de la celda (1 cm).

Cuantificación de los compuestos fenólicos totales

Para esta cuantificación 400 μ L del extracto se mezclaron con 3 mL de agua destilada, 200 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 400 μ L de solución de carbonato de sodio al 20 % (Singleton *et al.*, 1999). La mezcla se agitó en vortex por 30 s, se mantuvo en la oscuridad por 30 min a 20 ± 2 °C y se midió la absorbancia a 765 nm. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva estándar de ácido gálico. Los valores de compuestos fenólicos totales se presentan como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) 100 g⁻¹ de muestra ps.

Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del ABTS

El radical ABTS^{•+} se preparó mezclando la solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM) (Re *et al.*, 1999), la mezcla con el radical se mantuvo en oscuridad por 16 h antes de usarlo. Un mililitro del radical ABTS^{•+} se diluyó con 100 mL de regulador fosfato de sodio (PBS) 0.01 M pH 7.4, hasta obtener una absorbancia aproximada de 0.7 ± 0.02 a 734 nm. Del extracto se tomó una alícuota de 200 μ L y se adicionó 3.8 mL de la solución del radical ABST, la mezcla se agitó en vortex por 10 s, se mantuvo en oscuridad por 7 min a 20 ± 2 °C y se midió su absorbancia a 734 nm (A_f). Para cada muestra se realizó un blanco con 200 μ L de metanol (A_0). El porcentaje de inhibición se calculó y se interpoló en la curva de calibración de 30-300 mg mL⁻¹ Trolox. Los resultados se expresan como mg equivalentes de Trolox (ET) 100 g⁻¹ de muestra ps.

Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados

El diseño experimental fue completamente al azar para los pretratamientos y se evaluaron dos factores: 1) tipo de muestra (pulpa con o sin semillas) y 2) tipo de pretratamiento; la unidad experimental fue el extracto de 25 mL obtenido bajo cada condición experimental y todos los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se reportan como el promedio \pm desviación estándar (DE), se realizó un ANDEVA y las medias

Quantification of total phenolic compounds

For this quantification, 400 μ L of the extract were mixed with 3 mL of distilled water, 200 μ L of the Folin-Ciocalteu reagent, and 400 μ L of 20 % sodium carbonate solution (Singleton *et al.*, 1999). The mixture was vortexed for 30 s, kept in the dark for 30 min at 20 ± 2 °C, and the absorbance measured at 765 nm. Absorbance values were interpolated in a gallic acid standard curve. The values of total phenolic compounds are shown as mg of gallic acid equivalent (GAE) 100 g⁻¹ of dw simple.

Determination of antioxidant capacity by the ABTS test

The ABTS^{•+} radical was prepared mixing the ABTS solution (7 mM) with potassium persulfate (2.45 mM) (Re *et al.*, 1999); the radical mixture was kept in the dark for 16 h before being used. One milliliter of the ABTS^{•+} radical was diluted with 100 mL of 0.01 M, pH 7.4 phosphate buffer saline (PBS), until an approximate absorbance of 0.7 ± 0.02 at 734 nm was obtained. A 200 μ L aliquot was taken from the extract, and 3.8 mL of the ABTS radical solution was added; afterwards, the mixture was vortexed for 10 s, kept in the dark for 7 min at 20 ± 2 °C, and its absorbance was measured at 734 nm (A_f). For each sample, a 200 μ L of methanol (A_0) blank was prepared. The percentage inhibition was calculated and interpolated in a 30-300 mg mL⁻¹ Trolox calibration curve. The results are expressed as mg equivalents of Trolox (ET) 100 g⁻¹ of dw sample.

Experimental design and statistical analysis of the results

The experimental design of pretreatments was completely randomized. Two factors were evaluated: 1) kind of sample (pulp with or without seeds) and 2) kind of pretreatment. The experimental unit was the 25 mL extract obtained under each experimental condition and all analysis were performed in triplicate. Results were reported as the average \pm standard deviation (SD), an ANOVA was performed, and the means were compared using Fisher's method ($p \leq 0.05$). To compare the effect of the kind of sample and pretreatment, a two-way analysis was performed, as well as a principal component analysis (PCA), in order to analyze the correlation between the variables evaluated and pretreatments. Data processing was carried out with the Minitab 16 (Minitab Inc., Pennsylvania, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, California, USA) softwares.

se compararon con el método de Fisher ($p \leq 0.05$). Para comparar el efecto del tipo de muestra y de pretratamientos se realizó un análisis de dos vías, así como un análisis de componentes principales (ACP) para analizar la correlación entre las variables evaluadas y los pretratamientos. El procesamiento de datos se efectuó con el programa Minitab 16 (Minitab Inc., Pennsylvania EE. UU.) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, California EE. UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del pretratamiento en la extracción de los compuestos bioactivos en pulpa con y sin semillas de pitaya roja

Extracción de las betalaínas en pulpa con y sin semillas de pitaya roja

En todos los extractos obtenidos de pulpa con y sin semillas tratadas enzimáticamente, el contenido de betalaínas totales se redujo ($p \leq 0.05$) respecto al testigo sin pretratamiento (Figura 1). Al comparar los valores de pigmentos extraídos en los testigos sin

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of the pretreatments in the extraction of bioactive compounds in red pitaya pulp (with and without seeds)

Betalains extraction in red pitaya pulp (with and without seeds)

In all the extracts obtained from pulp (with and without seeds that received an enzymatic treatment), the total betalain content was reduced ($p \leq 0.05$) in relation to the control without pretreatment (Figure 1). When we compare the extracted pigments values from the controls without enzymatic treatment (CEA and CEB), as the incubation period increases from 2 h to 24 h, the total betalains decrease 28-42 % and 9-34 %, in pulp with and without seeds, respectively. This decrease may be the result of the samples heating during the incubation period with the different enzymes, which destroys thermosensitive pigments present in the pitaya pulp.

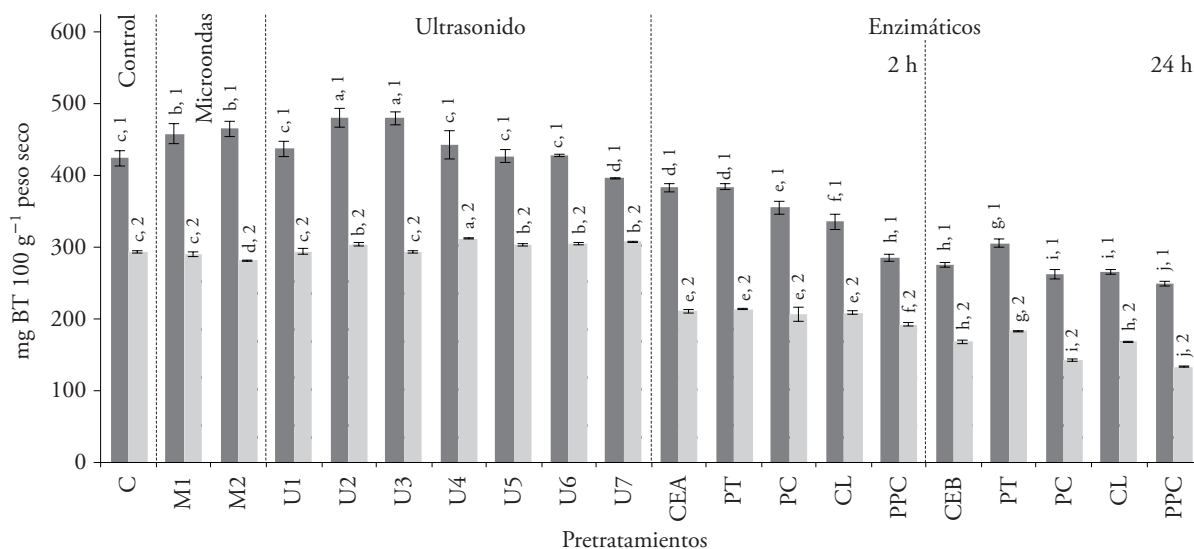


Figura 1. Contenido de betalaínas totales de los extractos de pulpa sin semillas (■) y pulpa con semillas (□) obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos: microondas (M), ultrasonido (U), proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC), comparados con los testigos sin tratamiento (C, CEA, CEB). Los números indican diferencia significativa entre las muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Total betalain content of the seedless pulp (■) and pulp with seeds (□) extracts obtained after applying pre-treatments: microwaves (M), ultrasound (U), protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), and enzyme mixture (PPC). All compared with controls without treatment (C, CEA, CEB). Numbers indicate a significant difference between the samples; letters indicate a significant difference between pretreatments ($p \leq 0.05$).

tratamiento enzimático (CEA y CEB), se observa que al aumentar el tiempo de incubación de 2 h a 24 h, la cantidad de betalaínas totales disminuyen del 9-34 % en pulpa sin semillas y del 28-42 % en pulpa con semillas. Esta disminución se puede deber al calentamiento de las muestras durante el periodo de incubación con las diferentes enzimas, lo cual destruye pigmentos termosensibles presentes en la pulpa de pitaya.

Herbach *et al.* (2007) observaron una pérdida de betalaínas totales de 24 % al realizar una hidrólisis parcial del mucilago de pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) con una preparación enzimática a 40 °C por 2 h. El valor 9.4-32.7 % obtenido en nuestro estudio para la extracción de esos pigmentos en *S. stellatus* es similar al reportado por esos autores.

Respecto al pretratamiento con ultrasonido, el contenido de betalaínas totales aumentó 13.1% en los extractos de pulpa sin semillas a los 15 min, pero tiempos mayores de exposición al ultrasonido no aumentaron la eficiencia de extracción (Figura 1). Este efecto se puede deber a la alteración de las paredes celulares que facilita el proceso de extracción de los pigmentos (Panchev *et al.*, 1988; Bagherian *et al.*, 2011). El efecto en la pulpa con semillas fue prácticamente despreciable en todos los tiempos de exposición (Figura 1). El aumento obtenido para la pulpa sin semillas, fue mayor al observado por Sivakumar *et al.* (2009), quienes muestran que el rendimiento de la extracción de pigmentos del betabel aumentó sólo 8 % al aplicar el mismo pretratamiento.

La presencia de las semillas de pitaya tuvo un efecto negativo en la extracción de pigmentos: el contenido de betalaínas totales disminuyó 22.3-46.7 % en la pulpa con semillas, respecto a la pulpa sin semillas.

Extracción de compuestos fenólicos totales en pulpa con y sin semillas de pitaya roja

En contraste con los resultados para betalaínas, el contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos de ambos tipos de pulpas aumentó ($p \leq 0.05$) al aplicar los pretratamientos enzimáticos a las 2 h, en especial con la aplicación de PC. Al igual que en la extracción de betalaínas, tiempos de 24 h de incubación tienen un efecto negativo sobre la extracción de fenoles totales (Figura 2), debido

Herbach *et al.* (2007) observed a 24 % loss of total betalains, when they performed a partial hydrolysis of the pitaya mucilage (*Hylocereus polyrhizus*), with an enzymatic preparation at 40 °C for 2 h. The 9.4-32.7 % value for the extraction of these pigments in *S. stellatus* obtained in our study is similar to the value reported by those authors.

With regard to the ultrasound pretreatment, the total betalain content increased 13.1 % in the seedless pulp extracts after 15 min, but longer exposure to ultrasound did not increase the extraction efficiency (Figure 1). This effect may be due to cell walls alteration that facilitates the pigment extraction process (Panchev *et al.*, 1988; Bagherian *et al.*, 2011). The effect on the pulp with seeds was practically negligible in all exposure times (Figure 1). The increase obtained for seedless pulp was higher than the one observed by Sivakumar *et al.* (2009), who showed that the performance of the beet pigment extraction increased only by 8 % when the same pretreatment was applied.

The presence of pitaya seeds had a negative effect on pigment extraction: the content of total betalain in the pulp with seeds decreased by 22.3-46.7 %, in relation to seedless pulp.

Extraction of total phenolic compounds in red pitaya pulp (with and without seeds)

In contrast to the betalain results, the content of total phenolic compounds in both kinds of pulps extracts increased ($p \leq 0.05$) when enzymatic pretreatments were applied after 2 h, especially with PC application. As with betalain extraction, 24 h incubation had a negative effect on the total phenols extraction (Figure 2), also due to the heating effect (CEA *vs* CEB pretreatment).

Hydrolytic enzymes application increases the extraction of total phenolic compounds. In our study, the content of these compounds increased 70.4 % and 109.8 %, in pulp extracts with and without seeds, respectively, when we applied the pectinase pretreatment for 2 h (Figure 2). Gómez-García *et al.* (2012) reported 25 % increases in phenolic compounds in grape residues and 28-35 % in raspberry residues (Laroze *et al.*, 2010); both figures are lower than the values in our study.

According to Puri *et al.* (2012), when enzymatic treatments are applied, the partial hydrolysis of the

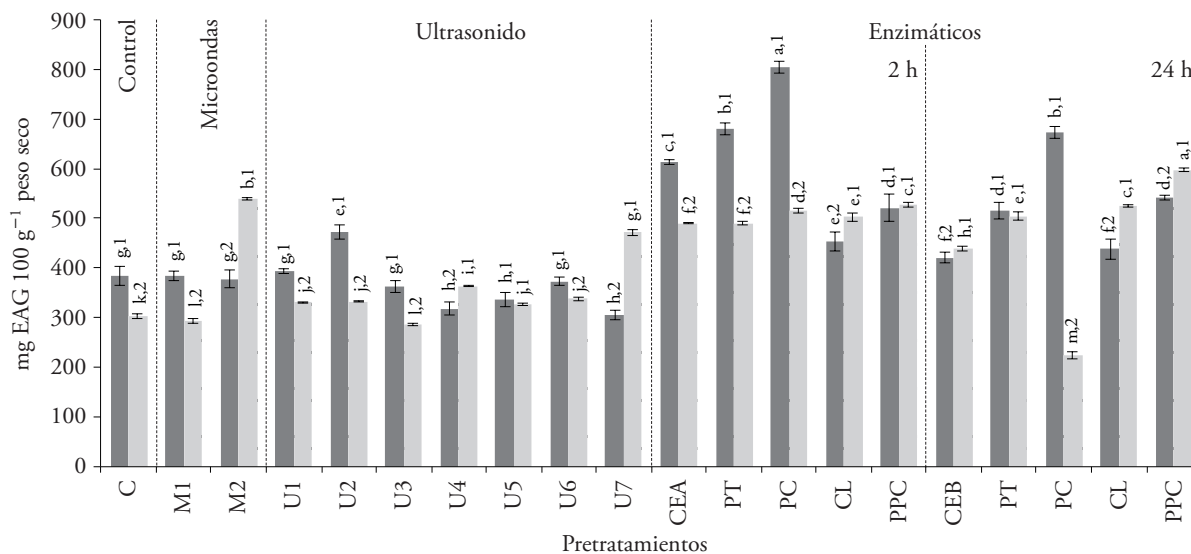


Figura 2. Compuestos fenólicos totales de los extractos de pulpa sin semillas (■) y pulpa con semillas (□) obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos: microondas (M), ultrasonido (U), proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC), comparados con los testigos sin tratamiento (C, CEA, CEB). Los números indican diferencia significativa entre las muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Total phenolic compounds of the seedless pulp (■) and pulp with seeds (□) extracts obtained after applying pretreatments: microwaves (M), ultrasound (U), protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), and enzyme mixture (PPC). All compared with controls without treatment (C, CEA, CEB). Numbers indicate a significant difference between the samples; letters indicate a significant difference between pretreatments ($p \leq 0.05$).

también a la acción del calentamiento (pretratamiento CEA *vs* CEB).

La aplicación de enzimas hidrolíticas aumenta la extracción de compuestos fenólicos totales y en nuestro estudio el contenido de estos compuestos aumentó 109.8 y 70.4 % en los extractos de pulpa sin semillas y con semillas, respectivamente, cuando se utilizó el pretratamiento con pectinasa por 2 h (Figura 2). Gómez-García *et al.* (2012) reportan incrementos de compuestos fenólicos de 25 % en residuos de uva y de 28-35 % en desechos de frambuesa (Laroze *et al.*, 2010), los cuales son valores inferiores a los de nuestro estudio.

Según Puri *et al.* (2012), al aplicar tratamientos enzimáticos, la hidrólisis parcial del mucílago permite extraer los compuestos ligados a la matriz polimérica lo cual facilita el procesamiento de muestras. El ácido galacturónico es un componente abundante del mucílago que puede ser liberado durante la hidrólisis enzimática y la exposición de los grupos funcionales (hidroxilo y carboxilo) puede aumentar el valor de fenoles totales (Combo *et al.*, 2011).

Respecto a los pretratamientos con microondas, se observaron diferencias significativas en la

mucilage enables the extraction of the compounds bound to the polymeric matrix, which facilitates samples processing. Galacturonic acid is an abundant mucilage compound that can be released during enzymatic hydrolysis; meanwhile, functional groups exposure (hydroxyl and carboxyl) may increase the total phenols value (Combo *et al.*, 2011).

With regard to microwave pretreatments, significant differences were observed between the pulp with and without seeds during the extraction of phenolic compounds. The application of microwave for 2 min (M2) resulted in a 78.1 % ($p \leq 0.05$) increase in the extraction of phenolic compounds from pulp with seeds, which may be the result of tissue rupture and greater interaction between the solvent and the matrix (Bagherian *et al.*, 2011). However, this pretreatment had no effect in the seedless pulp (Figure 2).

In addition, exposure to ultrasonic waves did not result in significant increases ($p \leq 0.05$) in the total phenolic compounds content, in most of the conditions tested for both samples.

The extraction of phenolic compounds from pitayas using microwaves as pretreatment is more

extracción de compuestos fenólicos entre la pulpa con y sin semillas. La aplicación de microondas por 2 min (M2) aumentó 78.1 % ($p \leq 0.05$) la extracción de los compuestos fenólicos desde la pulpa con semillas, lo cual se puede deber a la ruptura de tejidos y mayor interacción entre el disolvente y la matriz (Bagherian *et al.*, 2011). Sin embargo, en la pulpa sin semillas este pretratamiento no tuvo efecto (Figura 2).

Además, la exposición a ondas ultrasónicas no causó incrementos significativos ($p > 0.05$) en el contenido de compuestos fenólicos totales en la mayoría de las condiciones probadas para ambas muestras.

La extracción de compuestos fenólicos en pitayas usando microondas como pretratamiento es más eficiente que la obtenida por Nayak *et al.* (2015), quienes reportan un aumento de 20.5 % en cáscaras de cítricos, comparada con la extracción convencional por disolventes. Esto significa que el efecto de los pretratamientos sobre el rendimiento de compuestos fenólicos totales en los extractos depende del tipo de material vegetal sobre el cual se aplique. En la pitaya, la extracción de compuestos fenólicos es mayor con pectinasa, y mejor en la pulpa sin semillas.

Valores de capacidad antioxidante en los extractos de pulpa con y sin semillas de pitaya roja

Los tratamientos enzimáticos en pulpa con y sin semillas aumentaron los valores de capacidad antioxidante en los extractos obtenidos de ambas muestras (Figura 3), y el efecto fue mayor por la acción de la pectinasa (PC) por 2 h. De manera similar a lo observado en la extracción de compuesto fenólicos, el aumento de la temperatura tiene un efecto positivo ya que aumentó la capacidad antioxidante de los extractos, pero solo a tiempos cortos de incubación.

La extracción de compuestos antioxidantes en la pitaya se mejora con los tratamientos de proteasa y pectinasa, pero se obtiene una mayor extracción al eliminar las semillas de la pulpa (Figura 3). El uso de pectinasa aumentó la capacidad antioxidante de los extractos de pulpa sin semillas hasta 74.8 % y 25.3 % en la pulpa con semillas. Estos valores son mayores a los obtenidos en los tratamientos por microondas o ultrasonido (Figura 3).

efficient than the one obtained by Nayak *et al.* (2015), who reported a 20.5 % increase in citrus peels, in comparison with conventional solvent extraction. This means that the effect of pretreatments over the performance of total phenolic compounds in extracts depends on which kind of vegetal material it is applied on. In pitaya, the extraction of phenolic compounds is greater with pectinase treatment, and better in seedless pulp.

Antioxidant capacity values in red pitaya pulp extracts (with and without seeds)

Enzymatic treatments in pulp (with and without seeds) increased the antioxidant capacity values in the extracts obtained from both samples (Figure 3), and the effect was greater due to the action of pectinase (PC) for 2 h. In a similar way to what was observed in phenolic compounds extraction, the increase in temperature had a positive effect, because it increased the extracts' antioxidant capacity, but only in short incubation times.

The antioxidant compounds extraction in pitaya improves with protease and pectinase treatments, but a higher extraction is obtained when the seeds are removed from the pulp (Figure 3). The use of pectinase increased the antioxidant capacity up to 74.8 % in seedless pulp extracts and 25.3 % in extracts of pulp with seeds. These values are higher than those obtained with microwave or ultrasound treatments (Figure 3).

The increase of the extracts's antioxidant capacity—after applying the pectinase treatment—can be caused by the pectin hydrolysis or the pitaya pulp mucilage, which can release fragments with greater antioxidant capacity than the polymers from which they originate (Chaouch *et al.*, 2015), or by the polymer networks break down, which releases antioxidant compounds, including phenolic compounds (Kunnika and Pranee, 2011).

In order to determine if the differences between the bioactive compounds concentrations in the extracts were caused by the presence of seeds in the pulp or a dilution effect, we had to calculate the corrected values of the pigments, antioxidant capacity, and total phenolic compounds per 100 g of pulp, considering the seeds proportion in the samples. Table 1 shows the results obtained for samples without pretreatment (control) and with ultrasound pretreatments for 15

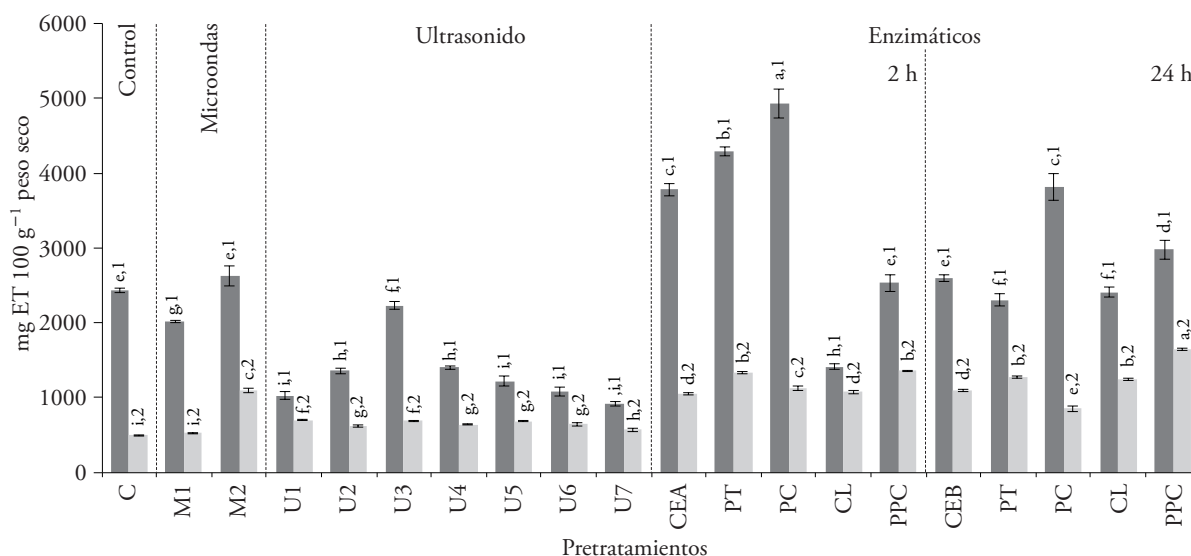


Figura 3. Capacidad antioxidante de los extractos de pulpa sin semillas (■) y pulpa con semillas (□) obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos: microondas (M), ultrasonido (U), proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC), comparados con los testigos sin tratamiento (C, CEA, CEB). Los números indican diferencia significativa entre las muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Antioxidant capacity of the seedless pulp (■) and pulp with seeds (□) extracts obtained after applying pretreatments: microwaves (M), ultrasound (U), protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL) and enzyme mixture (PPC). All compared with controls without treatment (C, CEA, CEB). Numbers indicate a significant difference between the samples; letters indicate a significant difference between pretreatments ($p \leq 0.05$).

El aumento en la capacidad antioxidante en los extractos al aplicar el tratamiento con pectinasa puede ser causado por la hidrólisis de la pectina o el mucílago de la pulpa de la pitaya, lo cual puede liberar fragmentos con mayor capacidad antioxidante que los polímeros que les dieron origen (Chaouch *et al.*, 2015), o bien a la ruptura de las redes poliméricas que libera compuestos antioxidantes, incluso compuestos fenólicos (Kunnika and Pranee, 2011).

Para determinar si las diferencias en las concentraciones de componentes bioactivos en los extractos se debían a la presencia de las semillas en la pulpa o a un efecto de dilución, se calcularon los valores corregidos de pigmentos, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales por 100 g de pulpa, considerando la proporción de semillas en las muestras. Los resultados obtenidos para las muestras sin pretratamiento (testigo) y con los pretratamientos de ultrasonido por 15 min y pectinasa a 2 h, están en el Cuadro 1. Según los resultados habría un contenido mayor de pigmentos amarillos (Bx) que de pigmentos rojos (Bc) en las pulpas estudiadas, aunque según Pérez-Loredo *et al.* (2016) los parámetros cromáticos L^* , a^* y b^* de los frutos *S. stellatus* confirman la coloración de la pulpa en las pitayas rojas. Esta discrepancia también

min and pectinase after 2 h. According to the results, there would be a higher content of yellow pigments (Bx) than red pigments (Bc) in the studied pulps, although, according to Pérez-Loredo *et al.* (2016), the L^* , a^* and b^* chromatic parameters of *S. stellatus* fruits confirm the pulp coloration in red pitayas. This discrepancy is also observed in betalains studies in red *Opuntia ficus-indica* prickly pears (Fernández-López *et al.*, 2010), and it may be due to the overestimation of Bx values, as a result of the overlap of the bands of the Bx and Bc absorption spectrum, or the use of mean extinction coefficients.

Our working group is carrying out a research about the number and kind of betalains present in pitayas of the *Stenocereus* genus using HPLC-DAD. Preliminary results indicate that there are four kinds of betaxanthins and five of betacyanins in the pulp extract (although the latter predominate). Despite a likely bias in the results, we can appreciate the level of betalains in cactaceae fruit extracts using spectrophotometric methods (Fernández-López *et al.*, 2002). In our study, the total betalain values allowed us to evaluate and compare the effect of different pretreatments in red pitaya pigment extraction.

Cuadro 1. Valores de pigmentos (Bc, Bx, BT), fenoles (CFT) y capacidad antioxidante (CA) de los extractos acuosos de la pulpa sin semillas y con semillas obtenidos con los mejores pretratamientos.**Table 1. Pigments values (Bc, Bx, and TB), phenols (TPC), and antioxidant capacity (AC) from the aqueous extracts of pulp (with and without seeds) obtained with the best pretreatments.**

Tratamiento	Pulpa sin semillas		
	Ultrasonido 15 min	Pectinasa 2 h	Testigo
Bc (mg 100 g ⁻¹ ps)	227.6 ± 3.7 ^{1, A}	194.9 ± 8.2 ^{1, B}	200.4 ± 2.2 ^{1, B}
Bx (mg 100 g ⁻¹ ps)	251.7 ± 4.7 ^{1, A}	159.7 ± 3.9 ^{1, C}	223.2 ± 12.9 ^{1, B}
BT (mg 100 g ⁻¹ ps)	479.3 ± 8.4 ^{1, A}	354.6 ± 8.5 ^{1, C}	423.6 ± 10.9 ^{1, B}
CFT (mg EAG 100 g ⁻¹ ps)	361.8 ± 11.5 ^{2, E}	804.5 ± 19.5 ^{1, A}	383.5 ± 18.4 ^{2, E}
CA (mg ET 100 g ⁻¹ ps)	2230.1 ± 52.6 ^{1, C}	4925.7 ± 192.7 ^{1, A}	2430.3 ± 30.0 ^{1, B}
	Pulpa con semillas (corregidos)*		
Bc (mg 100 g ⁻¹ ps)	187.3 ± 1.5 ^{2, C}	156.0 ± 5.9 ^{2, D}	188.2 ± 1.5 ^{2, C}
Bx (mg 100 g ⁻¹ ps)	232.4 ± 1.1 ^{2, B}	137.7 ± 5.6 ^{2, D}	231.6 ± 1.9 ^{1, B}
BT (mg 100 g ⁻¹ ps)	419.6 ± 2.4 ^{2, B}	293.8 ± 10.8 ^{2, D}	419.8 ± 2.6 ^{1, B}
CFT (mg EAG 100g ⁻¹ ps)	409.9 ± 3.0 ^{1, D}	738.4 ± 11.6 ^{2, B}	433.4 ± 5.4 ^{1, C}
CA (mg ET g ⁻¹ ps)	983.6 ± 15.0 ^{2, E}	1611.9 ± 37.5 ^{2, D}	715.8 ± 10.0 ^{2, F}

Media ± la desviación estándar (DE), n=3. El contenido de humedad de las muestras fue 88.6 % en pulpa sin semillas y 87.5 % en pulpa con semillas. Valores expresados por 100 g de pulpa en peso seco (ps). Los superíndices indican diferencias significativas para cada variable ($p \leq 0.05$); los números indican diferencia significativa entre muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos. *Los valores corregidos fueron calculados considerando un contenido de semillas en la pulpa del fruto de 30.2 %. ❖ Mean ± standard deviation (SD), n=3. The samples' moisture content was 88.6 % in seedless pulp and 87.5 % in pulp with seeds. Values expressed per 100 g dry weight (dw) of pulp. Superscripts indicate significant differences for each variable ($p \leq 0.05$); numbers indicate significant differences between samples; letters indicate significant differences between pretreatments. *The corrected values were calculated considering a 30.2 % seed content in the fruit pulp.

se observa en estudios sobre betalaínas en tunas rojas de *Opuntia ficus-indica* (Fernández-López *et al.*, 2010), y se puede deber a la sobreestimación de los valores de Bx por el traslape de las bandas del espectro de absorción de Bx y Bc, o el uso de coeficientes de extinción medios.

Una investigación sobre el número y tipo de betalaínas presentes en las pitayas del género *Stenocereus* usando HPLC-DAD se realiza en nuestro grupo de trabajo. Los resultados preliminares indican que en el extracto de la pulpa hay cuatro tipos de betaxantinas y cinco de betacianinas (las últimas predominan). A pesar de la probabilidad de un sesgo en los resultados, es posible apreciar el nivel de betalaínas en los extractos de frutos de cactáceas con métodos espectrofotométricos (Fernández-López *et al.*, 2002). En nuestro estudio, los valores de betalaínas totales permitieron evaluar y comparar el efecto de diversos pretratamientos en la extracción de pigmentos en la pitaya roja.

The comparison of the corrected data from Table 1 confirms that the presence of seeds has a negative impact in pigment extraction and antioxidant capacity. Only a slight increase in total phenolic compounds extraction is obtained (<13 %) that way; therefore, using seedless pulp is more advisable. In addition, we observed that the extract of pulp with seeds was darker, which may be the result of the oxidation or degradation of some extract compounds. The presence of seeds could favor non-enzymatic browning or ascorbic acid oxidation (Suh *et al.*, 2003), both of which promote betalain decline.

In order to correlate the extraction efficiency of the pigments, phenolic compounds, and antioxidant capacity with the pretreatments used, we carried out a PCA. This statistical analysis allows to obtain graphs in which the grouping of data in quadrants helps to define the relations between variables.

La comparación de los datos corregidos del Cuadro 1 confirma que la presencia de semillas tiene un impacto negativo en la extracción de los pigmentos y la capacidad antioxidante, y sólo se obtiene un ligero aumento en la extracción de compuestos fenólicos totales (<13 %), por lo cual es más recomendable usar la pulpa sin semillas. Además, se observó un oscurecimiento de los extractos de la pulpa con semillas que se puede deber a la oxidación o degradación de algunos compuestos en el extracto. La presencia de semillas podría favorecer el pardeamiento no enzimático o la oxidación del ácido ascórbico (Suh *et al.*, 2003) que promueven el decaimiento de las betalainas.

Para correlacionar la eficiencia de extracción de los pigmentos, los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante con los pretratamientos usados, se aplicó un ACP. Este análisis estadístico permite obtener gráficos donde el agrupamiento de los datos en los cuadrantes ayuda a definir la relación entre las variables.

Análisis de componentes principales (ACP) de la extracción de los compuestos bioactivos en relación al pretratamiento utilizado

El ACP se usa en estudios de los alimentos para clasificar variables mediante la reducción estadística de los datos. Los grupos de datos originales se transforman en nuevos grupos de variables no correlacionadas llamados componentes principales (CP), con los cuales se elaboran gráficos que permiten evaluar visualmente similitudes entre las muestras, y determinar si esas muestras se pueden agrupar (Perez-Loredo *et al.*, 2016).

El análisis de los resultados de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalainas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) mediante ACP, mostró que dos CP explican 96.3 % de la variación total de los resultados (CP1: 71.6 %; CP2: 24.7 %) en pulpa sin semillas (Figura 4), y 97.3 % (CP1: 82.1 %; CP2: 15.2 %) en pulpa con semillas (Figura 5).

Los gráficos de barras son útiles para análisis cuantitativos de las diferencias entre los tratamientos para cada muestra (Figura 1, 2 y 3). Pero el gráfico de CP permite analizar todos los resultados en conjunto y concluir en función de los agrupamientos (Figuras 4 y 5).

Principal component analysis (PCA) of the bioactive compounds extraction with regard to the pretreatment used

PCA is used in food studies to classify variables by means of the data statistical reduction. The original data groups are transformed into new groups of uncorrelated variables called principal components (PC), which are used to develop graphs that enable the visual evaluation of similarities between the samples, as well as determining if these samples can be grouped (Perez-Loredo *et al.*, 2016).

The analysis of the results for betacyanins (Bc), betaxanthins (Bx), total betalains (TB), total phenolic compounds (TPC), and antioxidant capacity (AC) through PCA showed that two PC explain 96.3 % of total result variations (PC1: 71.6 %, PC2: 24.7 %) in seedless pulp (Figure 4), and 97.3 % (PC1: 82.1 %; PC2: 15.2 %) in pulp with seeds (Figure 5).

Bar charts are useful for quantitative analysis of differences between the treatments for each sample (Figure 1, 2 and 3). However, the PC chart allowed us to analyze all the results as a whole and to reach a conclusion on the basis of the groupings (Figures 4 and 5).

The PCA graphs analysis regarding the pulp with and without seeds (Figure 4, 5) shows that enzymatic treatments (PC and PT) provide a higher performance in TPC and AC extraction, whereas ultrasound (U) and microwaves (M) result in higher pigments performance. For seedless pulp (Figure 4), enzymatic pretreatments with long incubation (24 h, ††) or ultrasonic with longer exposure times (U4-U7) are far away from the TB, TPC, and AC variables, (in the PC2 positive quadrants): this means that longer times do not favor extraction. This effect is not so obvious in pulp with seeds (Figure 5), because the TB, TPC, and AC extraction performances are very similar under the different treatments and there are no significant differences ($p > 0.05$) between most of them (Figures 1, 2, 3).

It is important to highlight that antioxidant capacity has a higher correlation with the amount of phenolic compounds (both in PC1 negative) than with the amount of betalains (in PC1 positive).

Based on these results, we suggest that—in order to use of pitaya as a source of bioactive compounds—the pulp must be separated from the seeds, and—in order to maximize the extraction of pigments,

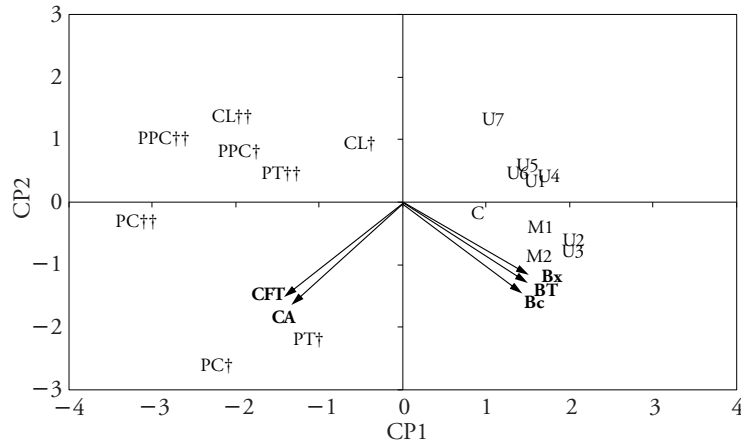


Figura 4. Gráfica de dos dimensiones de los componentes principales CP1 y CP2 para las cargas y puntuaciones del ACP de Bc, Bx, BT, CFT y CA obtenidos en pulpa sin semillas sin pretratamiento (C) y con pretratamiento de microondas (M), ultrasonido (U), y con las enzimas proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), proteasa, pectinasa y celulasa (PPC) a 2 (†) y 24 h (††) de incubación.

Figure 4. Two-dimensional chart of PC1 and PC2 principal components for the PCA charges and scores for Bc, Bx, TB, TPC, and AC obtained in seedless pulp without (C) and with microwave (M), ultrasound (U) pretreatment and with protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), protease, pectinase and cellulase (PPC) enzymes after 2(†) and 24 (††) h of incubation.

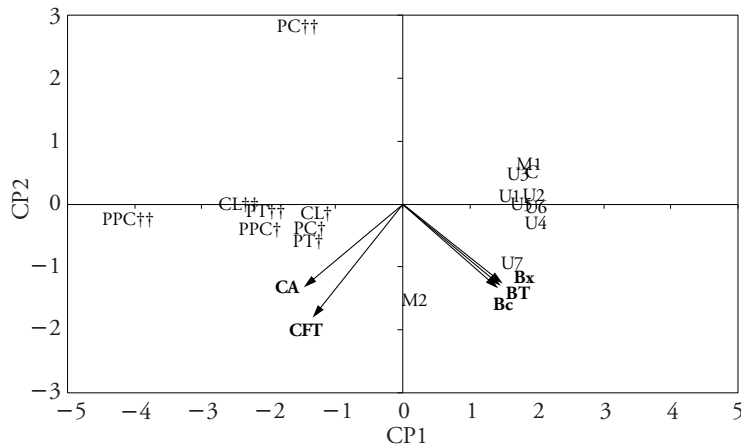


Figura 5. Gráfica de dos dimensiones de los componentes principales CP1 y CP2 para las cargas y puntuaciones del ACP de Bc, Bx, BT, CFT y CA obtenidos en pulpa con semillas sin pretratamiento (C) y con pretratamiento de microondas (M), ultrasonido (U), y con las enzimas proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), proteasa, pectinasa y celulasa (PPC) a 2 (†) y 24 h (††) de incubación.

Figure 5. Two-dimensional chart of PC1 and PC2 principal components for the PCA charges and scores of Bc, Bx, TB, TPC, and AC obtained in pulp with seeds without (C) and with microwave (M), ultrasound (U) pretreatments and with protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), protease, pectinase and cellulase (PPC) enzymes after 2(†) and 24 (††) h of incubation.

El análisis de los gráficos de ACP para la pulpa con y sin semillas (Figura 4, 5) permite observar que los tratamientos enzimáticos (PC y PT) ofrecen mayor rendimiento de extracción de CFT y CA, mientras que con el ultrasonido (U) y microondas (M) se obtiene mayor rendimiento para pigmentos. Para la pulpa sin semillas (Figura 4), los pretratamientos enzimáticos con periodos largos de incubación (24 h, ††) o los de ultrasonido con mayores tiempos de exposición (U4-U7), están alejados de las variables BT, CFT y CA (en los cuadrantes CP2 positivo); esto significa que mayores tiempos no favorecen la extracción. Este efecto no es tan notorio en la pulpa con semillas (Figura 5), porque los rendimientos de extracción de BT, CFT y CA son muy similares con los diferentes tratamientos y en la mayoría de ellos no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figuras 1, 2, 3).

Cabe resaltar que la capacidad antioxidante tiene mayor correlación con la cantidad de compuestos fenólicos (ambas en CPI negativo), que con la cantidad de betalaínas (en CPI positivo).

Con base en estos resultados, se sugiere que para usar la pitaya como fuente de compuestos bioactivos, la pulpa debe separarse de las semillas y para maximizar la extracción de pigmentos, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, aquella se debe tratar primero con ultrasonido por 15 min y pectinasa al 0.5 % $p\ p^{-1}$ por 2 h.

CONCLUSIONES

La aplicación de pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimas hidrolíticas afecta el rendimiento de extracción de betalaínas, fenoles y actividad antioxidante de la pitaya roja (*S. stellatus*). La selección del mejor pretratamiento de la muestra para la extracción de compuestos bioactivos específicos dependerá de la matriz y el objetivo del estudio. Los valores de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales máximos se obtuvieron al aplicar ultrasonido por 15 min. El contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante máximos se obtuvieron al pretratar la pulpa con pectinasa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Oscar Rene López-Mendiola por su ayuda con la cosecha de los frutos y a Luis Enrique Ruíz-Molina por la identificación taxonómica de los mismos.

phenolic compounds, and antioxidant capacity—the pulp must be treated previously with ultrasound for 15 min and pectinase at 0.5 % $p\ p^{-1}$ for 2 h.

CONCLUSIONS

The application of microwave, ultrasound, and hydrolytic enzymes pretreatments affects the performance of betalains, phenols, and the antioxidant activity of the red pitaya (*S. stellatus*). Choosing the best sample pretreatment for the extraction of specific bioactive compounds will depend on the study's matrix and purpose. The maximum total values of betacyanins, betaxanthins, and betalains were obtained applying ultrasound for 15 min. Total phenol content and maximum antioxidant capacity were obtained pretreating the pulp with pectinase.

—End of the English version—



La presente investigación fue financiada por el Instituto Politécnico Nacional (Proyecto SIP-20161310) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB-2011-01-169779). María Guadalupe Pérez-Loredo recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

LITERATURA CITADA

- Alupului, A., I. Călinescu, and V. Lavric. 2012. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. U P B. Sci. Bull., Series B. 74: 129-142.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. (15th ed). Arlington, Virginia, USA. 1298 p.
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, and A. K. M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J. Food Eng. 117: 426-436.
- Bagherian, H., F. Z. Ashtiani, A. Fouladitajar, and M. Mohtashamy. 2011. Comparisons between conventional, microwave —and ultrasound— assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. Chem. Eng. Process. 50: 1237-1243.
- Cardoso-Ugarte, G. A., M. E. Sosa-Morales, T. Ballard, M. F. San Martín-Gonzalez, and A. Liceaga. 2014. Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). LWT - Food Sci Technol. 59: 276-282.
- Castellanos-Santiago, E., and E. M. Yahia. 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance

- liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5758-5764.
- Cejudo-Bastante, M. J., N. Hurtado, and F. J. Heredia. 2015. Potential use of new Colombian sources of betalains. Colorimetric study of red prickly pear (*Opuntia dillenii*) extracts under different technological conditions. *Food Res. Int.* 71: 91-99.
- Chaouch, M. A., J. Hafsa, C. Rihouey, D. Le Cerf, and H. Majdoub. 2015. Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: Antioxidant and antiglycated activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 79: 779-786.
- Combo, A., M. Aguedo, and M. Paquot. 2011. Pectic oligosaccharides: production and potential applications. *Biotechno. Agron. Soc. Environ.* 15: 153-164.
- Fernández-López, J. A., R. Castellar, J. M. Obón, and L. Almela. 2002. Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia* 56: 591-595.
- Fernández-López, J. A., L. Almela, J. M. Obón, and R. Castellar. 2010. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65: 253-259.
- García-Cruz, L., Y. Salinas-Moreno, and S. Valle-Guadarrama. 2012. Betalainas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 1-5.
- García-Cruz, L., S. Valle-Guadarrama, Y. Salinas-Moreno, and E. Joaquín-Cruz. 2013. Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68: 403-410.
- Gómez-García, R., G. C. G. Martínez-Ávila, and C. N. Aguilar. 2012. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech.* 2: 297-300.
- Herbach, K. M., C. Maier, F. C. Stintzing, and R. Carle. 2007. Effects of processing and storage on juice color and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 649-658.
- Kunnika, S., and A. Pranee. 2011. Influence of enzyme treatment on bioactive compounds and colour stability of betacyanin in flesh and peel of red dragon fruit *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton and Rose. *Inter. Food Res. J.* 18: 1437-1448.
- Laroze, L., C. Soto, and M. E. Zúñiga. 2010. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electron. J. Biotechno.* 13 DOI: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-12.
- Morales, P., E. Ramírez-Moreno, M. C. Sanchez-Mata, A. M. Carvalho, and I. Ferreira. 2012. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F. A. C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Res. Int.* 46: 279-285.
- Naderi, N., F. C. Stintzing, H. M. Ghazali, Y. A. Manap, and S. D. Jazayeri. 2010. Betalain extraction from *Hylocereus polyrhizus* for natural food coloring purposes. *J. Prof. Assoc. Cactus* 12: 143-154.
- Nayak, B., F. Dahmoune, K. Moussi, H. Remini, S. Dairi, O. Aoun, and M. Khodir. 2015. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem.* 187: 507-516.
- Panchev, I., N. Kirchev, and C. Kratchanov. 1988. Improving pectin technology: II. Extraction using ultrasonic treatment. *Int. J. Food Sci. Tech.* 23: 337-341.
- Pérez-Loredo, M. G., F. García-Ochoa, and B. E. Barragán-Huerta. 2016. Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis. *Int. J. Food Prop.* 19: 326-338.
- Prakash M. J., and S. Manikandan. 2012. Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *Dyes Pigments* 95: 465-472.
- Puri, M., D. Sharma, and C. J. Barrow. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* 30: 37-44.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 299: 152-178.
- Sivakumar V., Lakshmi J. A., Vijayeeswarri J., and Swaminathan G. 2009. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrason Sonochem.* 16: 782-789.
- Suh, H. J., D. O. Noh, C. S. Kang, J. M. Kim, and S. W. Lee. 2003. Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract. *Nahrung* 47: 132-135.
- Villalobos-Castillejos, F., P. Cereza-Mezquita, M. L. Hernández-De Jesús, and B. E. Barragán-Huerta. 2013. Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma*. *Int. J. Food Sci. Tech.* 48: 1243-1251.
- Woo, K. K., F. H. Ngou, L. S. Ngo, W. K. Soong, and P. Y. Tang. 2011. Stability of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Am. J. Food Tech.* 6: 140-148.
- Yang, B., Y. Jiang, J. Shi, F. Chen, and M. Ashraf. 2011. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit —A review. *Food Res. Int.* 44: 1837-1842.