

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y**  
**TECNOLOGÍA AVANZADA**



CICATA-IPN

**ÁREA DE ALIMENTOS**

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES**  
**PIGMENTOS DEL *Opuntia joconoste* c.v. (xoconostle)**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN**  
**TECNOLOGÍA AVANZADA**  
**PRESENTA:**

**Q. I. NOÉ SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

**MÉXICO, D. F.**

**2006.**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

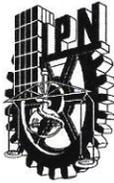
**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de México D. F. el día 21 del mes noviembre del año 2006, el (la) que suscribe **Q. I. Noé Sánchez González** alumno (a) del Programa de Tecnología Avanzada con número de registro B041026, adscrito a CICATA-IPN, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M. C. Monica Rosalía Jaime Fonseca y cede los derechos del trabajo intitulado **Extracción y caracterización de los principales pigmentos del Opuntia joconostle (xoconostle)**, 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 del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección nsanchezg@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Q. I. Noé Sánchez González

Nombre y firma



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de México, D. F. siendo las 11:00 horas del día 21 del mes de noviembre del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis de grado titulada:

**Extracción y caracterización de los principales pigmentos del *Opuntia joconostle* (xoconostle).**

Presentada por el alumno:

**Sánchez**                      **González**                      **Noé**  
Apellido paterno                      materno                      nombre(s)

Con registro: 

B	0	4	1	0	2	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

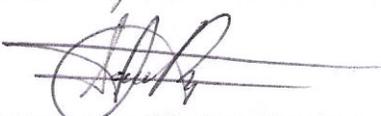
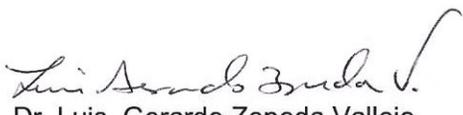
Maestría en Tecnología Avanzada

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

LA COMISION REVISORA

Director de tesis

  
M. C. Mónica Rosalía Jaime Fonseca        
Dr. Eduardo San Martín Martínez

  
Dr. José Francisco Sánchez Ramírez        
Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo

  
Dr. Víctor Barba López        
Dr. José Luis Fernández Muñoz

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

  
Dr. José Antonio Iran Díaz Góngora  
CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA  
Y TECNOLOGIA AVANZADA  
DEL IPN

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de la tesis mediante la beca, con número de registro 195256.**

**Este trabajo de tesis se presentó:**

**En el V Congreso Iberoamericano de Ingeniería de los alimentos, realizado en Puerto Vallarta México, del 4 al 7 de septiembre del 2005. “Estabilidad de los pigmentos extraídos del *Opuntia joconostle* c.v. bajo diferentes condiciones de pH y temperatura”.**

**2<sup>do</sup> Congreso “Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries”, realizado en Saltillo, Coahuila, México, del 16 al 18 de octubre del 2006. “Extraction of Betalains from *Opuntia joconostle* c.v. Using Different Solvent Systems”.**

**Este trabajo de tesis se realizó en:**

**En el Laboratorio de Pruebas Físicas del Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría y supervisión de la M. C. Mónica Rosalía Jaime Fonseca y el Dr. Eduardo San Martín Martínez.**

**El fruto del xoconostle, se obtuvo en Zempoala, Hidalgo, México.**

**Agradecemos a la Dra. María Guillermina Acosta Barrera y a la maestra María Trinidad Barrera González, por las facilidades proporcionadas para la adquisición del nopal de xoconostle.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la M. C. Mónica Rosalía Jaime Fonseca y el Dr. Eduardo San Martín Martínez en primera instancia por su apoyo, aceptación y confianza para el desarrollo del presente trabajo y la realización del mismo.

A la coordinación del posgrado CICATA-Legaria:

Dr. Antonio Calderón Arenas, Leticia Cardona, Laura Vega y su gran equipo, por su atención y asesoría profesional rápida. Especialmente al Director del CICATA, al Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora por su apoyo y consejos.

A los miembros del jurado: M. C. Mónica Rosalía Jaime Fonseca, Dr. Eduardo San Martín Martínez, Dr. José Francisco Sánchez Ramírez, Dr. Luís Gerardo Zepeda Vallejo, Dr. Víctor Barba López y Dr. José Luís Fernández Muñoz.

Al Dr. Luís Gerardo Zepeda Vallejo, por el apoyo y ayuda para obtener los espectros de RMN y HPLC.

A la Administración Central de Laboratorios y Servicios Científicos (Laboratorio Central de HACIENDA). A María Cristina Arrieta Cisneros, Lucila Godinez Ramírez, Julieta García Hernández, Eva Regalado Galván y Francisco.

Al personal de la biblioteca del CICATA-Legaria, en especial a Rocío Sánchez y Gerardo Cruz por la búsqueda de la bibliografía, por su apoyo y compañerismo.

A la amistad, consejos y apoyo en el Laboratorio de Pruebas Físicas: Alfonso Martínez, Juana Jaimes, Miguel López, Miguel Aguilar, Cristina Garibay, Maru Eugenia Ramírez, en el Laboratorio de Química, por su apoyo y comprensión a la Dra. Delia Quintana Zavala, a mis amigos Pablo, Anabel, a Rafael Salinas por su apoyo en el taller y el Laboratorio de Físicoquímica a Alicia López.

Al CICATA-IPN por darme las facilidades para realizar mi trabajo de posgrado.

## **DEDICATORIAS**

A Dios:

Por ser mí guía, por enseñarme a aprender a amar a todos, sin preferencias y encontrar la luz cuando se pierde la fe, ayudando sin preferencia y el motivo de luchar.

A mis Padres:

María González Magdalena y J. Carmen Sánchez Fernández por su amor y cariño.

A mis Hermanos:

José Teófilo, Felipe, Tomás, Celestino, Petra, Juana, Angelina, Ismael y Miguel Ángel.

Al coro Jesús de Nazaret, a Elizabeth Pedraza por ser mi mejor amiga.

A mis amigos y compañeros, Mónica Rosalía Jaime Fonseca, Alicia López Torres, Georgina Cobian Portillo, José Refugio López Serrato, Mónica Centeno, por brindarme su apoyo en todo momento.

Padre de bondad por la ilustración mi entendimiento en su lectura, escritura de la ciencia e investigación. Preserva de todo error mi entendimiento en su lectura; líbrame del espíritu de soberbia a fin de que yo siga fielmente las enseñanzas de la que nos dice como Maestra infalible de la verdad, y dame un corazón dócil y generoso. Te suplico por lo méritos del que es nuestro Camino, nuestra verdad y nuestra vida, Jesucristo, en quien están escondidos todos los tesoros de la sabiduría y de la gracia.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	I
ÍNDICE DE CUADROS .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	V
RESUMEN .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>2</b>
2.1. Xoconostle ( <i>Opuntia joconostle</i> spp.) .....	2
2.2. Características del xoconostle .....	3
2.2.1. Propiedades del fruto del xoconostle .....	7
2.3. Betalaínas .....	8
2.3.1. Clasificación .....	11
2.3.2. Propiedades funcionales y su aplicación como colorante .....	
natural .....	12
2.3.3. Métodos de extracción .....	13
2.3.4. Estabilidad .....	14
2.3.4.1. pH .....	14
2.3.4.2. Temperatura .....	15
2.3.4.3. Luz .....	15
2.3.4.4. Actividad de agua ( $a_w$ ) .....	16
2.3.4.5. Oxígeno .....	16
2.4. Separación y purificación .....	17
2.4.1. Cromatografía en capa fina (TLC) .....	17
2.4.2. Intercambio iónico y cromatografía en columna .....	18
2.5. Caracterización .....	18
2.5.1. Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) .....	19
2.5.2. Espectroscopia .....	20
2.5.3. Pruebas químicas .....	21

<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
4.1. Objetivo general .....	25
4.2. Objetivos específicos.....	25
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
5.1. Materiales .....	26
5.1.1. Materia prima .....	26
5.1.2. Equipo.....	26
5.1.3. Equipo analítico .....	27
5.1.4. Reactivos .....	27
5.2. Métodos.....	28
5.2.1. Análisis proximal.....	28
5.2.2. Morfología del fruto (caracterización física) .....	28
5.2.3. Obtención del extracto orgánico total seco .....	29
5.2.4. Extracción de los pigmentos del fruto entero del xoconostle .....	29
5.2.5. Eficiencia de la extracción realizando “N” número .....	
de extracciones.....	31
5.2.6. Extracción de los pigmentos de la pulpa del xoconostle.....	31
5.2.7. Estabilidad de los pigmentos del xoconostle .....	32
5.2.8. Separación de los pigmentos.....	34
5.2.8.1. Cromatografía en capa delgada (TLC) .....	34
5.2.8.2. Cromatografía en columna .....	34
5.2.9. Caracterización de las betalaínas del xoconostle .....	36
5.2.9.1. Caracterización por espectroscopia UV-VIS .....	36
5.2.9.2. Caracterización por Cromatografía de Líquidos de Alta.....	
Presión (HPLC).....	37
5.2.9.3. Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	38
5.2.10. Diseño de experimentos y análisis estadístico .....	39

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
6.1. Análisis proximal del xoconostle .....	40
6.2. Morfología del fruto.....	40
6.3. Extracción de los pigmentos totales del xoconostle entero .....	41
6.3.1. Sistema de extracción I: Disolvente metanol .....	42
6.3.2. Sistema de extracción II: Disolvente etanol .....	44
6.4. Eficiencia de la extracción realizando “N” número de extracciones.....	46
6.5. Estabilidad de las betalainas del xoconostle .....	51
6.5.1. Estabilidad al pH.....	52
6.5.2. Estabilidad a la temperatura y al tiempo de calentamiento.....	53
6.5.3. Estabilidad de los extractos del betabel.....	55
6.5.4. Estabilidad de las betalaínas del xoconostle .....	57
6.6. Separación de los pigmentos .....	61
6.6.1. Cromatografía en capa delgada (TLC) .....	61
6.6.2. Cromatografía en columna evaluada por HPLC .....	62
6.7. Caracterización de los pigmentos.....	63
6.7.1. Caracterización por espectroscopia UV-VIS .....	63
6.7.2. Caracterización por cromatografía líquida de alta.....	
presición (HPLC) .....	65
6.8. Identificación de la estructura por RMN.....	68
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>69</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>71</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>72</b>
<b>Apéndice I</b> .....	<b>83</b>
<b>Apéndice II</b> .....	<b>84</b>
<b>Apéndice III</b> .....	<b>86</b>
<b>Apéndice IV</b> .....	<b>87</b>
<b>Apéndice V</b> .....	<b>89</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Producción agrícola de xoconostle 2005 .....	3
<b>Cuadro 2.</b> Características del xoconostle .....	5
<b>Cuadro 3.</b> Composición nutricional de la cáscara de la tuna del ..... xoconostle ( <i>Opuntia</i> spp.).....	7
<b>Cuadro 4.</b> Principales sustituyentes identificados en betalaínas naturales .....	12
<b>Cuadro 5.</b> Pruebas químicas para diferenciar entre antocianinas y betalaínas .....	19
<b>Cuadro 6.</b> Diseño de experimentos empleado para la extracción .....	
de los pigmentos .....	30
<b>Cuadro 7.</b> Diseño de experimentos empleado para estudio de la .....	
Estabilidad de las betalaínas .....	33
<b>Cuadro 8.</b> Composición proximal del xoconostle entero.....	40
<b>Cuadro 9.</b> Contenido de betacianinas (mg/100 g del fruto fresco) en .....	
extractos de <i>Opuntia joconostle</i> con metanol y etanol .....	41
<b>Cuadro 10.</b> Disolvente: agua ( $\lambda_{\text{máx}}=533$ nm) .....	46
<b>Cuadro 11.</b> Disolvente metanol ( $\lambda_{\text{máx}}=530$ nm).....	47
<b>Cuadro 12.</b> Disolvente: etanol ( $\lambda_{\text{máx}}=475$ nm, 536 nm).....	48
<b>Cuadro 13.</b> Disolvente: agua/metanol (80:20) ( $\lambda_{\text{máx}}=536$ nm) .....	49
<b>Cuadro 14.</b> Disolvente: agua/etanol (80:20) ( $\lambda_{\text{máx}}=534$ nm) .....	50
<b>Cuadro 15.</b> Estabilidad de los pigmentos del xoconostle .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta de xoconostle .....	4
<b>Figura 2.</b> Corte longitudinal del xoconostle .....	4
<b>Figura 3.</b> Imágenes de las características de las <i>Opuntias</i> A) hábito, B) cladodio, C) epidermis, D) aréola, E) espina, F) flor, G) fruto y H) semilla.....	6
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la betalaína (A) Ácido betalámico presente en todas las moléculas de las betalaínas. (B) La estructura representa una betacianina o una betaxantina, dependiendo de los sustituyentes R <sub>1</sub> y R <sub>2</sub> .....	9
<b>Figura 5.</b> Cation diazaheptametina .....	9
<b>Figura 6.</b> Estructura de las betacianinas.....	10
<b>Figura 7.</b> Estructura de las betaxantinas .....	11
<b>Figura 8.</b> Estructura de la betanina elucidada por RMN <sup>1</sup> H obtenida en..... CF <sub>3</sub> COOH .....	21
<b>Figura 9.</b> Diagrama de bloques para la extracción de los..... pigmentos de la pulpa del xoconostle.....	32
<b>Figura 10.</b> Gráficos de superficie de respuesta para la extracción de los pigmentos del xoconostle ( <i>Opuntia joconostle</i> ) con agua:ácido cítrico:metanol a pH 5.0. A) agua/metanol (80:20), B) agua/metanol (60:40) y C) agua/metanol (20:80) .....	43
<b>Figura 11.</b> Gráficos de superficie de respuesta para la extracción de los pigmentos del xoconostle ( <i>Opuntia joconostle</i> ) con agua:ácido cítrico:etanol a pH 5.0. A) agua/etanol (80:20), B) agua/etanol (60:40) y C) agua/etanol (20:80).....	45
<b>Figura 12.</b> EA para extractos con agua .....	46
<b>Figura 13.</b> EA para extractos con metanol. ....	47
<b>Figura 14.</b> EA para extractos con etanol .....	48
<b>Figura 15.</b> EA de extractos agua/metanol (80:20) .....	49
<b>Figura 16.</b> EA de extractos agua/etanol (80:20) .....	50
<b>Figura 17.</b> Espectro de absorción del extracto de betalaínas totales del xoconostle .....	51

<b>Figura 18.</b> Espectro de absorción UV-VIS del extracto del xoconostle.....	
a diferente pH .....	52
<b>Figura 19.</b> Estabilidad del pigmento a pH 3, 5 y 7 .....	53
<b>Figura 20.</b> Estabilidad del betabel a diferente temperatura, tiempo y pH. A) pH 3, B) pH 5, C) pH 7.....	56
<b>Figura 21.</b> Estabilidad del xoconostle a diferente temperatura, tiempo y pH.....	
A) pH 3, B) pH 5, C) pH 7.....	58
<b>Figura 22.</b> Esquema propuesto de la degradación de las betalaínas del xoconostle por efecto de la temperatura (Herbach, et al., 2004).....	60
<b>Figura 23.</b> Cromatografía por capa fina en sílica gel .....	61
<b>Figura 24.</b> Cromatogramas de HPLC por elusión de gradiente después de Cromatografía en columna por amberlita, sephadex, sílica gel y el extracto de referencia (apéndice II).....	63
<b>Figura 25.</b> Espectros de absorción UV-VIS de (1) Ciclo dopa, (2) betaxantina y (3) betacianina de tuna roja, tuna amarilla, tuna blanca, betabel y el xoconostle.....	64
<b>Figura 26.</b> Espectro de UV-VIS del betabel de 200 $\mu$ L a 1200 $\mu$ L.....	64
<b>Figura 27.</b> Curva de regresión de los máximos de absorbancia del betabel .....	64
<b>Figura 28.</b> Cromatogramas de HPLC por elusión isocrática de los .....	
pigmentos del Betabel (A) $\lambda$ = 484 nm, (B) $\lambda$ = 535 nm .....	65
<b>Figura 29.</b> Cromatogramas HPLC por elusión de gradiente de los .....	
pigmentos del betabel (A) $\lambda$ = 484 nm, (B) $\lambda$ = 535 nm.....	66
<b>Figura 30.</b> Cromatogramas HPLC por elusión de gradiente con un tiempo de retención entre 8-15. De la tuna roja (A) $\lambda$ = 484 nm (B) $\lambda$ = 535 nm y el xoconostle (C) $\lambda$ = 484nm (D) $\lambda$ = 535 nm).....	68

## RESUMEN

En la presente investigación se realizó la extracción y caracterización de las principales betalaínas del *Opuntia joconostle* (xoconostle). Para la extracción, se emplearon principalmente, dos sistemas de disolventes: agua/metanol y agua/etanol. Un diseño estadístico de Box-Behnken con tres variables: concentración del disolvente (0 - 80%, v/v), temperatura (5 - 30 °C) y tiempo de tratamiento (10 - 30 min), fue usado para cada sistema de extracción. La máxima estabilidad del extracto se observó a pH 5, por esta razón todos los ensayos se ajustaron a este valor con una solución de ácido cítrico (0.1 N). Posteriormente, los extractos fueron filtrados a través de una membrana de 0.45 µm y analizados por espectroscopia UV-VIS (200-650 nm). Con la ayuda de la metodología de superficie de respuesta se encontró que para una temperatura de 15 °C, un tiempo de 10 min y una concentración de agua/metanol 80:20, se tuvo la máxima concentración del pigmento (92 mg/100 g de fruto). La mayor estabilidad del pigmento, en un intervalo de pH de 3 a 7, se observó a una temperatura de 60 °C. En el espectro de absorción UV-VIS se observaron dos picos máximos de absorción, uno en la región UV entre 270-280 nm, característico de la estructura ciclo-DOPA y el segundo en el visible alrededor de 535-538 nm, dependiendo del sistema de disolventes.

La separación y caracterización de las betalaínas del xoconostle se realizó por cromatografía TLC, cromatografía en columna y por HPLC, los cromatogramas fueron comparados con los obtenidos del *Beta vulgaris* (betabel) y de tres especies de *Opuntia ficus-indica*. Las principales betalaínas del xoconostle caracterizadas por las técnicas usadas de cromatografía en columna, fueron betanina, isobetanina, betanidina o filocactina e isobetanidina pudiendo detectarse también las betaxantinas en forma natural.

Debido a que los pH ácidos favorecen la estabilidad de los pigmentos estudiados, se perfilan como colorantes naturales potenciales en alimentos ácidos.

## ABSTRACT

In this research, it was carried out the extraction and characterization of the main betalains from *Opuntia joconostle* (xoconostle). The extracts, were obtained by using two different water-solvent systems: methanol and ethanol. A Box-Behnken design of three variables: solvent concentration (0 - 80%, v/v), temperature (5 - 30 °C) and treatment time (10 - 30 minutes) was used for the extraction. Since the highest stability of pigments was found to be at pH 5, all assays were adjusted at this pH value, adding a citric acid solution (0.1 N). Then, the extracts were filtered through a 0.45 µm filter and analyzed spectrophotometrically from 200 to 650 nm. All treatments were performed randomly and the data were analyzed by response surface methodology. The highest level of pigments extraction (92 mg/100 g fresh fruit) was obtained when a water/methanol (80:20) system was used, at 15 °C for 10 minutes. The pigment extracts showed a maximum stability at 60 °C in a range of pH 3-7. The UV-VIS absorption spectra display two absorption maxima peaks, one in the UV-range between 270 and 280 due to the cyclo-DOPA structure and a second one in the visible region around 535-538 nm, depending on the solvent system.

Separation and characterization of xoconostle's betalains were carried out by TLC, column chromatography and HPLC. The chromatograms were compared with those of the *Beta vulgaris* (beet root) and two species of *Opuntia ficus-indica*. The main betalains of xoconostle, characterized by chromatographic techniques, were betanin, isobetanin, betanidin or filocactin and isobetanidin. In addition, it was possible to detect betaxanthins in minor concentration.

Because the acid pH enhances the stability of xoconostle's betalains, they could be used as potential natural colorants in acid foodstuffs.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las cactáceas han sido motivo de investigación en nuestro país debido a sus múltiples usos, hoy en día son una opción para las comunidades de zonas áridas y semiáridas de nuestro país como fuente de ingresos para los campesinos. La gran importancia que presentan se visualiza desde diversos puntos de vista, como el ecológico, por su resistencia a la sequía debido a su fácil adaptación y tipo de metabolismo. Sus frutos persisten sobre los cladodios hasta un año o más, sin caer ni deteriorarse. Previenen la erosión de los suelos por su sistema radicular, reteniendo mayor cantidad de tierra con sus raíces. También pueden ser utilizados en la elaboración de mermeladas, productos deshidratados y conservas (Sepúlveda et al., 2000). Sin embargo, su aprovechamiento se limita sólo al consumo del fruto fresco, debido a las dificultades que presenta durante el manejo poscosecha y al desconocimiento de su potencial alimentario (Vitoria-Matos y Corbelli-Moreno, 2001). Entre los metabolitos mayoritarios encontrados en los frutos de las cactáceas se han señalado a las betalaínas (Vitoria-Matos et al., 2001, Vitoria-Matos y Moreno-Álvarez, 2001); compuestos solubles en agua, derivados del ácido betalámico, como los responsables de su coloración roja característica. En el área de los alimentos se han empleado principalmente como colorantes naturales; en la formulación de helados de crema, yogurt de fresa, bebidas deshidratadas, bebidas frías y gelatinas (Vitoria-Matos et al., 2001, Vitoria-Matos y Moreno-Álvarez, 2001). Sin embargo, por ser moléculas de gran sensibilidad física y química, su aprovechamiento integral en la industria alimentaria es limitado.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Xoconostle (*Opuntia joconostle* spp.)

Esta especie, conocida comúnmente como nopal, es una cactácea resistente a la sequía. Desde el punto de vista económico, es de gran importancia en la gastronomía mexicana al utilizarse en ensaladas, mermeladas, dulces cristalizados, jugos, refrescos caseros, vinos, entre otros (Borrego y Burgos, 1986, Filardo et al., 2006). Este tipo de cactácea tiene también importancia en la alimentación animal, tanto por sus pencas como por sus frutos, que son sumamente nutritivos (Fрати et al., 1990, Herwood, 1990 y Fernández et al., 1992). El fruto del xoconostle presenta una cáscara muy gruesa de 1.5 cm de espesor, es comestible, ácida y con poca pulpa (Bravo, 1978, Colunga et al., 1986 y Reyes-Agüero et al., 2005). Su nombre común se deriva del náhuatl “*xococnochtli*” que significa tuna ácida (Santamaría, 1992). Se han identificado ocho especies diferentes de esta cactácea (*O. duranguensis* Britton y Rose, *O. heliabravoana* Scheinvar, *O. imbricata* DC., *O. joconostle* A. Web *O. leucotricha* DC., *O. matudae* Scheinvar, *O. velutina* F. A. C. Weber y *O. zamudioi* Scheinvar). Estas nopaleras crecen de forma silvestre, en regiones semi-áridas de México, pero otras especies son cultivadas en jardines y plantaciones comerciales (Scheinvar, 1999; Vigueras y Portillo, 2001, Casas y Barbera, 2002, Reyes-Agüero et al., 2005).

El xoconostle (*Opuntia joconostle* c.v.) se cultiva en gran parte del centro del estado de Jalisco, en el bosque tropical caducifolio y en el matorral xerófilo en los municipios de San Juan de los Lagos, Tepatitlán y Valle de Guadalupe y en menor abundancia en el bosque tropical caducifolio que ocupa la zona central y parte de la costa de Jalisco y en el bosque espinoso hacia la región sureste (Arreola, 1988). Se localiza también en el estado de San Luís Potosí en La Pila, en suelo de origen ígneo (Arias y Martínez, 1988); en los municipios de Tecámac y Acomalán, Estado de México; en el estado de Hidalgo en los municipios de Pachuca, Zempoala y en

el Valle del Mezquital, y en la zona árida Queretana-Hidalguesa (Scheinvar, 1988). En la región del Valle del Mezquital, estado de Hidalgo, el *Opuntia joconostle* c.v. “Burro”, es el xoconostle más utilizado por los pobladores, mientras que el *O. matudae* c.v. “Rosa” y c.v. “Blanco” son poco aprovechados y no se comercializan (Mayorga et al., 1988).

En el Altiplanicie Meridional, la superficie sembrada de la tuna *Opuntia* en el continente americano es de 50,000 hectáreas (Mondragón y Pérez, 1994). En México se cultivan 1,031 hectáreas de xoconostle y su producción es de 10,148 toneladas totales. En Pachuca, Hidalgo, su producción es de 184 toneladas, lo que representa 1.87% de xoconostle total (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Producción agrícola de xoconostle 2005**

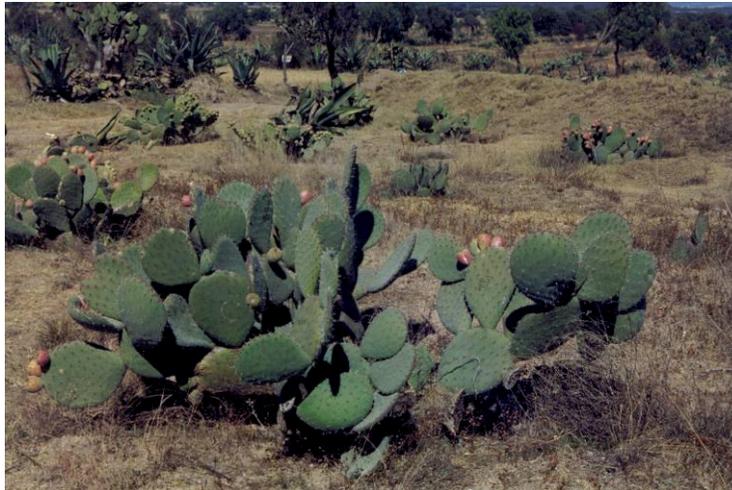
Delegación	Municipio	Superficie Sembrada (HA)	Superficie Cosechada (HA)	Producción (TON)	Rendimiento (TON/HA)	Precio Medio Rural (\$/TON)	Valor de la producción (miles de pesos)
Hidalgo	Mixquiahuala	14.00	12.00	180.00	15.00	2,500.00	450.00
Hidalgo	Pachuca	184.00	14.00	33.30	2.37	2,063.06	68.70
Edo. Mex.	Zumpango	832.00	832.00	9,422.96	11.32	2,200.00	20,730.51
<b>TOTAL</b>		1,030.00	858.00	9,636.26	11.23	2,205.13	21,249.21

Fuente: Servicio de información y estadística Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA 2004-2005.

## 2.2. Características del xoconostle

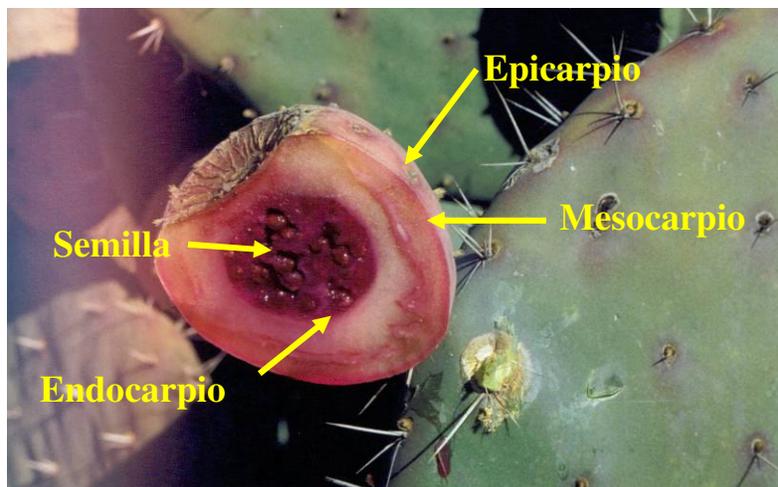
Las cactáceas productoras de xoconostle, así como también las de tuna, pueden ser arbóreas de 4.1 hasta 8 m de alto, arbustivas altas de 4 m de alto, subarbustivas de 1 m de alto o rastreras (Figura 1).

Morfológicamente, el fruto del xoconostle se caracteriza por tener una forma ovoide o esférica, con una depresión en el extremo distal, llamada también “cicatriz umbilical” que es el lugar donde se encontraba el perianto de la flor (Bravo, 1978).



**Figura 1. Planta de xoconostle (Fuente propia)**

En la Figura 2, se presenta un corte longitudinal del xoconostle, donde se observa que esta constituido por el epicarpio formado por la cáscara; el mesocarpio y endocarpio, conformados por la pulpa y las semillas, que se encuentran unidas y compactadas firmemente por un compuesto mucilaginoso. A diferencia de la tuna dulce, en el xoconostle ácido hay un alto desarrollo de la pared del fruto (cáscara) y un pobre contenido de pulpa (Filardo et al., 2006, Scheinvar, 2001).



**Figura 2. Corte longitudinal del xoconostle (Fuente propia).**

En el cuadro 2 se presentan las características principales del xoconostle *Opuntia mutadae* Scheinvar estudiada por Filardo et al., (2006), especie que se cultiva en el Estado de Hidalgo.

**Cuadro 2. Características del xoconostle**

<b><u>Hábito</u></b>	Arbustiva, de 1.5 a 4.5 m de altura.
<b><u>Tronco</u></b>	Definido y ancho.
<b><u>Cladodio o artículo</u></b>	Angostamente abovados, de 20-25 cm de largo y de 10-15.5 cm de ancho, verde-azuloso algo grisáceo, generalmente con manchas purpúreas alrededor de las aréolas.
<b><u>Epidermis</u></b>	Con tricomas y papilas microscópicas. A simple vista es glabra.
<b><u>Aréolas</u></b>	De 13-14 cm series espiralazas, distantes aproximadamente 2 cm entre sí. Fieltro grisáceo-negruzco. Glóquidas de 2-3 mm de largo, castaño-rosado.
<b><u>Espinas</u></b>	De 1-8 cm generalmente en todas las aréolas, son desiguales, de 0.7 a 3.5 cm de largo, muy delgadas, flexibles, de color blanco grisáceo o amarillento, con el ápice translúcido.
<b><u>Flor</u></b>	De 5-7 cm de largo y hasta 8 cm de diámetro en la antesis, amarilla brillante con manchas rojas, pasando con el tiempo a rosado y rojo.
<b><u>Fruto</u></b>	Elipsoide a periforme, de 2.5-4.0 cm de largo y 1.5-2.5 cm de ancho, externamente verde-purpúreo y pulpa rosa-rojiza, con cicatriz umbilical profunda; aréolas sin espinas, con lana grisáceo y glóquidas castaño-rojizos.
<b><u>Semillas</u></b>	Discoides, de 4 mm de largo, 3 mm de ancho y 2 mm de espesor aproximadamente, blanquecinas con tonos rosados; arilo lateral de ancho irregular, bien marcado; taza de hilo lateral, poco profunda.

Fuente: Filardo et al., 2006.

En la figura 3, se muestran imágenes de las características mencionadas anteriormente.



A)



B)



C)



D)



E)



F)



G)



H)

Figura 3. Imágenes de las características de las *Opuntias*. A) hábito, B) cladodio, C) epidermis, D) aréola, E) espina, F) flor, G) fruto y H) semilla (Filardo, et al., 2006 y fuente propia).

### 2.2.1. Propiedades del fruto del xoconostle

Entre las características fisicoquímicas del fruto destaca su acidez, el pH se encuentra entre 3.7 y 4.5, de ahí su nombre, lo que restringe su consumo. A diferencia de la tuna dulce, que presenta valores entre 5.2 y 6.0, este valor tan bajo de pH, permite que el fruto del xoconostle pueda almacenarse por periodos más largos sin presentar descomposición (Bravo, 1978). Este factor también favorece que el fruto permanezca más tiempo en la planta, incluso varias semanas después de que el fruto ha madurado. Las características nutricionales de la cáscara del fruto en polvo se presentan en el cuadro 3; como se observa, el pH de las diferentes variedades de la tuna del xoconostle se encuentra entre 2.9 y 4.5 (Bedolla et al., 2003). Las frutas silvestres como la *O. leucotricha* DC, y las sembradas en jardines como la *O. joconostle* A. Weber variedad xoconostle, presentaron un alto contenido de lípidos, carbohidratos, fibra y potasio, mientras que las de plantaciones comerciales de *O. matudae* Scheinvar c.v. Cuaresmero tuvieron un bajo contenido de proteínas, lípidos y potasio (Harlan, 1992).

**Cuadro 3. Composición nutricional de la cáscara de la tuna del xoconostle (*Opuntia* spp.)**

Atributo	<i>O. duranguensis</i>	<i>O. joconostle</i> Colorado	<i>O. joconostle</i> Xoconostle	<i>O. leucotricha</i>	<i>O. matudae</i> cv. Blanco	<i>O. matudae</i> cv. Cuaresmeño	Promedio
pH	3.3	3.1	3.2	4.5	2.9	3.1	3.3
Proteína cruda (%)	2.9	3.1	3.2	3.2	3.4	2.2	3.0
Lípidos (%)	0.8	0.9	1.0	1.2	0.8	0.8	0.9
Carbohidratos (%)	12.0	9.1	10.7	15.0	9.3	14.9	11.8
Fibra (%)	14.4	11.6	16.7	13.5	14.4	14.4	14.2
Na (mg/100g)	14.4	5.9	12.1	10.9	4.8	10.5	9.8
K (mg / 100g)	1,746.8	1,943.3	3,328.7	3,277.0	1,742.2	1,451.8	2,248.3

Fuente: García- Pedraza et al., 2005.

En la medicina tradicional, el xoconostle, es utilizado para reducir el nivel de colesterol, como laxante, en problemas de colitis, pérdida de peso corporal y para reducir la presión de la sangre (Gurrieri et al., 2000). Algunas aplicaciones probadas científicamente son: el tratamiento de la gastritis, aterosclerosis, diabetes e hipertrofia prostática, disminuye el nivel de estrés oxidativo y la circulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos (Herwood, 1990,

Frati et al., 1990, Palevitch et al., 1993, Tesoriere et al., 2005, Stintzing et al., 2005). Se utiliza también en tratamientos patológicos severos como dolor reumático, fragilidad capilar, vejez del hígado y úlceras (Muñoz de Chávez et al., 1995, Domínguez-López, 1995).

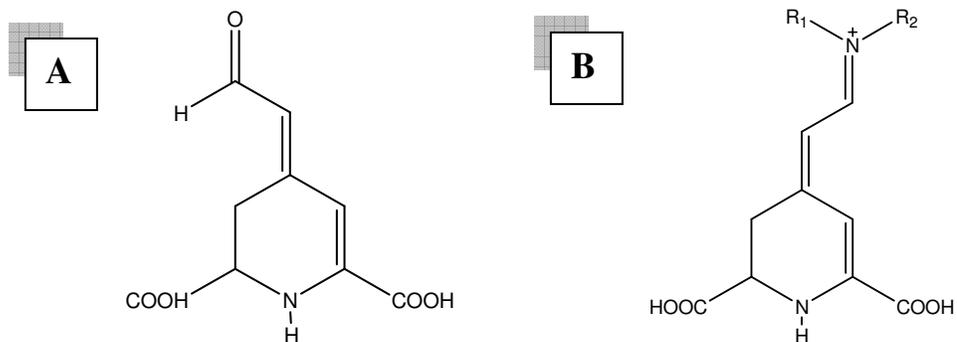
El color que se observa en el fruto del xoconostle, se debe a la presencia de pigmentos hidrosolubles característicos de las tunas de cactáceas conocidas como betalaínas, identificadas en estas especies por varios autores (Forni et al., 1992, Stintzing et al., 1999, Stintzing et al., 2002); al igual que otros compuestos como las antocianinas, imparten color a flores, frutas, vegetales y granos y se localizan en los plástidos o en las vacuolas de las plantas (Delgado-Vargas et al., 2000, Fossen et al., 2002, Mazza y Miniati, 1993, Steglich y Strack, 1990, Strack et al., 2003). Sin embargo, por la ruta bioquímica que siguen en el organelo, las antocianinas y las betalaínas, no se han encontrado en la misma planta, ya que el precursor de la antocianina es la fenilalanina y de la betalaína es la tirosina (Stintzing y Carle, 2004, Steglich y Strack, 1990, Stafford, 1994, Clement y Mabry, 1996). El color de la cáscara esta influenciado por el estado de madurez del fruto (Nerd y Mizrahi et al., 1999).

### **2.3. Betalaínas**

El término "betalaínas" fue establecido por Mabry y Dreiding en 1968, basado en consideraciones estructurales y biogenéticas. En un sentido estricto, las betalaínas no pertenecen a los alcaloides porque son de naturaleza ácida debido a la presencia de varios grupos carboxilo. Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles y existen como sales en las vacuolas de las células vegetales. Las plantas que contienen estos pigmentos se limitan a 10 familias del orden Centrospermae.

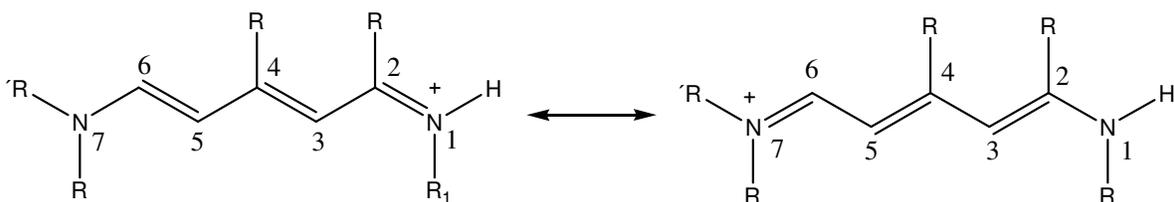
Químicamente, la definición de betalaínas abarca a todos los compuestos con estructuras basadas en la fórmula general mostrada en la figura 4; por lo tanto, son derivados de la condensación de una amina primaria o secundaria con el

ácido betalámico (Piatelli, 1981, Strack et al., 1993). El cromóforo de la betalaína se puede describir como un compuesto protonado 1,2,4,7,7-pentasustituido y el sistema 1,7-diazaheptametina (Piatelli et al., 1976b).



**Figura 4. Estructura química de la betalaína. (A) Ácido betalámico presente en todas las moléculas de las betalaínas. (B) La estructura representa una betacianina o una betaxantina, dependiendo de los sustituyentes  $R_1$  y  $R_2$  (Böhm y Rink, 1988)**

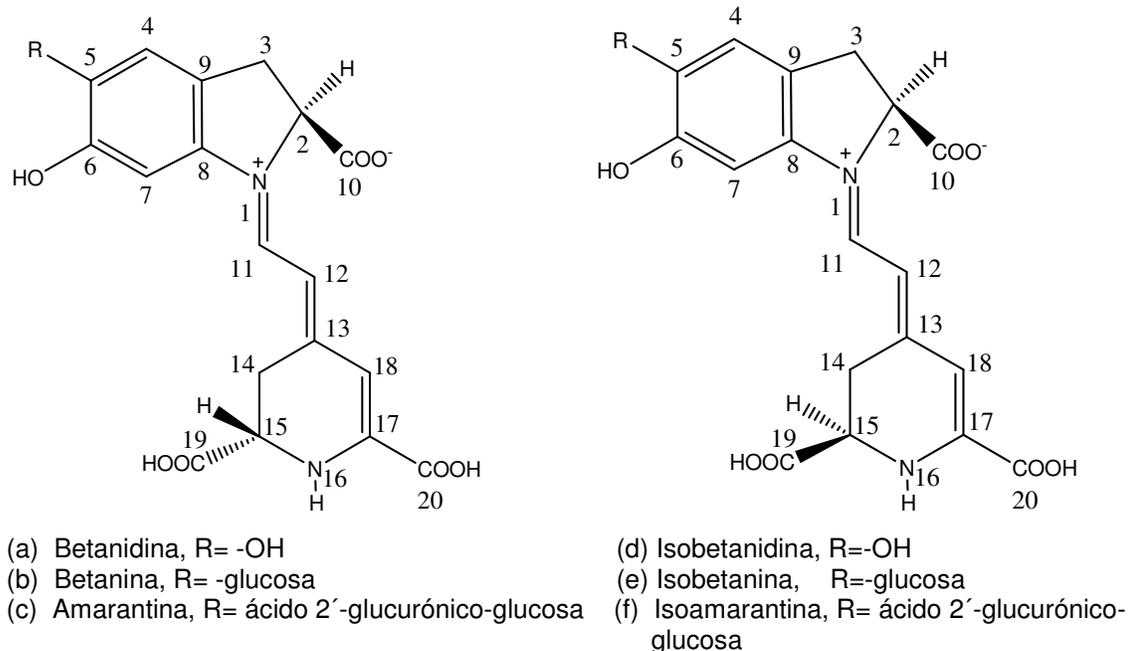
Se conocen más de 50 betalaínas, y todas tienen la misma estructura básica, en la cual  $R_1$  y  $R_2$  puede ser un hidrógeno o un sustituyente aromático. Su color se le atribuye a los dobles enlaces conjugados en resonancia (Böhm y Rink, 1988) del núcleo aromático-R sustituido con el cromóforo del 1,7-diazaheptametinamino (Figura 5).



**Figura 5. Cation diazaheptametina (Fennema, 1996)**

Cuando 'R no amplía la conjugación del sistema 1,7-diazaheptametina, el compuesto exhibe un máximo de absorción de luz a aproximadamente 480 nm, característico de las betaxantinas amarillas. Si la conjugación se amplía a 'R, el máximo de absorción de luz se desplaza aproximadamente a 540 nm,

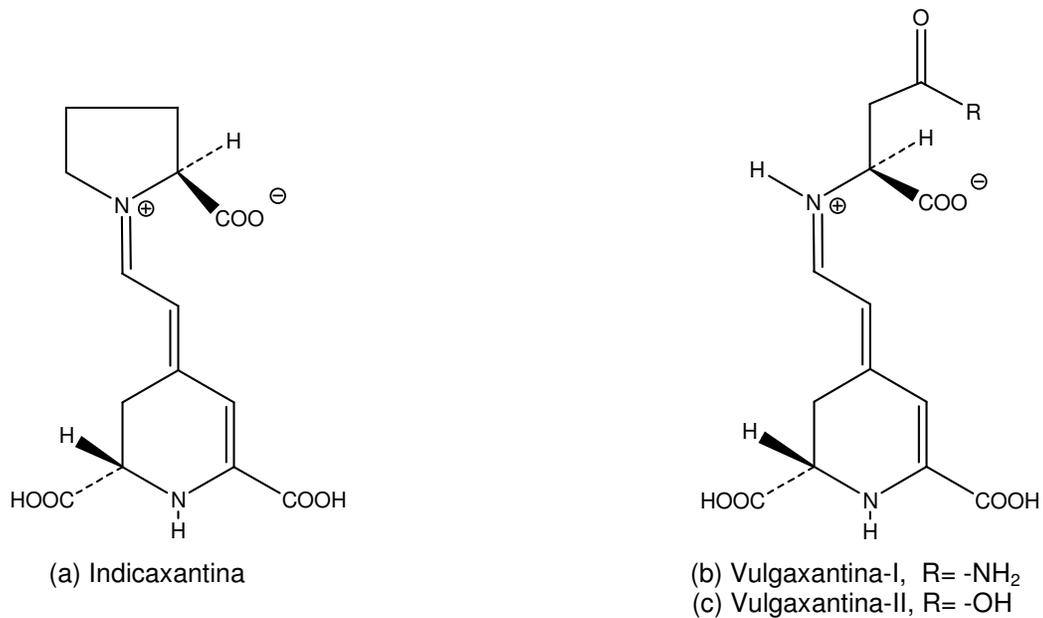
característico de las betacianinas rojas. Las betacianinas son ópticamente activas porque tienen 2 carbonos quirales C-2 y C-15 (Figura 6). La hidrólisis de la betacianina produce la betanidina (Figura 6) o el epímero en C-15 isobetanina (Figura 6d) o una mezcla de las dos agliconas isómeras. Las diferencias entre betacianinas se deben a su residuo glucósido. Entre las principales hortalizas que contienen betalaínas se encuentran: el betabel (*Beta vulgaris*) y el amaranto (*Amaranthus tricolor*) (Cai et al., 1998). Las principales betacianinas del betabel son la betanina y la isobetanina (Figura 6b, e), en tanto que el amaranto contiene amarantina e isoamarantina (Figura 6c, f). Las betalaínas más estudiadas han sido las del betabel.



**Figura 6. Estructura de las betacianinas (Fennema, 1996)**

La primera betaxantina aislada y caracterizada fue la indicaxantina (Figura 7a). Estructuralmente, estos pigmentos son muy similares a las betacianinas. Las betaxantinas difieren de las betacianinas en que el grupo indol es sustituido por un aminoácido. En el caso de la indicaxantina el aminoácido es la prolina. Del betabel se han aislado dos betaxantinas, vulgaxantina I y II (Figura 7b, c). Ambas difieren

de la indicaxantina en que la prolina ha sido sustituida por glutamina o ácido glutámico, respectivamente.



**Figura 7. Estructura de las betaxantinas (Fennema, 1996)**

Aunque hasta la fecha se han caracterizado pocas betaxantinas, considerando el número de aminoácidos existente, es probable que exista un gran número de betaxantinas diferentes.

### 2.3.1. Clasificación

Las betacianinas y las betaxantinas pueden ser clasificadas con base a sus estructuras químicas. Las estructuras de las betacianinas muestran variaciones en su azúcar (5-O-D-Glucosa) y los grupos del acilo, mientras que las betaxantinas muestran la conjugación con una amplia gama de aminas (glutamina) y aminoácidos (tirosina) en sus estructuras. En el cuadro 4, se presentan algunas betalaínas identificadas.

**Cuadro 4. Principales sustituyentes identificados en betalaínas naturales**

<b>Betalaína<sup>a</sup></b>	<b>Residuo<sup>b</sup></b>	<b>Bibliografía</b>
<b>Aglicona</b>		
Betanidina	-	Piatelli, 1981.
<b>Grupo de la Betanina</b>		
Betanina	5-O-Glc	Böhm y Rink, 1988.
Filocactina	5-O-Glc	Piatelli y Minale, 1964.
Lamprantina-I	5-O-Glc	Bokern y Strack, 1988.
<b>Grupo de la Amarantina</b>		
Amarantina	5-O-Glc-2-O-GlcU	Strack et al., 1993.
Celosianina II	5-O-Glc-2-O-GlcU	Steglich y Strack, 1991.
<b>Bugambilia</b>		
Bugambilia	5-O-Glc-2-O-GlcU	Piatelli e Imperato, 1970.
<b>Grupo de la Gomprenina</b>		
Gomprenina-I	6-O-Glc	Minale et al., 1966.
<b>Betaxantinas</b>		
DOPAxantina	DOPA	Piatelli, 1976b.
Indicaxantina	Prolina	Piatelli, 1976b.
Portulaxantina-II	Glicina	Trezzini y Zrýd, 1991.
Vulgaxantina	Ácido glutámico	Piatelli, 1981.

<sup>a</sup> El nombre fue estandarizado por Strack et al., (1993).

<sup>b</sup> Abreviaciones: **Glc** β-D-Glucosa; **GlcU** β-D-ácido glucorónico; **DOPA** 3,4 dihidroxifenilalanina.

Fuente: (Delgado-Vargas et al., 2000)

### **2.3.2. Propiedades funcionales y su aplicación como colorante natural**

Debido a su alto poder antioxidante y su capacidad para absorber radicales libres, se ha reportado recientemente, que las betalaínas presentes en el betabel y en frutos de cactáceas, pueden beneficiar la salud del ser humano (Stintzing et al., 2005, Castellar et al., 2003, Butera et al., 2002, Kujala et al., 2001, Pedreño y Escribano 2001). Empleándose principalmente en el tratamiento de enfermedades

inflamatorias, cardiovasculares, cáncer, asma, artritis, estrés oxidativo, inflamación intestinal, y otras asociadas con el envejecimiento (Tesoriere et al., 2005, Allegra et al., 2005, Cai et al., 2003, Frati et al., 1990).

Por su alto poder tintorial (dos veces más que los colorantes artificiales) y la tonalidad del color sin cambio en un intervalo amplio de pH (de 3 a 7), las betalaínas son compuestos tecnológicamente muy atractivos como colorantes naturales en alimentos (Von Elbe, 1975; Cai et al., 1998, 2001, Cai y Corke 1999, Stintzing et al., 2000, 2003).

### **2.3.3. Métodos de extracción**

Para la extracción de este tipo de pigmentos, la fruta o planta cruda, generalmente, se macera o se muele en agua fría o a temperatura ambiente. En la mayoría de los casos, es necesario el uso de soluciones acuometanólicas o acuoetanólicas (del 20 hasta el 50%, v/v) para alcanzar la extracción completa (Piatelli, 1981). Algunas veces, hay necesidad de realizar una fermentación aerobia del jugo (*Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*) para reducir los azúcares libres y aumentar el contenido de la betacianina (Pourrat et al., 1988). En ambos procedimientos, la inactivación de las enzimas que degradan el pigmento se realiza por un tratamiento térmico a 70°C durante 2 minutos, sin embargo, este podría destruir algunos pigmentos. Las betacianinas se pueden precipitar por una ligera acidificación con ácido clorhídrico o con etanol acidificado (0.4 hasta el 1% HCl). Para la separación de betaxantinas se puede adicionar una solución acuosa de etanol al 95% (Bilyk, 1979, Piatelli y Minale, 1964).

La degradación de la betanina puede ocurrir rápidamente y su destrucción puede evitarse trabajando a bajas temperaturas y protegiéndola de la luz (Strack et al., 1993).

### **2.3.4. Estabilidad**

La estabilidad de las betalaínas es influenciada fuertemente por el pH, la temperatura, la luz, la actividad de agua ( $a_w$ ) y la presencia de oxígeno (Cai et al., 2001, Pedreño, et al., 2001, Castellar et al., 2003, Herbach et al., 2004, Tesoriere et al., 2005). La estabilidad de las betalaínas, es un factor que restringe su uso como colorante en alimentos (Von Elbe, 1975, Jackman y Smit, 1996). De acuerdo con estas características, las betalaínas se pueden utilizar en alimentos con una corta vida de anaquel, procesados por un tratamiento de calor mínimo, envasándolos y colocándolos en un lugar seco, bajo niveles reducidos de luz, oxígeno, y humedad (Rayner, 1993, Von Elbe, 1977).

Cuando las betalaínas se utilizan como colorantes del alimento, el color es una preocupación importante. Los principales factores que afectan la estabilidad del pigmento se describen a continuación.

#### **2.3.4.1. pH**

El color de las betalaínas no es afectado por el pH entre 3.5 a 7. Las soluciones de betalaínas en este intervalo de pH mostraron un espectro visible similar para betacianinas y betaxantinas. La longitud de onda ( $\lambda$ ) máxima para betacianinas se encuentra entre 537 y 538 nm, mientras el máximo para betaxantinas se encuentra aproximadamente a 475 nm. A pH ácido (3.5),  $\lambda$  se desplaza a un valor más bajo; por arriba de pH 7,  $\lambda$  cambia a un valor más elevado; fuera de este intervalo, la intensidad del espectro visible decrece. Huang y Von Elbe (1987), mostraron que el pH óptimo para la estabilidad máxima de la betanina en presencia de oxígeno está entre 5.5 y 5.8. Las soluciones de betabel mostraron la máxima estabilidad a pH=5.5, correspondiente al pH normal del betabel fresco. Adicionalmente, la vulgaxantina I fue más estable en un intervalo de pH de 5 a 6, y mostró mayor estabilidad en extractos no purificados, mientras la estabilidad óptima del pigmento en polvo reconstituido tuvo lugar a pH 5.7.

#### **2.3.4.2. Temperatura**

La temperatura es un factor crítico en la estabilidad de la betalaína (Drdák y Vallová, 1990). La degradación térmica de la betanina ha sido evaluada por varios autores (Altamirano et al., 1993, Drdák y Vallová, 1990, Huang y Von Elbe, 1987, 1985, Saguy et al., 1978, Von Elbe et al., 1974). Observando que al calentar soluciones de betanina se produce una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento y surge la aparición de un color ligeramente marrón. La degradación térmica de la betanina en presencia de oxígeno sigue una cinética de primer orden (Von Elbe et al., 1974), pero en su ausencia la cinética es diferente (Attoe y Von Elbe, 1985). Si se calienta la betanina a altas temperaturas (mayores de 60 °C) y por tiempos prolongados (mayores a una hora), se acelera la hidrólisis de este compuesto en solución, produciendo ácido betalámico y el ciclodopa-5-O-glucósido como productos intermedarios, sin embargo, esta reacción es parcialmente reversible de acuerdo con el pH. De acuerdo con Saguy et al (1984), las energías de activación para la hidrólisis del pigmento fueron de 17 a 21 Kcal/mol por la degradación térmica, mientras que para la regeneración se encuentran entre 0.6 y 3.5 Kcal/mol (Huang y Von Elbe 1987).

Altamirano et al., (1993), reportaron que en sistemas modelo de agua/etanol la estabilidad de la betanina fue muy baja, debido al ataque nucleofílico del grupo N = CH presente en la estructura de la betanina. El etanol es un agente nucleofílico fuerte que al tener una alta densidad de electrones en el átomo de oxígeno disminuye la estabilidad de la betanina.

#### **2.3.4.3. Luz**

Von Elbe et al., (1974), encontraron que el índice de degradación de la betanina aumentó 15.6%, después de su exposición a la luz del sol a 15°C. La degradación de las betalaínas expuestas a la luz sigue una cinética de primer orden. Además, se observó que cuando las betacianinas fueron expuestas a luz fluorescente, la degradación presentada fue mayor a pH = 3.0 ( $k = 0.35 \text{ días}^{-1}$ ) que a pH = 5.0 ( $k =$

0.11 días<sup>-1</sup>). Por otra parte, en ausencia de luz las betacianinas fueron más estables ( $k = 0.07$  días<sup>-1</sup>). Sapers y Hornstein, (1979) Attoe y Von Elbe, (1981) demostraron que la relación entre la estabilidad de la betalaína y la intensidad de la luz en un intervalo de 2200 a 4400 lux es inversamente proporcional. Esto se explica cuando ocurre la excitación de electrones  $\pi$  de los cromóforos del pigmento a un estado más energético ( $\pi^*$ ) por la absorción de luz visible, ocasionando una reactividad más alta o una energía de activación baja para la molécula ( $E_A = 25$  Kcal-mol<sup>-1</sup> en oscuridad y 19.2 Kcal-mol<sup>-1</sup> en la luz). El efecto de los rayos UV y la irradiación gamma en la estabilidad de la betanina fue reportada por Aurstad y Dahle (1973). La destrucción total del pigmento ocurrió cuando el pigmento fue tratado por 120 h de radiación UV o con 100 krad de radiación gamma. Sin embargo, el mecanismo de la fotodegradación para las betalaínas no ha sido determinado con certeza.

#### **2.3.4.4. Actividad de agua ( $a_w$ )**

La actividad de agua es uno de los factores que más influye en la estabilidad de las betalaínas y el color de los alimentos que las contienen. La mayor estabilidad del pigmento (cinética de primer orden) fue encontrada en alimentos o sistemas modelo con un bajo contenido de humedad y de  $a_w$ , atribuible a la movilidad reducida del reactivo o a la solubilidad limitada del oxígeno (Simón et al., 1993). Cohen y Saguy (1983), reportaron que la estabilidad del pigmento decreció hasta en un orden de magnitud cuando el  $a_w$  aumentó de 0.32 a 0.75.

#### **2.3.4.5. Oxígeno**

La presencia de oxígeno causa el oscurecimiento del producto y la pérdida del pigmento. Von Elbe et al., (1974), almacenaron en solución buffer a pH 7, betanina, bajo atmósfera de aire y nitrógeno hasta por 6 días a 15°C; observando que la degradación del color aumentó hasta un 15% cuando la betanina fue expuesta al aire. La betanina reaccionó con el oxígeno molecular, produciendo la

degradación del pigmento en soluciones saturadas con oxígeno (Attoe y Von Elbe, 1985). La degradación cinética en atmósfera de aire o de oxígeno siguieron un modelo de primer orden, pero en ausencia del oxígeno su comportamiento se desvía de este modelo. De acuerdo a lo reportado por Attoe y Von Elbe, (1985), la degradación de la betanina es una reacción parcialmente reversible y se ha recomendado que para aumentar la estabilidad del pigmento es necesario colocar las muestras en atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno. Así, las soluciones calentadas de betanina (pH 4.75, 130 minutos, 15°C) con bajos niveles de oxígeno mostraron un incremento (de 54 a 92%) en la retención de betanina (Huang y Von Elbe, 1987).

## **2.4. Separación y purificación**

Para la separación y purificación de los pigmentos vegetales se emplean diversas técnicas analíticas, entre las que destacan: la cromatografía en placa fina y en columna.

### **2.4.1. Cromatografía en capa fina (TLC)**

Debido a que las betalaínas, presentan bajos coeficientes de retención ( $R_f$ ), la cromatografía en capa fina (TLC) no es la técnica preferida para su separación. Sin embargo, Bilyk et al., (1981), desarrollaron un sistema preparativo de TLC en una placa revestida con celulosa (0.5 mm) usando dos fases móviles: isopropanol-etanol-agua-ácido acético en una relación de 6:7:6:1 (v/v) para la primer mezcla de disolventes y para la segunda fase se emplearon los mismos disolventes pero en una proporción de 11:4:4:1 (v/v). Cuando se incorporó el ácido en este sistema de disolventes, la movilidad de la betalaína en la placa se facilitó debido a la protonación del grupo carboxílico de la betacianina. El anión carboxilato proporciona un sistema eléctricamente neutro por su interacción con el nitrógeno cuaternario. El mismo efecto se observó para las betaxantinas (Bilyk et al., 1981). En estas condiciones, se lograron separar también las betaxantinas en placas de

celulosa dietilaminoetil. Como disolventes se emplearon: isopropanol-agua-ácido acético (13:4:1 v/v). No fue necesario utilizar un indicador, porque la separación de los pigmentos se observó claramente en la placa de TLC (Strack et al., 1993).

#### **2.4.2. Intercambio iónico y cromatografía en columna**

Las resinas de intercambio iónico son ampliamente empleadas en el fraccionamiento y separación de este tipo de pigmentos, así como la filtración en gel (Piatelli y Minale, 1964b). Un procedimiento simple y rápido consiste en colocar el extracto de la planta en contacto con la resina de intercambio iónico que permite fijar las betalaínas por adsorción (interacción no iónica). Posteriormente, la resina se lava con una solución acuosa de ácido clorhídrico (0.1 % de v/v) y los pigmentos se lavan con agua, proceso seguido de la separación final en una columna cromatográfica (Sephadex G-15 y G-25).

Si se desconocen las propiedades cromatográficas y de electroforesis de la planta se pueden comparar con los reportados en la literatura para los pigmentos ya conocidos, por ejemplo para betacianinas: Piatelli y Minale, 1964; para betalaínas acetiladas: Minale et al., 1966; para betalaínas en general: Piatelli e Imperato, 1970, Von Elbe, 1987, Piatelli, 1981 y Steglich y Strack, 1991.

#### **2.5. Caracterización**

En la mayoría de los casos es imposible distinguir visualmente entre antocianinas y las betalaínas. Sin embargo, la fuente del extracto es un indicador para saber si hay presencia de betalaínas o de antocianinas, recordando que en las plantas la presencia de una es mutuamente excluyente de la otra (Stintzing y Carle, 2004). Es importante recordar que las betalaínas son pigmentos característicos en miembros de las plantas Cariofilares. Strack et al., (1993), desarrollaron pruebas preliminares para distinguir fácilmente entre antocianinas y betalaínas (cuadro 5) empleando el color exhibido a diferente pH y temperatura.

**Cuadro 5. Pruebas químicas para diferenciar entre antocianinas y betalainas**

<b>Prueba</b>	<b>Antocianinas</b>	<b>Betalainas</b>
Adición de KOH, NaOH	Cambio de color a verde-azulado	Cambio de color a amarillo
Electroforesis	Movimiento al cátodo	Movimiento al ánodo
Adición de la solución HCl caliente	Color-estable	Destrucción del color
Extracción con alcohol amílico	Positivo, a bajo pH	No, en ningún pH
Cromatografía en capa fina: <ul style="list-style-type: none"><li>• n-butanol-ácido acético-agua</li><li>• disolventes acuosos</li></ul>	Movilidad moderada Movilidad baja/intermedia	No Alta movilidad
Cromatografía en columna: resinas cationicas	Elusión con agua	Elusión con metanol/ mezclas de HCl

Fuente: Piatelli, (1981), Strack et al, (1993).

### **2.5.1. Cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC)**

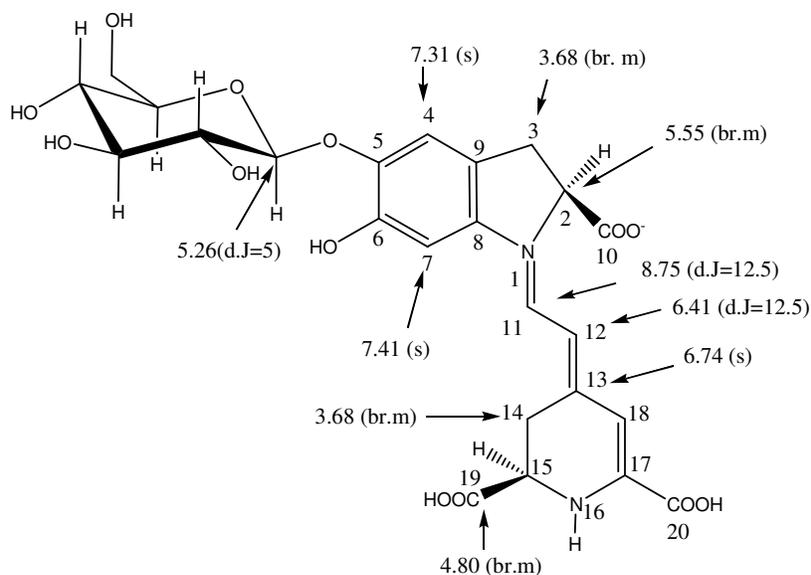
Debido a que las betacianinas y las betaxantinas tienen propiedades similares, la cromatografía de HPLC es un invaluable método para su separación y análisis. La identificación tentativa de las betalainas puede ser deducida de su comportamiento cromatográfico, y comprobada mediante el análisis de su espectro de absorción y tiempo de retención ( $t_R$ ).

La primera aplicación de esta técnica en betalainas fue realizada por Vicent y Scholz (1978). Para ello emplearon una columna  $C_{18}$ , con una elusión en gradiente utilizando tetrabutilamonio como fase móvil. Las columnas de soporte más útiles fueron  $C_8$  y  $C_{18}$ , en fase reversa con tamaños de partícula entre 3 a 10  $\mu m$ , mientras que los disolventes más usados han sido agua/metanol o mezclas de agua/acetonitrilo, acidificado con ácido acético, fórmico, o ácido fosfórico (Strack et al., 1993). El orden de elusión en HPLC de los pigmentos cristalinos puros fue como se describe: betanina, betanidina, isobetanina e isobetanidina (Schwartz y Von Elbe, 1980). Esta evidencia fue basada en la hidrólisis ácida previa de los glucósidos para romper el enlace glucosídico y obtener las agliconas, ocurriendo la isomerización de la betanina en isobetanina (Vicent y Scholz, 1978).

Pourrat et al., (1988), analizaron un extracto fermentado de betabel por cromatografía HPLC usando una columna de fase reversa C<sub>18</sub> y como fase móvil agua/metanol, en este caso reportaron que el orden de elusión fue betanina, isobetanina, betanidina, isobetanidina y prebetanina; para betacianinas y vulgaxantina I, seguida por la vulgaxantina II para las betaxantinas. Otro ejemplo de la caracterización de la betaxantina fue realizado por Trezzini y Zryd (1991). El ácido betalámico fue conjugado con aminoácidos proteicos y no proteicos para obtener una serie de betaxantinas. Trezzini y Zryd (1991), describieron las características de retención para 15 pigmentos naturales como portulaxantina-I, miraxantina-II, vulgaxantina-I, entre otros. Tales productos se podrían utilizar como estándares en HPLC para pigmentos desconocidos.

### **2.5.2. Espectroscopia**

El análisis de las betalaínas, como el de otros compuestos coloridos, se ha basado en la espectroscopia UV-visible. De hecho, como se mencionó anteriormente, las betacianinas violetas-rojas absorben alrededor de una longitud de onda máxima de 540 nm, mientras que las betaxantinas amarillas lo hacen aproximadamente a 480 nm. Los estudios iniciales se apoyaron sólo en esta metodología para la identificación de las betalaínas. Además, las modificaciones estructurales de las betalaínas han sido analizadas por espectroscopia UV-visible (Mabry, 1980, Mabry y Dreiding, 1968, Piatelli, 1981). Sin embargo, la espectroscopia de los años 80 mostró un gran progreso y la caracterización química de este tipo de estructuras es hoy en día complementada con técnicas como: HPLC, espectrometría de masas (MS) y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La caracterización de las betaninas, lamprantinas, cellosianinas, neobetainas, entre otras, se logró gracias a estas metodologías (Steglich y Strack, 1991, Strack et al., 1993, Stuppner y Egger, 1996). Un ejemplo de la aplicación de RMN donde se observan los desplazamientos químicos de carbono 13 se presenta en la Figura 8.



**Figura 8. Estructura de la betanina elucidada por RMN  $^1\text{H}$  obtenida en  $\text{CF}_3\text{COOH}$**

Stintzing et al., 2004, aislaron el pigmento rojo de la pitaya permitiendo la adquisición de datos de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  y espectros en dos dimensiones (2D RMN).

Sin embargo, aún no hay datos recientes en la identificación de betalaínas en xoconostle.

### 2.5.3. Pruebas químicas

Los métodos químicos para la síntesis y la degradación de pigmentos son importantes en la investigación de las betalaínas. Algunos de éstos métodos fueron descritos detalladamente por Strack et al., (1993).

La hidrólisis ácida (HCl acuoso diluído) de la **betanina** resultó en una mezcla de ambas agliconas, betanidina y su epímero 15R isobetanidina; esta mezcla puede ser separada fácilmente por métodos cromatográficos. Por otra parte, la hidrólisis catalizada por enzimas produce solamente la betanidina (Piatelli y Minale, 1964b).

Además, el calentamiento por tiempo prolongado produce la separación de la betanina en ácido betalámico y el cicloDOPA 5-O-glucósido (Piatelli, 1976b). Después de la fusión alcalina, la betanidina fue dividida en el ácido 4-metilpiridina-2,6-ácido dicarboxílico, 5,6-dihidroxi-2,3-dihidroxi-indol y el ácido fórmico; estos fragmentos elucidaron la estructura del carbono de la betanidina. La epimerización en C<sub>15</sub> también se observó cuando la betanidina se trató con un álcali diluido o una solución acuosa de ácido cítrico (5%, v/v); en ambas reacciones se obtuvo una relación de betanina-isobetanina (3:2), mientras que la isobetanina produjo una relación de 2:3 bajo las mismas condiciones de tratamiento. Adicionalmente, la hidrólisis alcalina durante la deacilación de la gomprenina-II a gomprenina-I, produjo una relación de betacianina-isobetacianina de 1:1.

Por otra parte, los análisis para **betaxantinas** involucran metodologías de análisis para aminoácidos. Las betaxantinas pueden hidrolizarse con una solución acuosa de ácido clorhídrico (1N) o una solución de amoníaco (0.6 N), para obtener el ácido betalámico y aminoácidos libres (Piatelli, 1981). La reacción de la betanina en solución alcalina de amonio con un exceso de aminoácidos puede ser empleada para la síntesis de betaxantinas. Esta reacción es seguida observando los incrementos de máxima absorción de la betaxantina (475 nm) o los decrementos en el máximo de absorción de la betanina (540 nm). Así, la vulgaxantina-II puede obtenerse a partir de la betanina en una solución de amonio (0.6 N) con un exceso de ácido glutámico (10 M); este método también se ha utilizado para la síntesis de la indicaxantina, miraxantina, y de otras betaxantinas. Sin embargo, las betaxantinas sintéticas pueden obtenerse con serina, fenilalanina, treonina y lisina ( Trezzini y Zrýd, 1991).

La oxidación de la **indicaxantina** con el ácido peroxiacético da como resultado el ácido L-aspártico, una reacción usada para demostrar la configuración 11S de esta betaxantina. La betanina tiene la configuración 15S en el anillo de la dihidropiridina, porque la indicaxantina fue obtenida por el intercambio del aminoácido de la betanina. Esto está de acuerdo con el aislamiento del ácido S-

betalámico después de la degradación de muchas betaxantinas con tratamiento alcalino (Strack et al., 1993). El tratamiento de la betanidina con diazometano dió como resultado el di-O-metilneobetanidina dimetil éster con un buen rendimiento, exhibiendo una absorción en 403 nm, que se puede cambiar a 513 nm, con la adición de ácido (Piatelli, 1981). Los neo-derivados también pueden obtenerse cuando las betaxantinas son tratadas con diazometano, mientras que la esterificación con  $\text{CH}_3\text{OH-HCl}$  o  $\text{CH}_3\text{H-BF}_3$ , produce los ésteres normales.

Por los antecedentes revisados, se puede indicar que se tiene una base para la caracterización y estudios de estabilidad de las betalaínas, principales pigmentos que se tienen en la pulpa del *Opuntia joconostle* (xoconostle), estos estudios previos servirán como datos comparativos de los hallazgos que se pretenden obtener en esta investigación.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El xoconostle (*Opuntia joconostle* c.v.) presenta gran potencial económico debido a sus múltiples usos como verdura, condimento, fruta fresca, dulces cristalizados, mermeladas y bebidas (Scheinvar, 1999, Borrego y Burgos, 1986, López, 1977). Además, se le atribuyen propiedades medicinales y terapéuticas: anticancerígenas (atribuidas a la alta cantidad de pigmentos y antioxidantes que posee), hipoglucémicas, control del colesterol y reducción de peso corporal (Tesoriere et al., 2005, Allegra et al., 2005). También es utilizado como antigripal por su alto contenido de ácido ascórbico (3.8-6.5 mg/100g del fruto fresco) (Sánchez y Ortega, 1996).

A pesar de estas cualidades y de los estudios realizados por diversos investigadores (Castellanos et al., 1999, De León et al., 1999, Flores, 1997, Sánchez y Figueroa, 1998), para mejorar la producción y comercialización del xoconostle, su uso está restringido a determinadas regiones geográficas (Zavaleta-Beckler et al., 2001). Algunas especies incluso, son poco aprovechadas y no se comercializan, siendo poco rentables para el agricultor. Lo anterior, motiva la investigación de nuevas aplicaciones, dando a estos frutos un valor agregado para que los costos de producción sean rentables. En esta investigación, se propone la caracterización de los principales pigmentos del xoconostle evaluando diferentes sistemas de disolventes para su extracción, además de evaluar su estabilidad al pH, la temperatura y el tiempo de calentamiento, para indicar posteriormente las condiciones de procesamiento en las que son estables y sugerir condiciones de almacenamiento cuando este fruto sea utilizado.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- Extraer y caracterizar los principales pigmentos del *Opuntia joconostle* c.v. (xoconostle).

### **4.2. Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones óptimas de pH, temperatura-tiempo y disolventes apropiados para extraer los pigmentos presentes en el fruto del xoconostle.
- Determinar la estabilidad de los extractos al pH, temperatura y tiempo de calentamiento.
- Caracterizar los pigmentos de la pulpa del xoconostle por UV-VIS, TLC, y cromatografía HPLC.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

**5.1.1. Materia Prima.** Como materia prima en esta investigación, se utilizó el fruto del nopal xoconostle *Opuntia joconostle* Weber in Diguet, de la familia Botánica Cactaceae, cultivado en noviembre del 2004 en Zempoala, Hidalgo, México. La identificación taxonómica fue realizada por el Departamento de Botánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, con números de registro: 1297 y 1298, de los ejemplares de la tuna roja y tuna rosa, de la colección de frutas y semillas de las cactáceas etnobiológicas (apéndice I).

### 5.1.2. Equipo

- Balanza Analítica. OHAUS Precision Advanced. Precisión  $\pm 0.1$  g. USA.
- Balanza Analítica. OHAUS Explorer Precisión  $\pm 0.0001$  g. USA.
- Estufa eléctrica. J. M. Ortiz D6F774 150 °C 110 Volts 15 Ampers. México.
- Mufla Lindberg. 220 Volts. México
- Digestor y destilador Microkjeldahl Marca Labconco USA.
- Parrilla con agitación Barnstead - Thermolyne Nuova II Modelo No. SP18425, 120 Volts, 7.3 A 60 Hz. USA.
- Medidor de pH Corning/ ion meter 450. USA.
- Despulpador Reeves Pulper Division Columbus. Modelo 185SC. USA.
- Tubos de RMN. Wilmad 5mm, 7IN L Ultra-imperial grade. USA.
- Secador de charolas. F. J. Stockes Corp. PA. USA.
- Molino de discos. The Bauer BROS. CO. Springfield. USA.
- Centrífuga Internacional. Motor 0.75 HP 50/60 Hz. USA.
- Vortex Thermolyne. Modelo M37615 DUBUQUE. IOWA 52001 USA.
- Rotavapor RE-50. Yamato Scientific CO., LTD. Japón.
- Lámpara UV. Upland, CA 91786 USA. Model UVS-18 ASSEMBLY.

### 5.1.3. Equipo analítico

- Refractómetro Master-T 2312, Atago Automatic. Japón.
- Espectrofotómetro UV-VIS, Varian, Modelo Cary 50. USA.
- Equipo 1. HPLC Waters. Equipado con una bomba Modelo 600, un detector UV modelo Dual 2487, un inyector Loop de 20 ml y un automuestreador de 717 Modelo 71P. El software del equipo fue Milenio 32. La columna utilizada fue una C<sub>18</sub> de 3.9 x 300 mm (µBondapak, tamaño de partícula 10 µm). No. Serie W0051B086, Irlanda.
- Equipo 2. HPLC Beckman System Gold. Equipado con dos bombas modelo 126, un detector de diodos modelo 168, un inyector Loop de 20 ml. El software del equipo Gold Nouveau Versión 1.72. La columna utilizada fue Merck Lichrosorb RP-18 (5 µm), con columna pre-empacada RT -250-4 y una guarda columna Phenomenex C<sub>18</sub> (ODS, actadoyl) 4 mm x 3.0 mm ID.
- Espectrómetro de RMN, Varian Mercury 300 MHz. USA.

### 5.1.4. Reactivos

- Amberlita XAD-7. Fluka 06445
- Sephadex G-25. Sigma-Aldrich G2580-50G
- Silica Gel malla 60 (0.040-0-063 mm). Cromatografía en columna Merck 1.09385.1000
- Celite 545. J. T. Baker 3371-01
- Placas Cromatográficas de sílica gel de aluminio. Aldrich Z19329-1
- Placas Cromatográficas de sílica gel e indicador UV. Sigma-Aldrich Z122726-25EA
- Dimetil sulfóxido-*d*<sub>6</sub>, 99.8 % D, espectroscopia RMN. Merck 1.03424.0100
- Cloroformo-*d*, 99.8 átomos % D, espectroscopia RMN. Aldrich 151813-100g
- Metanol HPLC. Fermont H6122
- Agua HPLC. J. T. Baker 4218-03

## 5.2. Métodos

### 5.2.1 Análisis proximal

El análisis proximal del xoconostle (*Opuntia joconostle* c.v.) se realizó de acuerdo a las normas oficiales mexicanas (NOM) y a las normas mexicanas (NMX), como se describe a continuación:

- **Humedad.** Se estudió de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-116-SSA1-1994.
- **Lípidos.** Determinados por el método reportado en la NOM-086-SSA1-1994.
- **Proteína.** El nitrógeno total fue determinado de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2002.
- **Cenizas.** Fueron calculadas después de la calcinación de acuerdo al método reportado en la NMX-F-607-NORMEX-2002.
- **Carbohidratos.** Calculados por diferencia.

### 5.2.2. Morfología del fruto (caracterización física)

Para esta determinación, se seleccionaron veinte frutos sanos de xoconostle, cada uno de ellos se pesó y con la ayuda de un calibrador vernier (Truper, México) se midió la altura y el espesor de cada fruto. Posteriormente, se separó la cáscara, la pulpa y las semillas de la muestra de xoconostle (20.0 Kg), para determinar el porcentaje promedio de cada componente en el fruto estudiado.

**pH de la pulpa.** Se determinó en el equipo Corning/ion meter 450 calibrado previamente con soluciones reguladoras estándar de pH 4,7 y 10 (Corning).

**Actividad de agua ( $a_w$ ).** Se obtuvo mediante un equipo AquaLab (USA), las determinaciones fueron realizadas por triplicado tomando como muestra sólo la pulpa de xoconostle.

### **5.2.3. Obtención del extracto orgánico total seco**

**Limpieza.** Previo a la extracción, el fruto de xoconostle se colocó en una solución de cloro (5 ppm) para desinfectarlo. **Secado.** Posteriormente, se drenó el agua y se cortó el fruto longitudinalmente en pequeñas secciones para facilitar su secado. La muestra se colocó en charolas de acero inoxidable en una estufa (F. J. STOKES, USA) a vacío a una temperatura máxima de 40 °C, durante 24 horas, para evitar la degradación del pigmento. **Molienda.** Finalmente, el xoconostle seco se molió en un molino de discos (BAUER, USA) y se almacenó en bolsas de polietileno en un lugar fresco, protegido de la luz. Obteniendo por diferencia de peso del extracto orgánico total.

### **5.2.4. Extracción de los pigmentos del fruto entero del xoconostle**

Para determinar la influencia de los disolventes en la eficiencia de la extracción, se emplearon seis disolventes: metanol, etanol, alcohol amílico, alcohol propílico acetona y acetato de etilo. Cada uno de los disolventes anteriores se mezclaron en diferentes proporciones (0 – 80%, v/v) con agua bidestilada. Para la extracción se diluyó 1.0 g del polvo del fruto entero en 20 ml de la solución, el pH fue ajustado a 5 con una solución al 1% de ácido cítrico este se utilizó para mantener un pH ácido y evitar la descomposición del pigmento, ya que a un pH básico se decolora. La muestra se agitó durante 1 minuto a velocidad máxima en un Vortex (Thermolyne, USA) y se colocó en un baño maría a la temperatura y tiempo especificados en el diseño de experimentos (Cuadro 6). La solución se centrifugó

a 3500 r.p.m. durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, el sobrenadante fue decantado y filtrado a través de una membrana (Millipore), tamaño de poro de 45  $\mu\text{m}$ . La eficiencia de la extracción fue evaluada cuantitativamente midiendo la absorbancia en cada una de las etapas de extracción y para cada sistema de disolventes mediante un espectrofotómetro UV-Vis (Varían, USA). El contenido del pigmento (mg del pigmento/100 g del fruto fresco) en el extracto, fue determinado como se muestra en la ecuación 1, usando el coeficiente de extinción para betacianina expresada como betanina, componente mayoritario en los extractos, a 535 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1120$ ) de acuerdo al método propuesto por Kujala et al., (2001).

$$\text{mg de betacianina} = \frac{A}{bE} \quad (1)$$

Donde:  $A$  es la absorbancia del extracto

$b$  es la longitud de la celda = 1.0 cm

$E$  es el coeficiente de extinción para betanina a 535 nm

**Cuadro 6. Diseño de experimentos empleado para la extracción de los pigmentos**

Variables		Niveles de variación				
		-1	0	1		
$x_1$ = Concentración del disolvente (% v/v)		0	40	80		
$x_2$ = Temperatura de extracción ( $^{\circ}\text{C}$ )		5	17.5	30		
$x_3$ = tiempo de extracción (min)		10	20	30		
<b>Diseño de experimentos</b>						
Ensayo	Variables codificadas			Variables experimentales		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_1$	$x_2$	$x_3$
1	-1	-1	0	0	5	20
2	-1	1	0	0	30	20
3	1	-1	0	80	5	20
4	1	1	0	80	30	20
5	-1	0	-1	0	15	10
6	-1	0	1	0	15	30
7	1	0	-1	80	15	10
8	1	0	1	80	15	30
9	0	-1	-1	40	5	10
10	0	-1	1	40	5	30
11	0	1	-1	40	30	10
12	0	1	1	40	30	30
13	0	0	0	40	15	20
14	0	0	0	40	15	20
15	0	0	0	40	15	20

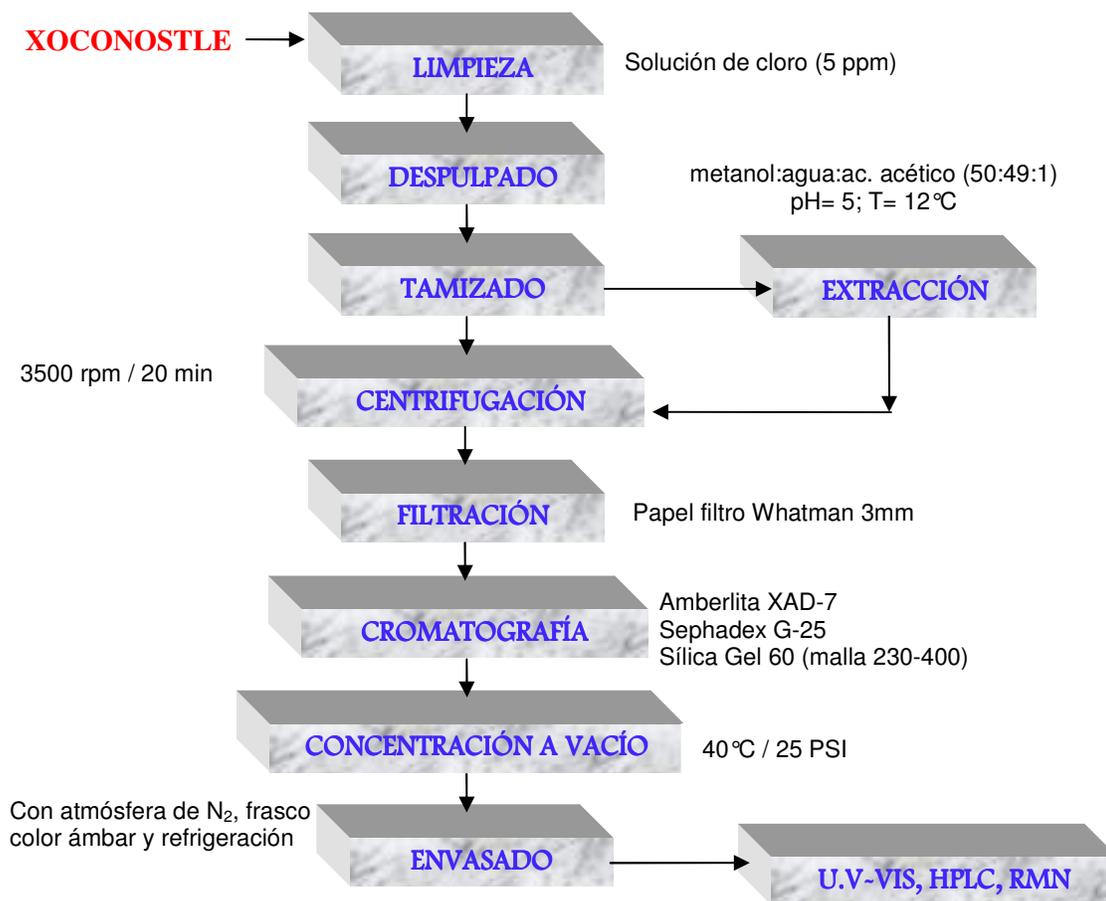
### **5.2.5. Eficiencia de la extracción realizando “N” número de extracciones**

Para determinar el solvente o sistema de disolventes apropiados para la extracción de las betalaínas contenidas en el xoconostle, se realizaron varias extracciones del xoconostle en polvo. Primeramente, se disolvieron 0.5 g en 20 ml de la solución, agitando en un vortex (Thermolyne, USA), luego se centrifugó a 5500 rpm durante 10 min, y se filtró el sobrenadante; enseguida, se agregaron 5 ml del mismo disolvente, y se realizó la misma operación “N” veces hasta extraer por completo el pigmento o hasta que la matriz vegetal se agotó. Esta evaluación se realizó, con agua, metanol, etanol y una combinación de agua/metanol y agua/etanol (80:20), los resultados fueron utilizados para establecer las condiciones óptimas en la extracción de los pigmentos del xoconostle.

Como se describe posteriormente para los análisis de estabilidad y caracterización del pigmento se realizó la extracción sólo de la pulpa del xoconostle para obtener mejores rendimientos y un mayor porcentaje del pigmento.

### **5.2.6. Extracción de los pigmentos de la pulpa del xoconostle**

**Preparación de la muestra.** Previo a la extracción, el fruto del xoconostle se colocó en una solución de cloro (5 ppm) para desinfectarlo. Posteriormente, se drenó el agua y se cortó el fruto longitudinalmente en dos secciones para facilitar la remoción de la cáscara y la pulpa. Para separar la pulpa de las semillas, la muestra (1.0 Kg) se colocó en una despulpadora de Laboratorio (Langsenkamp, Indiana Laboratory Pulper, USA). Posteriormente, la pulpa libre de semillas se pasó por una criba para retirar las partículas gruesas; obteniendo una pulpa líquida espesa, que fue utilizada para realizar la extracción de acuerdo al siguiente diagrama de bloques (Figura 9).



**Figura 9. Diagrama de bloques para la extracción de los pigmentos de la pulpa del xoconostle**

### 5.2.7. Estabilidad de los pigmentos del xoconostle

La estabilidad de los pigmentos presentes en los extractos fue determinada a diferentes valores de pH (1-11). Las mediciones de espectroscopia UV-VIS fueron realizadas con un equipo de UV-visible (Varian Cary 50, USA). Se encontró que en el intervalo de pH 3-7 los valores de absorbancia se mantuvieron estables, por lo que se midió su estabilidad a la temperatura (90 °C) a diferentes tiempos (20, 40 y 60 min) y diferentes valores de pH (3, 5 y 7).

A partir de los resultados preliminares anteriores, se determinaron los valores mínimo y máximo de las variables experimentales, para evaluar estadísticamente la estabilidad del pigmento al pH, a la temperatura y el tiempo de calentamiento. Para ello, se disolvieron 0.5 g del pigmento deshidratado extraído de la pulpa del xoconostle, en 10 ml de agua bidestilada, de acuerdo a las condiciones establecidas en el diseño experimental (cuadro 7).

**Cuadro 7. Diseño de experimentos empleado para el estudio de estabilidad de las betalainas**

Variables		Niveles de variación				
		-1.682	-1	0	1	1.682
$x_1 =$	Tiempo (min)	1	16	38	60	75
$x_2 =$	Temperatura (°C)	6.25	25	52.5	80	98.75
$x_3 =$	pH	1.64	3	5	7	8.36
<b>Diseños de experimentos</b>						
Ensayo	Variables codificadas			Variables experimentales		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_1$	$x_2$	$x_3$
1	-1	-1	-1	16	25	3
2	-1	-1	1	16	25	7
3	-1	1	-1	16	80	3
4	-1	1	1	16	80	7
5	1	-1	-1	60	25	3
6	1	-1	1	60	25	7
7	1	1	-1	60	80	3
8	1	1	1	60	80	7
9	-1.682	0	0	1	52.5	5
10	1.682	0	0	75	52.50	5
11	0	-1.682	0	38	6.25	5
12	0	1.682	0	38	98.7	5
13	0	0	-1.682	38	52.5	1.64
14	0	0	1.682	38	52.5	8.36
15	0	0	0	38	52.5	5
16	0	0	0	38	52.5	5
15	0	0	0	38	52.5	5
16	0	0	0	38	52.5	5
17	0	0	0	38	52.5	5
18	0	0	0	38	52.5	5
19	0	0	0	38	52.5	5
20	0	0	0	38	52.5	5

El efecto de cada uno de los parámetros en la estabilidad del pigmento fue evaluado cualitativamente midiendo la absorbancia en el visible, mediante un espectrofotómetro UV-VIS (Varían, USA), de cada uno de los ensayos y se comparó con el extracto de betabel (sin calentamiento previo a pH=5).

## **5.2.8. Separación de los pigmentos**

### **5.2.8.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)**

Las muestras se colocaron en una placa de sílica gel (Sigma–Aldrich), con la ayuda de un capilar (2-3 dosis) y se dejó secar a temperatura ambiente para que el diámetro de la muestra no fuera mayor a 0.5 cm. Para la separación de los componentes del extracto del xoconostle, se probaron disolventes polares (agua, dimetil sulfóxido, etanol, acetato de etilo, acetona), no polares (hexano, éter, cloroformo, cloruro de metileno), ácidos (ácido cítrico al 5%) y básicos (hidróxido de sodio al 1%), la separación del pigmento se realizó a simple vista por la coloración roja que presentaba. El revelado de las placas se realizó utilizando una lámpara UV (Upland, USA) de 254 nm y vapores de yodo o ácido sulfúrico al 10%.

### **5.2.8.2. Cromatografía en columna**

Para todos los análisis cromatográficos se utilizó el pigmento deshidratado, extraído de la pulpa del xoconostle como se describió en el diagrama de bloques de la figura 9.

Para la cromatografía en columna se emplearon columnas de vidrio tipo flash de 2 cm de diámetro interior y 25 cm de altura, empacadas con tres diferentes fases estacionarias: a) Amberlita de absorción XAD-7, b) Sephadex G-25 y c) Sílica gel 60, como se describe a continuación.

#### **a) Amberlita de absorción XAD-7**

Recomendada para remover proteínas, mucílagos y pectinas de los solutos de bajo peso molecular presentes en la pulpa del xoconostle, el extracto previamente disuelto en la solución agua/metanol (50:50), se hizo pasar a través de una columna empacada con “amberlita XAD-7”, activada previamente con agua bidestilada (pH 7). Como eluyente se utilizó una solución de agua/metanol (50:50). El flujo fue continuo obtenido por la fuerza de gravedad. Se obtuvieron fracciones de 10 ml, que fueron recolectadas en frascos color ámbar de 35 ml. Las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía en columna fueron evaluadas por TLC y posteriormente aquellas fracciones que presentaron un coeficiente de retención ( $R_f$ ) similar en la cromatografía en capa delgada, fueron concentradas en un rotavapor (Yamato, Japón).

#### **b) Sephadex G-25-80**

El extracto obtenido del xoconostle descrito en la figura 9, se pasó por la columna empacada con “sephadex G-25-80” con un diámetro de partícula de 20-80 micras (cromatografía de gel filtración), que por su alto grado de entrecruzamiento permite fraccionar mezclas de polisacáridos, polipéptidos, proteínas globulares (1000-5000 MW) y ácidos nucleicos (Armarego y Perrin, 1997). El empaque de la columna se efectuó después de hidratar el gel durante 24 horas en agua bidestilada desgasificada durante 60 minutos con una bomba de vacío. Una vez preparada la columna, se agregó el pigmento disuelto en 5 ml de metanol. Como eluyente se utilizaron 500 ml de agua. El flujo fue continuo, obtenido por la fuerza de gravedad. Se obtuvieron fracciones de 5 y 10 ml, que fueron recolectadas en frascos color ámbar de 50 ml. Las fracciones obtenidas fueron evaluadas por cromatografía en capa delgada y aquellas fracciones que presentaron un  $R_f$  similar fueron concentradas en un rotavapor (Yamato, Japón).

### **c) Sílica gel 60**

Además de las columnas anteriores, se utilizó una columna de sílica gel 60 (0.040-0.063 mm), empacada con 100 ml de etanol. El extracto se colocó en un vaso de precipitados de 50 ml y se disolvió en metanol. A esta solución se agregaron 7g de sílica gel, posteriormente el metanol fue evaporado de la solución para concentrar el pigmento en la sílica cuidando que no hubiera trazas de humedad para no afectar la elusión. Enseguida, el pigmento se agregó a la columna formando una capa delgada uniforme, eluyendo inicialmente con etanol al 95%, luego con metanol al 95% y finalmente con metanol/agua (80:20) acidificado (pH 3.2), para obtener fracciones de 6-10 ml en frascos color ámbar de 50 ml, que fueron concentradas en el rotavapor (Yamato, Japón) a sequedad, para su posterior estudio.

Las fracciones obtenidas de la separación de los pigmentos por cromatografía en columna se analizaron por HPLC, de acuerdo al método reportado por Fernández-López, et al., (2002), para las cactáceas. Las condiciones experimentales se describen a continuación:

Equipo 1. HPLC con un detector de UV (Dual Waters), monitoreado a una longitud de onda de 535 nm. Método isocrático, con un flujo de 2 ml por min, con un tiempo de ensayo de 20 min. La columna (C<sub>18</sub> µBondapak, tamaño de partícula 10 µm). El disolvente de elusión para el método de separación fue el siguiente: CH<sub>3</sub>OH /0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (18:82, v/v) ajustando a un pH de 2.75 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

## **5.2.9. Caracterización de las betalaínas del xoconostle**

### **5.2.9.1. Caracterización por espectroscopia UV-VIS**

La caracterización de las betalaínas se realizó por espectroscopia UV-VIS. El espectro de absorción de las betalaínas se comparó con espectros de absorción del betabel, tuna roja, tuna amarilla y tuna blanca.

Las muestras deshidratadas, previamente purificadas del xoconostle y del betabel, se disolvieron (0.01 g) en un matraz aforado de 10 ml, para su caracterización por espectroscopia UV-VIS (250-600 nm). En el caso de la tuna roja, amarilla y blanca, se extrajeron los pigmentos de la pulpa, siguiendo la metodología descrita en el diagrama de bloques de la figura 9. El extracto de las tunas se concentró a 10 y 20 ml, seguida de una filtración con papel cromatográfico, del extracto líquido obtenido, se pesaron 0.5 g aforando a 25 ml. Una vez obtenidas las soluciones aforadas, se tomaron 3 ml y se filtraron a través de una membrana de Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , para obtener su espectro de absorción UV-VIS y compararlo con los dos anteriores.

La cuantificación de las betalaínas del xoconostle, se realizó también por esta técnica, utilizando el pigmento del betabel previamente purificado como referencia.

La extracción del pigmento de betabel se realizó de acuerdo al método descrito en la figura 9. Las fracciones se concentraron a sequedad, obteniendo el pigmento en polvo que se envasó en un frasco ámbar, en un ambiente de nitrógeno. Para la cuantificación se prepararon soluciones con diferentes concentraciones (0.2 – 2.0 mg/L) a partir de belataínas de betabel previamente purificadas para elaborar la curva tipo, posteriormente, se preparó una solución al 1% del polvo de xoconostle, para su posterior cuantificación a través de espectroscopia UV-VIS.

#### **5.2.9.2. Caracterización por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC)**

La separación e identificación de los pigmentos se realizó por cromatografía HPLC. Para este análisis, se disolvieron 0.03 g del pigmento seco en 25 ml de agua grado HPLC, para muestras líquidas, se colocaron tres gotas (0.5 g) en 25 ml de agua HPLC. Previo a la inyección a la columna, las muestras se filtraron con una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ .

La cromatografía HPLC se realizó con ayuda del equipo que se describe posteriormente, de acuerdo al método reportado por Schwartz y von Elbe, (1980).

Equipo 2. HPLC con un detector de arreglo de diodos (Modelo 168), se utilizó un método de gradiente monitoreado a dos longitudes de onda: 484 nm y 535 nm, con una columna RT 250-4 LiChrosorb. El siguiente sistema de disolventes fue usado para este método, CH<sub>3</sub>OH/0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (18:82, v/v), ajustando a un pH de 2.75 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (disolvente A).

Los disolventes en la separación por elusión de gradientes fueron: inicial 100% disolvente A (en 9 min.), 80%/20% de metanol (disolvente B) (10 min), 100% disolvente A (5 min), 100% disolvente A (5 min).

### **5.2.9.3. Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los pigmentos se analizaron e identificaron por NMR de <sup>1</sup>H y NMR de <sup>13</sup>C, en un equipo de RMN (Eclipse 270-JEOL). La determinación se llevó a cabo utilizando como disolventes cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), dimetilsulfóxido (DMSO-d<sub>6</sub>) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se informan en partes por millón (ppm) tomando como referencia la señal del TMS. Para indicar la multiplicidad de las señales en los espectros de protón se utilizaron las siguientes abreviaturas: señal simple(s), doble (d), triple (t), cuádruple (c), quíntuple (q), múltiple (m) y señal ancha (sa). Las señales complejas se indican utilizando dos o más de estas abreviaturas. Para la elucidación de los azúcares extraídos en la columna de cromatografía de sílica gel, se realizaron espectros de segunda dimensión, de espectroscopia de correlación homonuclear (COSY y HETCOR), utilizados para la caracterización de compuestos complejos y se observó su correspondencia estructural para poder asignar los protones y carbonos en la molécula.

#### **5.2.10. Diseño de experimentos y análisis estadístico**

Para el análisis de los resultados se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) a través del software estadístico Desing Expert versión 5, aplicando un Diseño Central Compuesto (DCC). El primer paso en la MSR fue determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre la variable de respuesta “**y**” y el conjunto de variables independientes estableciendo un modelo de regresión. Para estimar los parámetros del modelo se empleó el método de regresión múltiple a partir de los resultados experimentales. El análisis de la superficie de respuesta se realizó posteriormente en términos de la superficie ajustada.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis proximal del xoconostle

Los resultados del análisis proximal del fruto entero, se presentan en el cuadro 8. Como se observa, el xoconostle (*Opuntia joconostle*) presentó un alto contenido de humedad (82.5%) y carbohidratos (13.2%, obtenidos por diferencia). El contenido de proteínas y lípidos fue de 2 y 1%, respectivamente, lo que concuerda con los resultados reportados por García-Pedraza et al., (2005), para diferentes especies de *Opuntia* (Cuadro 3). El contenido de estos componentes dependerá de las condiciones de cultivo y del estado de madurez del fruto (Sánchez y Ortega, 1996).

**Cuadro 8. Composición proximal del xoconostle entero**

<b>Composición</b>	<b>* (%)</b>
Humedad	82.56 ± 0.55
Lípidos	1.206 ± 0.0088
Proteína	2.22 ± 0.060
Cenizas	0.783 ± 0.0056
Carbohidratos	13.2 ± 0.0248

\*Datos en base húmeda

### 6.2. Morfología del fruto

Los frutos del *Opuntia joconostle* tuvieron una forma de elipsoide a periforme, la piel de la cáscara fue rosada-roja. El peso promedio del fruto fue de  $58.7 \pm 13.9$  g, con diámetros ecuatoriales y polares de  $4.4 \pm 0.45$  cm y  $5.1 \pm 0.95$  cm, respectivamente. Los frutos estudiados presentaron  $43.4 \pm 5.1\%$  de pericarpio ( $1.5 \pm 0.2$  cm de espesor), un  $6.1 \pm 2\%$  de pulpa y un  $4.3 \pm 2.1\%$  de semillas. El pH de la pulpa fue de  $3.37 \pm 0.05$  y una actividad de agua de  $0.982 \pm 0.002$ .

### 6.3. Extracción de los pigmentos totales del xoconostle entero

De los disolventes evaluados en la extracción de las betalaínas del xoconostle, la extracción acuosa fue la más eficiente, logrando extraer una mayor concentración de los pigmentos. Los extractos realizados con soluciones de metanol y etanol a bajas concentraciones (20%) en agua, presentaron también una alta concentración de pigmentos, sin embargo, la concentración fue menor a la obtenida en las extracciones acuosas. Cuando la extracción fue realizada con alcohol amílico, propílico, acetona y acetato de etilo, se formó una solución heterogénea que dio lugar a la formación de dos fases, dificultando la extracción de los pigmentos. Por tal razón, sólo se presentan los resultados experimentales obtenidos en la extracción del pigmento con metanol y etanol, a una longitud de onda entre 525.0 nm y 533.03 nm (cuadro 9).

**Cuadro 9. Contenido de pigmentos totales (mg/100 g del fruto fresco) en extractos de *Opuntia joconostle* con metanol y etanol**

Ensayo	Variables independientes			Variables de respuesta			
	x <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	Metanol		Etanol	
				Abs	Betacianina (mg/100 g)	Abs	Betacianina (mg/100 g)
1	0	5	20	1.0045	89.7	0.8356	74.6
2	0	30	20	0.9444	84.3	0.842	75.2
3	80	5	20	0.6189	55.3	0.356	31.8
4	80	30	20	0.6660	59.5	0.5171	46.2
5	0	17.5	10	1.0000	89.3	0.9582	85.5
6	0	17.5	30	1.0045	89.7	1.0033	89.5
7	80	17.5	10	0.6445	57.5	0.3558	31.7
8	80	17.5	30	0.6445	57.5	0.3916	34.9
9	40	5	10	0.9879	88.2	0.8131	72.6
10	40	5	30	0.9016	80.5	0.747	66.7
11	40	30	10	0.8729	77.9	0.747	66.7
12	40	30	30	0.8729	77.9	0.8396	74.9
13	40	17.5	20	0.9026	80.6	0.8553	76.4
14	40	17.5	20	0.8729	77.9	0.9112	81.4
15	40	17.5	20	0.9016	80.5	0.9233	82.4

x<sub>1</sub> = Porcentaje del disolvente: metanol o etanol, x<sub>2</sub> = Temperatura de extracción (°C)  
x<sub>3</sub> = tiempo de extracción (min)

De los datos anteriores se obtuvieron las superficies de respuesta (Figura 10) para observar la influencia de la concentración del disolvente, temperatura y tiempo de extracción en el rendimiento de la extracción de las betalaínas del xoconostle.

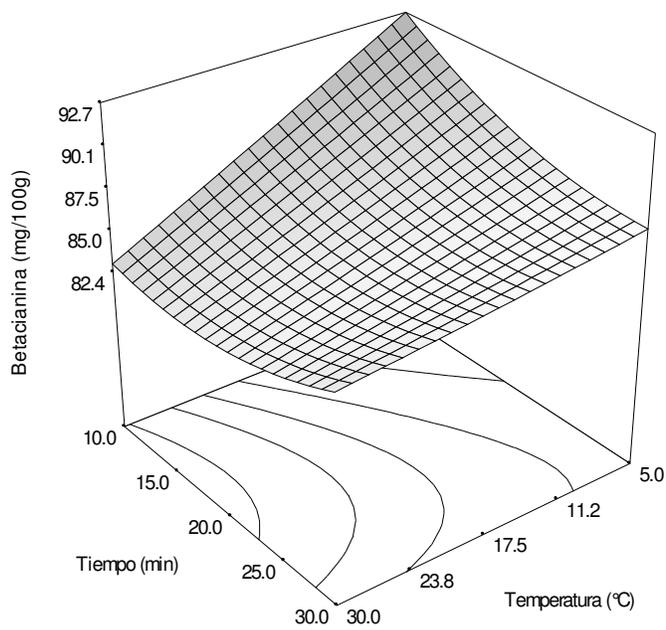
### 6.3.1. Sistema de extracción I: Disolvente metanol

El contenido de pigmentos totales de los extractos obtenidos con metanol se describe de acuerdo a la ecuación 2:

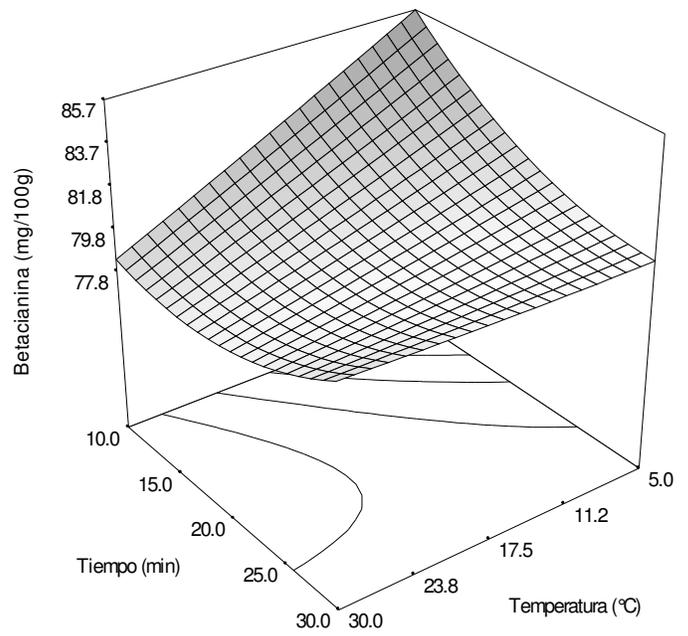
$$\begin{aligned} \text{Concentración de pigmentos (mg)} = & 106.04 - 0.66x_1 - 0.90x_2 - 0.087x_3 - 0.0005.067x_1^2 \\ & + 0.014x_2^2 - 0.004716x_3^2 + 0.015x_1x_2 + 0.0048x_1x_3 + 0.00025x_2x_3 \end{aligned} \quad (2)$$

Donde:  $x_1$  es la temperatura de extracción (°C)  
 $x_2$  es el tiempo de extracción (min)  
 $x_3$  es el porcentaje de metanol en agua (%)

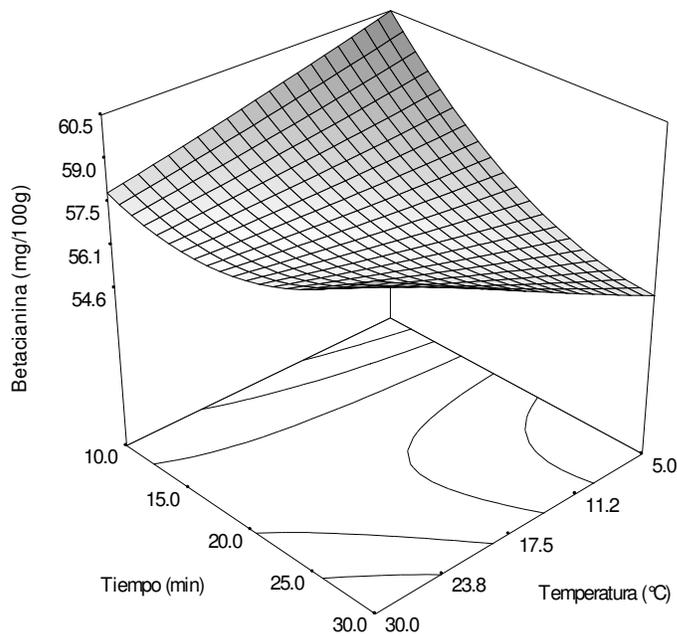
El modelo de regresión para la extracción de los pigmentos utilizando metanol tuvo un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9852, un coeficiente de variación de 3.36 y una probabilidad ( $P>F$ ) de 0.0005, indicando que los factores se ajustaron adecuadamente a este modelo (apéndice IV). El análisis estadístico indicó que la concentración de metanol, término lineal ( $p<0.0001$ ) y cuadrático ( $p<0.0024$ ), fue el factor que influyó de forma significativa en el proceso de extracción. Como se puede observar en los gráficos de superficie de respuesta (Figura 10), la mayor extracción del pigmento (92.7 mg/100g) se obtuvo cuando se utilizó una solución agua/metanol (80:20, v/v) a 5°C por 10 min. El rendimiento de la extracción disminuyó al aumentar la temperatura y el tiempo de la extracción para concentraciones de 20 y 40% de metanol. Cuando la temperatura se elevó de 5 a 30 °C para estas concentraciones de metanol, la concentración del pigmento disminuyó 10 mg. Sin embargo, para una concentración de metanol del 80% se observó una disminución en la concentración del pigmento total. En este caso, al aumentar la temperatura y el tiempo de extracción, la eficiencia de la extracción mejoró, debido probablemente a que cuando el sistema de extracción tiene una baja concentración de agua el proceso requiere mayor energía y tiempo de extracción para que sea posible la hidratación de la matriz vegetal y se separen de los azúcares asociados a la aglicona, permitiendo una mejor extracción.



**A)**



**B)**



**C)**

**Figura 10. Gráficos de superficie de respuesta para la extracción de los pigmentos del xoconostle (*Opuntia joconostle*) con agua:ácido cítrico:metanol a pH 5.0. A) agua/metanol (80:20), B) agua/metanol (60:40) y C) agua/metanol (20:80)**

### 6.3.2. Sistema de extracción II: Disolvente etanol

El contenido de los pigmentos totales en los extractos de etanol se describió de acuerdo a la ecuación 3:

$$\begin{aligned} \text{Concentración de pigmentos (mg)} = & 69.17 + 1.02x_1 - 0.68x_2 - 0.20x_3 - 0.035x_1^2 + 0.021x_2^2 \\ & - 0.011x_3^2 + 0.011x_1x_2 + 0.0069x_1x_3 - 0.00005x_2x_3 \end{aligned} \quad (3)$$

Donde:  $x_1$  es la temperatura de extracción (°C)  
 $x_2$  es el tiempo de extracción (min)  
 $x_3$  es el porcentaje de etanol en agua (%)

El valor del coeficiente de determinación fue de 0.9620, el coeficiente de variación de 9.81 y el nivel de significancia del modelo fue de 0.0048, indicando que el modelo se ajustó adecuadamente a los datos experimentales. Como en el caso anterior, el ANOVA (apéndice IV), indicó que la concentración de etanol, parámetro lineal y cuadrático ( $p < 0.0002$  y  $p < 0.00369$ , respectivamente), influyeron de forma significativa en el rendimiento de la extracción. Comparado con el metanol, la concentración máxima de los pigmentos en los extractos acuoetanólicos disminuyó de 92.7 mg para metanol, hasta 86 mg para etanol. Esta tendencia se observó para todas las concentraciones de etanol (Figura 11 a, b y c). Para este disolvente, ni el tiempo de extracción ni la temperatura influenciaron significativamente la eficacia de la extracción. El valor máximo de la concentración del pigmento (86 mg) fue obtenido cuando la extracción fue realizada durante 25 minutos a 17.5 °C, empleando una solución de etanol al 20% (v/v). Como se puede observar, al emplear mayores porcentajes de etanol la eficiencia de la extracción disminuyó, cambiando su tendencia. Para 40% de etanol, la máxima concentración del pigmento se presentó a mayor temperatura (23.75 °C) para un tiempo mayor de 25 minutos. Mientras que para soluciones de etanol al 80%, el máximo se logró para una temperatura de 30 °C y 30 minutos. Este comportamiento puede ser explicado, al igual que con metanol, debido a que en soluciones con mayor porcentaje de alcohol, es necesario aplicar mayor temperatura y tiempo de extracción para romper los puentes de hidrógeno que

forman la estructura cuaternaria de las betalaínas con los demás componentes del xoconostle.

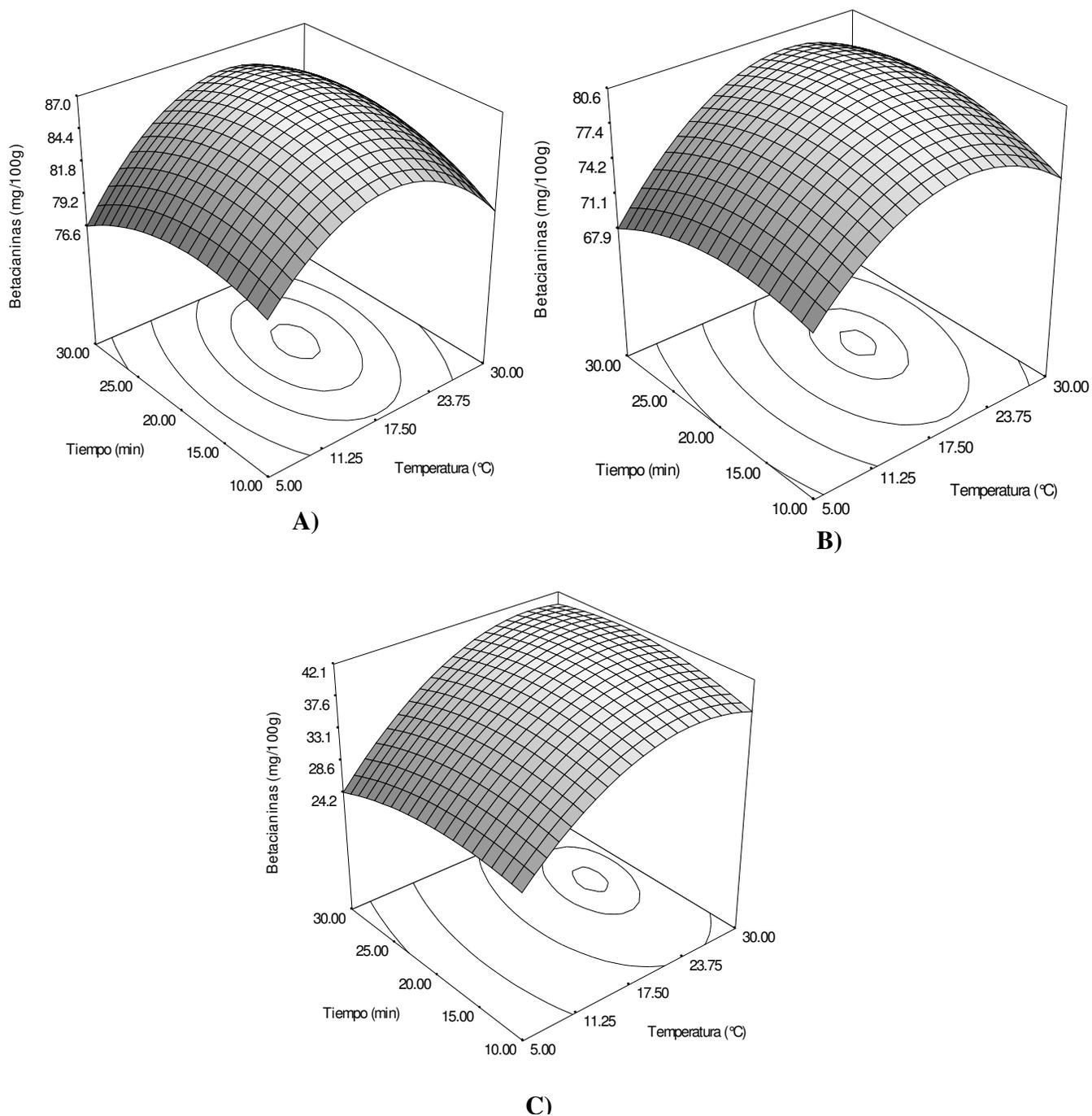


Figura 11. Gráficos de superficie de respuesta para la extracción de los pigmentos del xoconostle (*Opuntia joconostle*) con agua:ácido cítrico:etanol a pH 5.0. A) agua/etanol (80:20), B) agua/etanol (60:40) y C) agua/etanol (20:80)

Como se puede observar, al emplear mayor porcentaje de agua en ambos disolventes aumentó la eficiencia de la extracción. Esto está de acuerdo con los resultados reportados por Castellar et al., (2003). Sin embargo, los disolventes preparados con el mayor porcentaje de agua son menos selectivos disolviendo otros compuestos solubles en agua como proteínas y compuestos fenólicos.

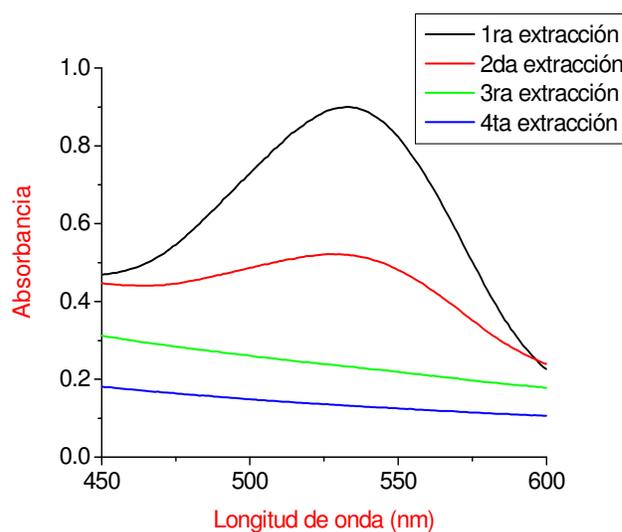
#### 6.4. Eficiencia de la extracción realizando “N” número de extracciones

Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción se procedió a la determinación del número de extracciones necesarias para agotar el pigmento en el fruto entero del xoconostle. Los resultados obtenidos utilizando como disolvente sólo agua se presentan en el cuadro 10. Los espectros de absorción (EA) UV-VIS para las extracciones sucesivas se muestran en la Figura 12.

Cuando se utilizó sólo agua, la extracción completa de las betalaínas del xoconostle prácticamente se logra en la primera extracción. En la segunda extracción, se extraen las betalaínas restantes, pero se extraen también otros compuestos, pues al hidratarse todo el extracto forma una emulsión y aunque se centrifuga y se filtra en la absorbancia se observa casi un 40% de pérdida. Los dos últimos extractos son incoloros pero aún hay sólidos suspendidos.

**Cuadro 10. Disolvente: agua ( $\lambda_{\text{máx}}=533$  nm)**

Extracción	Volumen del disolvente (ml)	pH	Abs
1	20	3.6	0.9002
2	5	3.7	0.5198
3	5	3.8	0.2329
4	5	4.0	0.1323

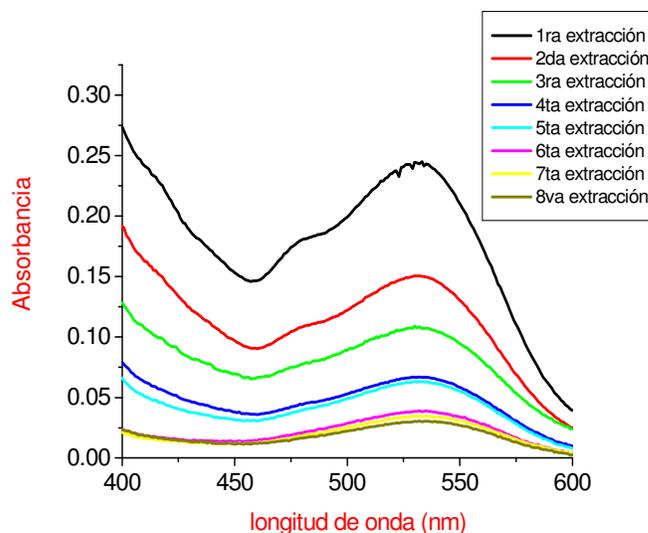


**Figura 12. EA para extractos con agua**

Como se puede observar en la Figura 13, la extracción del pigmento con metanol fue gradual, necesitando hasta 8 extracciones para agotar el pigmento. Este disolvente logra hacer la extracción con cierta selectividad, evitando la extracción de otros compuestos presentes en el xoconostle deshidratado. Además, en la extracción con metanol se observó un hombro a una  $\lambda_{\text{máx}}=480$  nm, con una absorbancia de 0.1804, característico de las betaxantinas, presentes en el xoconostle. La acidez de los pigmentos se puede observar por el aumento gradual del pH de 4.3 a 5.6 (cuadro 11).

**Cuadro 11. Disolvente: metanol ( $\lambda_{\text{máx}}=530$  nm)**

Extracción	Volumen del disolvente (ml)	pH	Abs
1	20	4.3	0.2443
2	5	4.5	0.1505
3	5	4.8	0.1090
4	5	5.2	0.0668
5	5	5.4	0.0632
6	5	5.6	0.0384
7	5	5.6	0.0343
8	5	5.6	0.0304



F

**Figura 13. EA de extractos con metanol**

La presencia de betaxantinas en la extracción realizada con etanol fue más evidente que en el caso anterior, observándose un pico máximo en 475 nm, con 0.1080 en la primera extracción (Figura 14). En este caso, el pico característico de las betalainas no se encuentra definido, como fue observado para los disolventes anteriores. La solución fue completamente amarilla y no se observó la coloración roja característica, al igual que para el etanol el pH bajó de 5 a 3.7 aumentando para la tercera extracción hasta 4 (Cuadro 12).

Cuadro 12. Disolvente: etanol ( $\lambda_{\text{máx}}=475 \text{ nm}, 536 \text{ nm}$ )

Extracción	Volumen de disolvente (ml)	pH	Abs a 475 nm	Abs a 536 nm
1	20	3.7	0.1080	0.0571
2	5	3.7	0.0668	0.0252
3	5	4.0	0.0481	0.0253

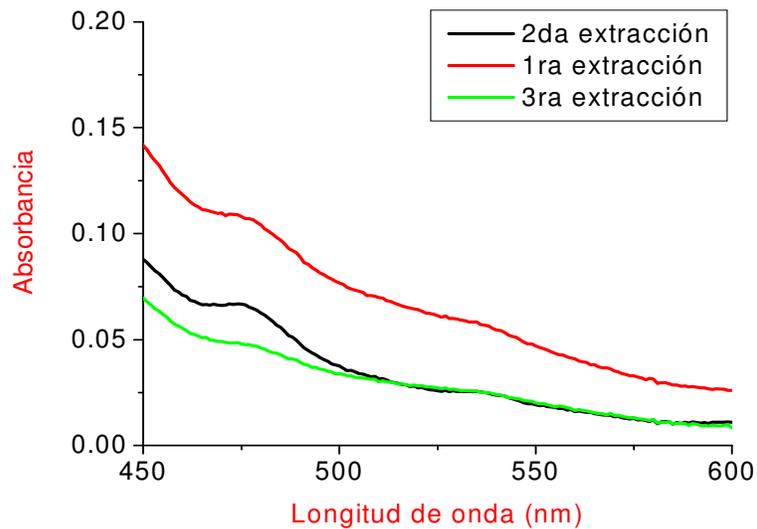
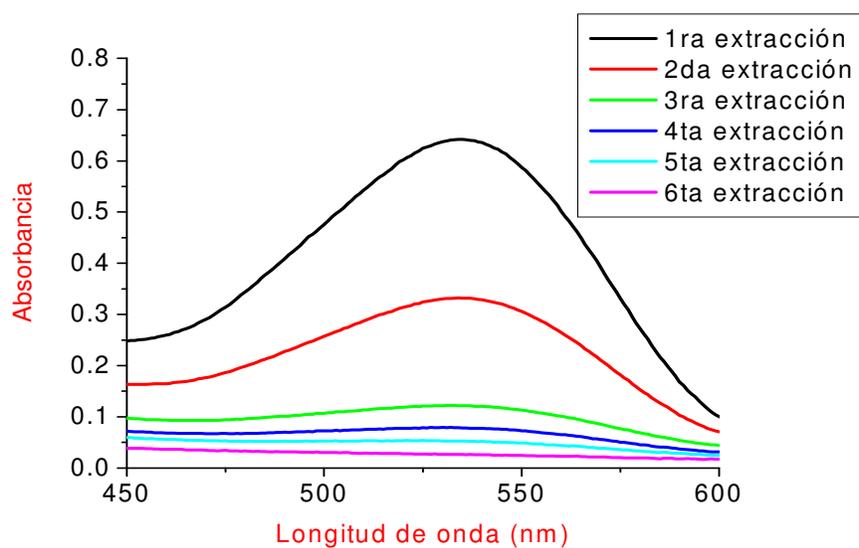


Figura 14. EA de extractos con etanol

Cuando se utilizó agua/metanol (80:20), la primera extracción del pigmento fue más eficiente, donde la mayor absorbancia se observó la mayor absorbancia, que cuando se utiliza agua/metanol (80:20); debido a la polaridad de la solución, en la primera extracción se extrae casi totalmente el pigmento, ya que en la segunda extracción ambas soluciones tienen absorbancia de 0.3 perdiendo coloración y se observan mayor contenido de sólidos suspendidos, formando una emulsión (Figura 15). El pH de los extractos resultó no ser tan ácido comparado con los disolventes anteriores (cuadro 13).

**Cuadro 13. Disolvente: agua/etanol (80:20) ( $\lambda_{\text{máx}}=536 \text{ nm}$ )**

Extracto	Volumen del disolvente (ml)	pH	Abs
1	20	4.5	0.6411
2	5	4.3	0.3315
3	5	4.8	0.1216
4	5	5.2	0.0786
5	5	5.4	0.0527
6	5	5.6	0.0264



**Figura 15. EA de extractos agua/metanol 80:20**

Para agua/etanol (80:20), el pigmento se obtuvo casi en su totalidad en la segunda extracción pero con menor eficiencia (Figura 16) y el pH bajó por la acidez del pigmento, aumentando gradualmente, a medida que se realizaron cada una de las extracciones (cuadro 14).

Cuadro 14. Disolvente: agua:etanol (80:20) ( $\lambda_{\text{máx}}=534 \text{ nm}$ )

Extracto	Volumen del disolvente (ml)	pH	Abs
1	20	3.7	0.3896
2	5	3.7	0.2263
3	5	3.8	0.0622
4	5	3.9	0.0336

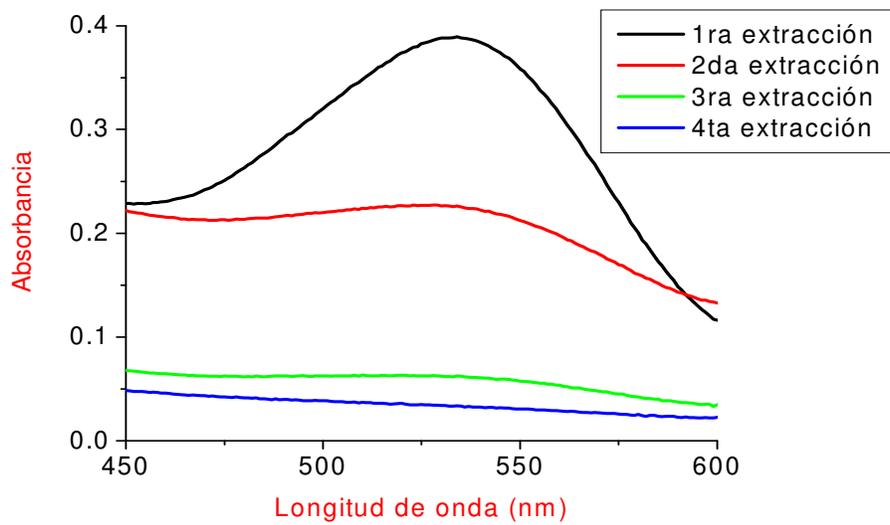


Figura 16. EA de extractos con agua/etanol (80:20)

## 6.5. Estabilidad de las betalaínas extraídas del xoconostle

En la Figura 17, se muestra el espectro de absorción UV-VIS de un extracto acuoso característico del xoconostle (0.1 g/100ml, pH = 3), como se observa, el extracto presentó dos picos de absorción, el máximo se observó en la región ultravioleta (UV) a 274 nm característico de la estructura ciclo-DOPA y el segundo en la región del visible a 535 nm (Stintzing y Carle, 2004).

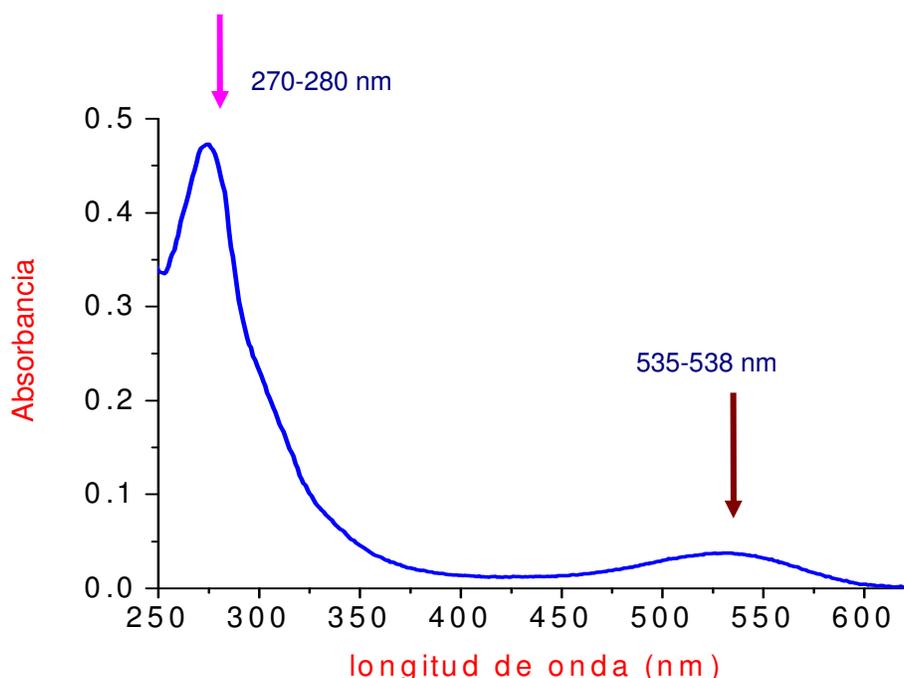


Figura 17. Espectro de absorción del extracto de betalaínas totales del xoconostle

Los resultados de los ensayos preliminares para evaluar la estabilidad de los extractos de las betalaínas totales del xoconostle a factores como pH, temperatura y tiempo de calentamiento, son presentados posteriormente a partir de estos resultados, fueron establecidos los límites correspondientes para cada factor del diseño experimental.

### 6.5.1. Estabilidad al pH

En condiciones ácidas (pH = 1), el espectro de absorción visible del extracto del xoconostle presentó un desplazamiento hipsocrómico y una absorbancia de 0.9510. Los pigmentos del xoconostle presentaron un color rojo intenso estable a pH ácido-neutro, entre 3 y 7, como se ha reportado anteriormente en otras investigaciones (Castellar et al., 2003, Cai et al., 1998, Reynoso et al., 1997). Con una absorbancia de 0.1054, 0.1054 y 0.1036, para pH 3, 5 y 7, respectivamente. En condiciones alcalinas (pH 9), se observó un desplazamiento batocrómico de 517 a 524 nm, con una disminución en la absorbancia (0.0886). A pH 11, el pico de absorción no fue definido, como en los casos anteriores, por la posible degradación del cromóforo (Figura 18).

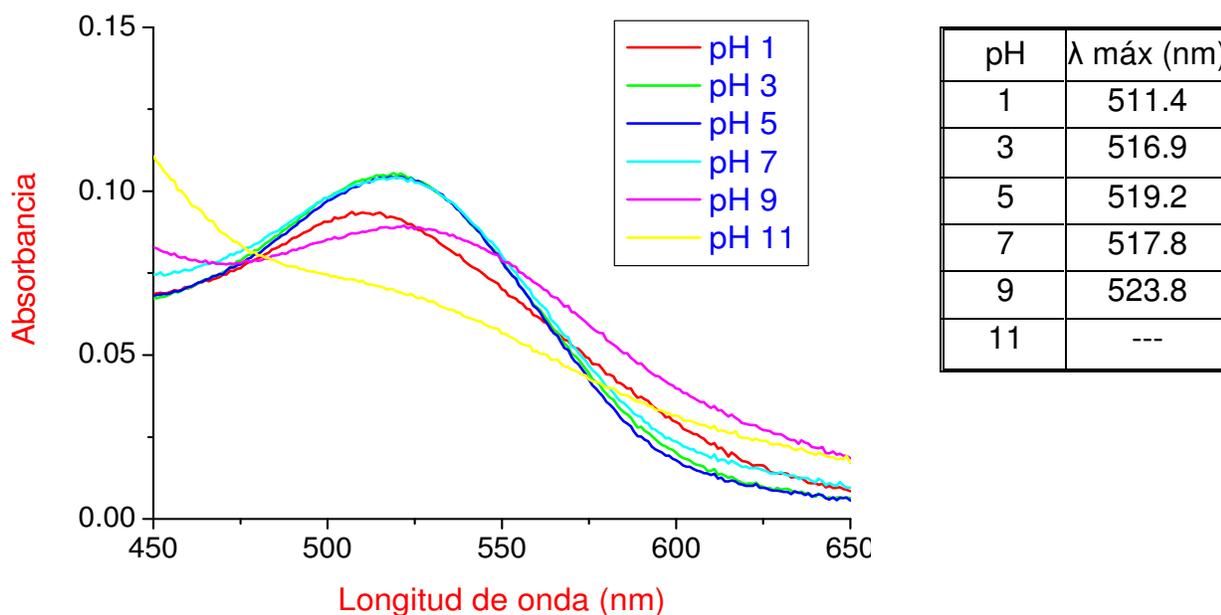


Figura 18. Espectro de absorción UV-VIS del extracto del xoconostle a diferente pH

### 6.5.2. Estabilidad a la temperatura y al tiempo de calentamiento

La estabilidad de los pigmentos fue influenciada significativamente por el efecto combinado de la temperatura, pH y el tiempo de calentamiento. Se observaron pérdidas de coloración cuando las muestras fueron calentadas por más de 20 minutos a 95 °C. Sin embargo, a pH 5 se observó mayor estabilidad de los pigmentos a estos factores (Figura 19).

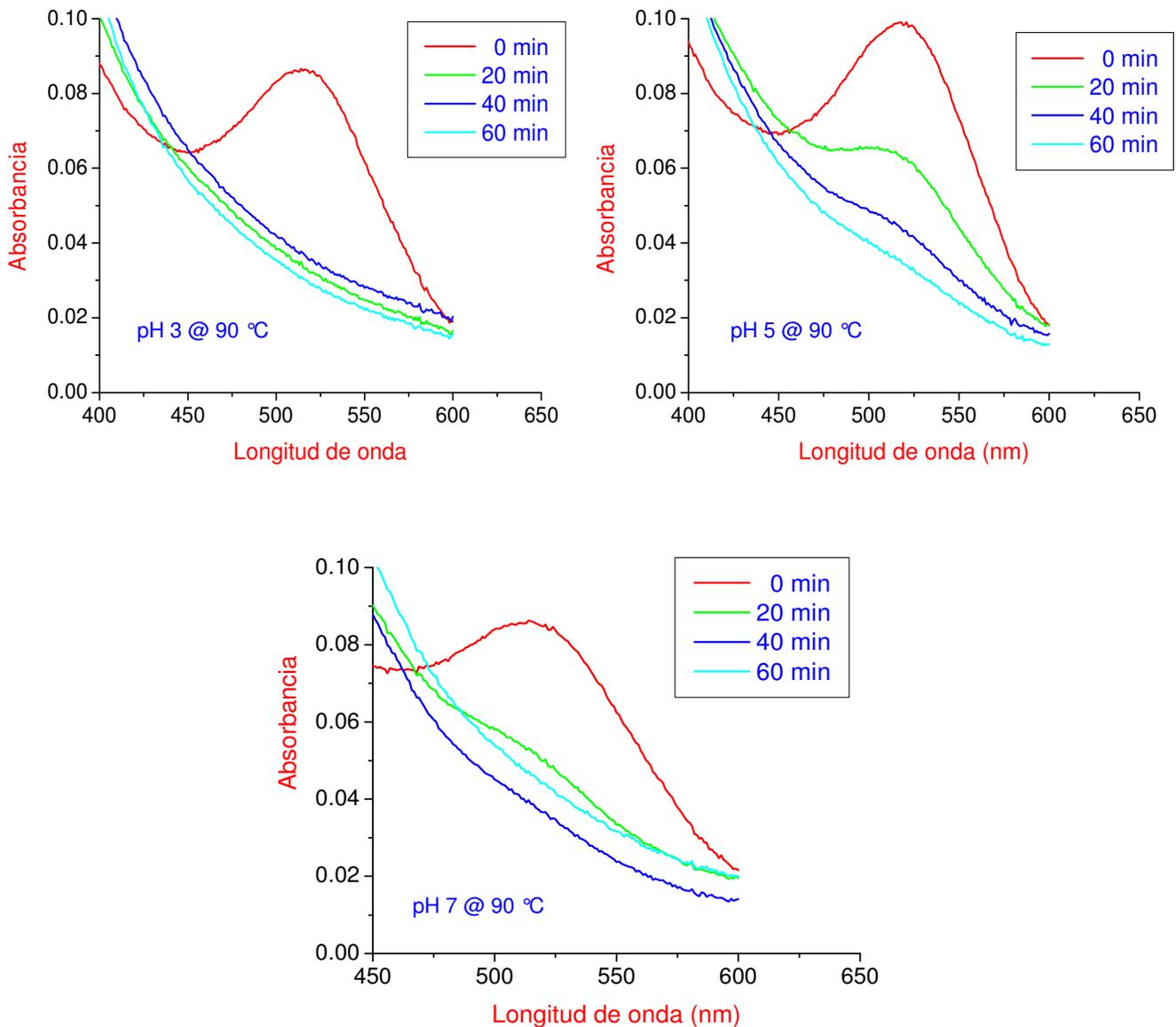


Figura 19. Estabilidad del pigmento a pH 3, 5 y 7

A partir de los datos anteriores, se estableció el diseño experimental (cuadro 15), para valorar el efecto del tiempo de calentamiento, temperatura y pH en la estabilidad de las betalaínas presente en los extractos de betabel y del xoconostle.

**Cuadro 15. Estabilidad de los pigmentos del xoconostle**

Ensayo	Variables independientes			Variables de respuesta			
				Betabel		Xoconostle	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$\lambda$ máx (nm)	Abs	$\lambda$ máx (nm)	Abs
1	16	25	3	533.07	0.4661	534.0	0.4833
2	16	25	7	532.02	1.5079	535.0	0.4748
3	16	80	3	533.98	0.2788	534.0	0.1436
4	16	80	7	533.07	0.8297	535.0	0.2387
5	60	25	3	533.07	0.5165	533.1	0.4119
6	60	25	7	535.94	1.1889	535.9	0.4793
7	60	80	3	533.98	0.1615	534.0	0.0858
8	60	80	7	533.07	0.4168	535.0	0.1420
9	01	52.5	5	533.07	1.19	535.0	0.4930
10	75	52.5	5	533.07	0.9785	534.0	0.4367
11	38	6.25	5	530.96	1.204	534.0	0.4794
12	38	98.7	5	533.07	0.3207	535.0	0.1265
13	38	52.5	1.64	533.07	0.1636	534.0	0.1173
14	38	52.5	8.36	533.07	0.993	535.9	0.4121
15	38	52.5	5	533.07	1.0672	535.0	0.4411
16	38	52.5	5	533.98	1.1077	535.0	0.4519
17	38	52.5	5	533.98	1.1165	535.0	0.4384
18	38	52.5	5	533.07	1.0712	535.0	0.4628
19	38	52.5	5	532.02	1.1345	535.0	0.4845
20	38	52.5	5	533.07	1.1406	535.0	0.4411

Donde:  $x_1$  es el tiempo de calentamiento (min)  
 $x_2$  es la temperatura de calentamiento (°C)  
 $x_3$  es el pH de la solución (%)

De los datos anteriores se obtuvieron las superficies de respuesta para observar la influencia de la temperatura, tiempo de calentamiento y pH en la estabilidad de las betalaínas del betabel y el xoconostle.

### 6.5.3. Estabilidad de las betalaínas del betabel

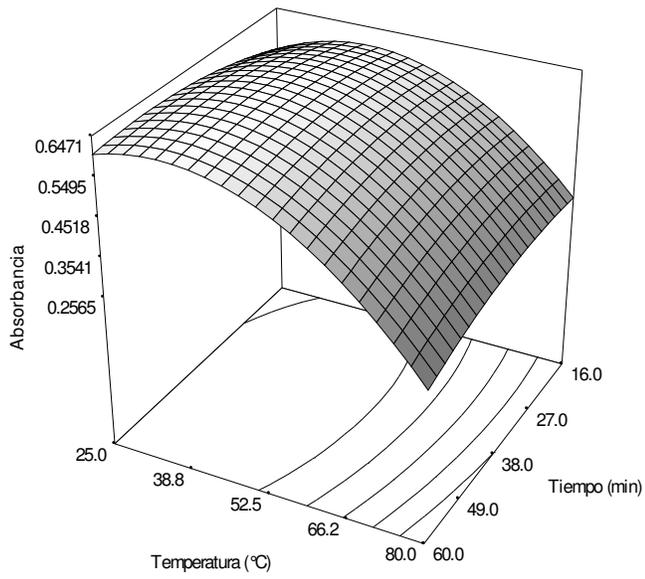
La ecuación 4 describe la variación de la coloración (absorbancia) de los extractos del betabel.

$$\begin{aligned} \text{Absorbancia} = & -1.94 + 0.014x_1 + 3.023x_2 + 0.85x_3 - 6.817x_1^2 + 0.0001941x_2^2 - 0,053x_3^2 \\ & - 0.00005405x_1x_2 + 0.001889x_1x_3 - 0.002064x_2x_3 \end{aligned} \quad (4)$$

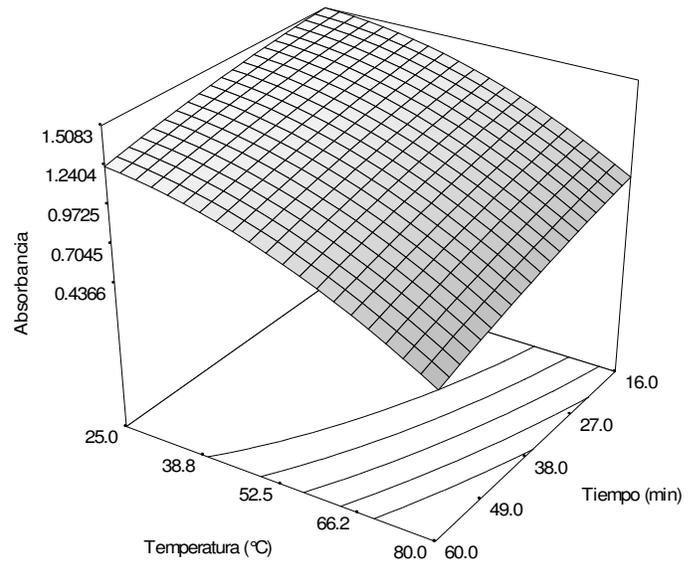
Donde:  $x_1$  es el tiempo de calentamiento (min)  
 $x_2$  es la temperatura calentamiento ( $^{\circ}\text{C}$ )  
 $x_3$  es el pH de la solución (%)

La probabilidad del modelo fue altamente significativa ( $P > F = 0.0001$ ), indicando que los valores experimentales presentaron una alta correlación con el modelo teórico. El coeficiente de determinación fue de 0.9777 y el coeficiente de variación de 10.05. Del ANOVA (apéndice V), fue posible observar que la temperatura de calentamiento y el pH en su término lineal ( $P > F = 0.0001$ , 0.0001, respectivamente) y cuadrático ( $P > F = 0.0001$ , 0.0001, respectivamente), fueron los factores que más influyeron en la estabilidad de los pigmentos del betabel.

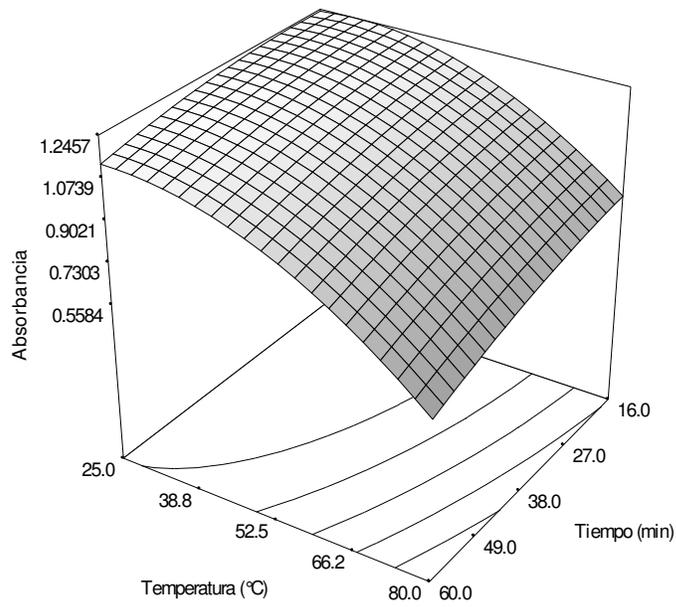
Los gráficos de la Figura 20 muestran la estabilidad de los extractos de betabel. Como se puede observar, la tendencia de los extractos de betabel fue muy similar a los extractos del xoconostle; sin embargo, a pH 3 se tuvo una ligera disminución de la absorbancia cuando se dió un tratamiento a temperatura ambiente por 16 min. La concentración de las betalaínas en betabel es mayor, y esto se comprueba en la absorbancia de 1.24 a un pH de 3 y 1.51 a un pH de 7.



**A)**



**B)**



**C)**

**Figura 20. Estabilidad del betabel a diferente temperatura, tiempo y pH.**

**A) pH 3, B) pH 5, C) pH 7**

#### 6.5.4. Estabilidad de las betalainas del xoconostle

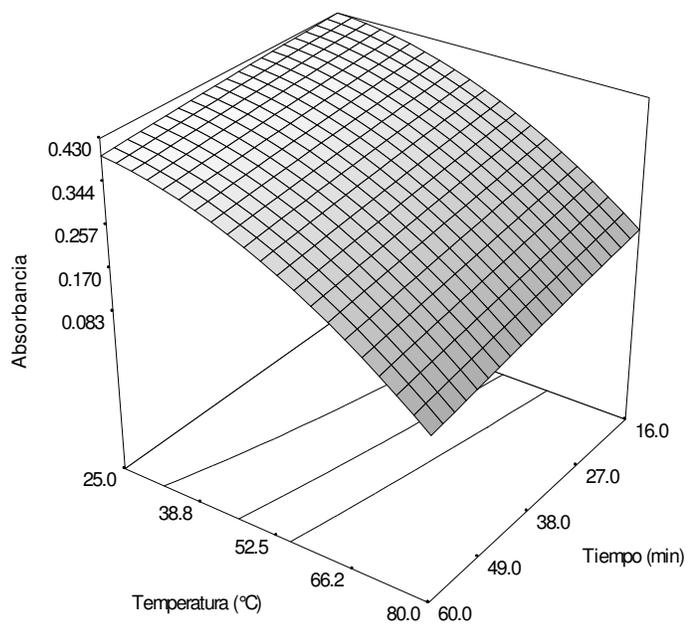
La ecuación 5 describe la estabilidad del xoconostle determinada por la absorbancia para los diferentes factores de evaluación.

$$\begin{aligned} \text{Absorbancia} = & -0.20 - 0.0002705x_1 + 0.003021x_2 + 0.19x_3 - 0.000004696x_1^2 + 0.0000787x_2^2 \\ & - 0,018x_3^2 - 0.0000181x_1x_2 + 0.0001051x_1x_3 - 0.00021x_2x_3 \end{aligned} \quad (5)$$

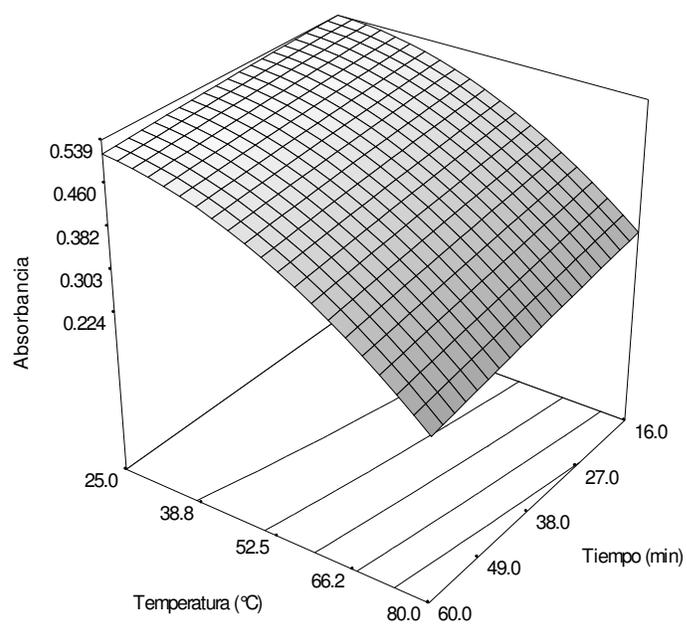
Donde:  $x_1$  es el tiempo de calentamiento (min)  
 $x_2$  es la temperatura de calentamiento ( $^{\circ}\text{C}$ )  
 $x_3$  es el pH de la solución (%)

La probabilidad del modelo fue de  $P > F = 0.0001$ , altamente significativa indicando que los valores experimentales presentaron una alta correlación con el modelo teórico. Con un coeficiente de determinación de 0.9376 y un coeficiente de variación de 14.42. Del ANOVA (apéndice V), fue posible observar que la temperatura de calentamiento y el pH en su término lineal ( $P > F = 0.0001, 0.0044$ , respectivamente) y cuadrático ( $P > F = 0.0015, 0.0003$ , respectivamente), fueron los factores que más influyeron en la estabilidad de los pigmentos.

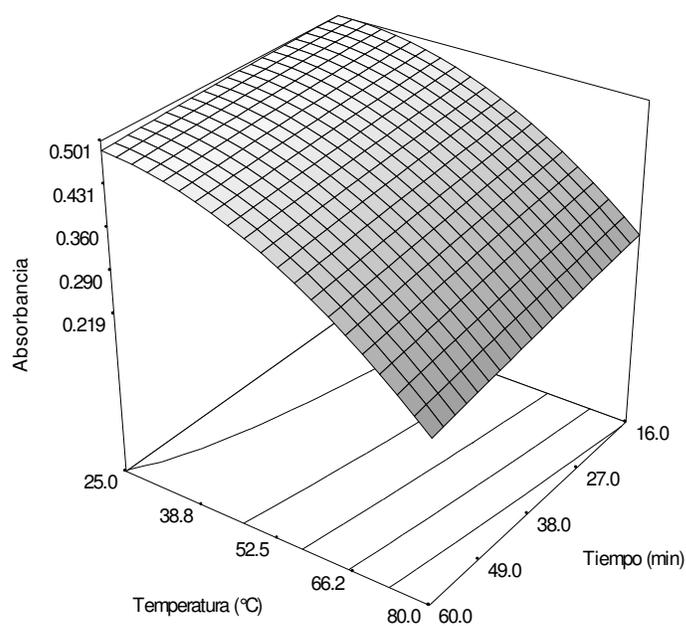
En la figura 21, se muestran los gráficos de superficie de respuesta para la estabilidad del xoconostle a tres diferentes pHs (3, 5 y 7). Cuando las muestras a pH 3, se calentaron a altas temperaturas ( $80^{\circ}\text{C}$ ) durante una hora, la absorbancia de los extractos cayó drásticamente (0.43 a 0.083). En los gráficos obtenidos a pH 5 y 7 se observó una tendencia similar corroborando que a pH 5 el pigmento fue más estable, con un máximo valor de absorbancia (0.539,  $25^{\circ}\text{C}$  y 60 min), ligeramente mayor comparado con el valor de 0.501 a pH 7. La tonalidad del pigmento en condiciones drásticas de tratamiento cambió, sin embargo, fue evidente que la temperatura de calentamiento influyó en la degradación del pigmento. A temperatura ambiente, el pigmento fue estable hasta por 60 min, en estas condiciones para cualquier pH se observó un cambio mínimo en los valores de absorbancia de los extractos. Lo anterior está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Castellar et al., 2003, Cai et al., 2001, Huang y Von Elbe, 1987).



**A)**



**B)**



**C)**

**Figura 21. Estabilidad del xoconostle a diferente temperatura, tiempo y pH.**

**A) pH 3, B) pH 5, C) pH 7.**

El efecto de la temperatura, tiempo y pH en la estabilidad de los principales pigmentos del xoconostle, evaluado a través de los espectros de UV-VIS indican que cuando la solución de pigmentos está a pH alcalino (9 a 11) se tiene una disminución de absorbancia de estos pigmentos. Esto probablemente se deba a que tanto en las betaninas como en las isobetaninas puede ocurrir una ruptura del enlace aldimina obteniendo dos compuestos, uno de ácido betalámico (color amarillo brillante) y otro de ciclo Dopa 5-O- $\beta$ -glucósido (inoloro); los colores combinados de cada uno de estos compuestos disminuyeron el valor de absorbancia del espectro de absorción (Herbach et al., 2004, Stintzing y Carle 2004), como se puede observar en la Figura 22. Por otro lado, a temperaturas mayores a la ambiente, las betalaínas del xoconostle generalmente pierden color debido a una probable deshidrogenación y descarboxilación formando los compuestos de neobetainas (amarillo) y 17-decarboxi-betanina (naranja rojo), como se indica en la Figura 22.

Cuando se tiene el efecto combinado del efecto del pH y la temperatura, se observa mayor deshidrogenación y descarboxilación de las betalaínas del xoconostle, manifestándose en mayores pérdidas de color, por ende, menores valores de absorbancia. Cuando se tiene un pH alcalino y alta temperatura la pérdida de color es aún mayor debido a la mayor ruptura del enlace aldimina, resultando compuestos incoloros; un efecto similar es observado a pH muy ácido y alta temperatura.

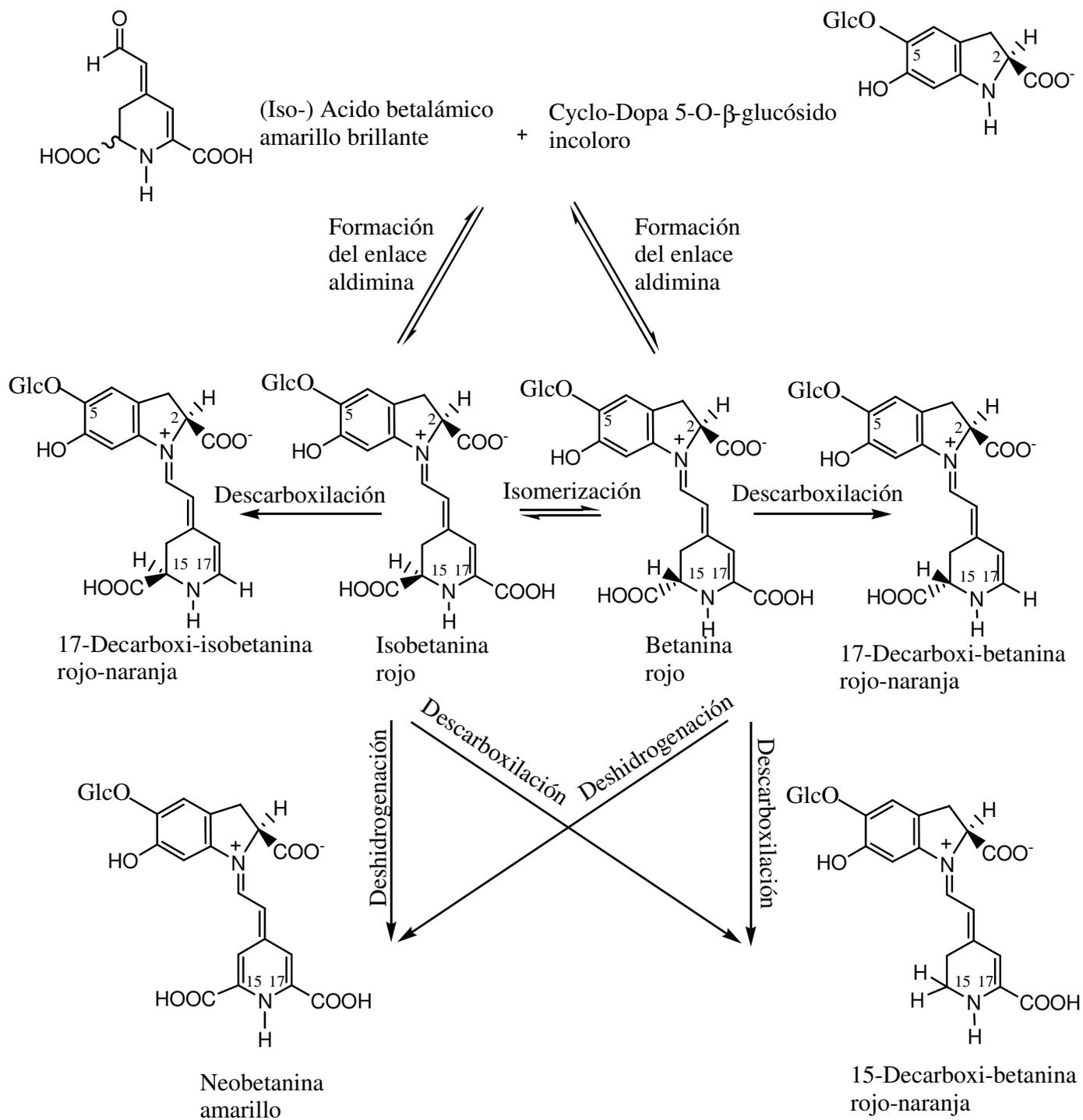


Figura 22. Esquema propuesto de la degradación de las betalainas del xoconostle por efecto de la temperatura (Herbach, et al., 2004)



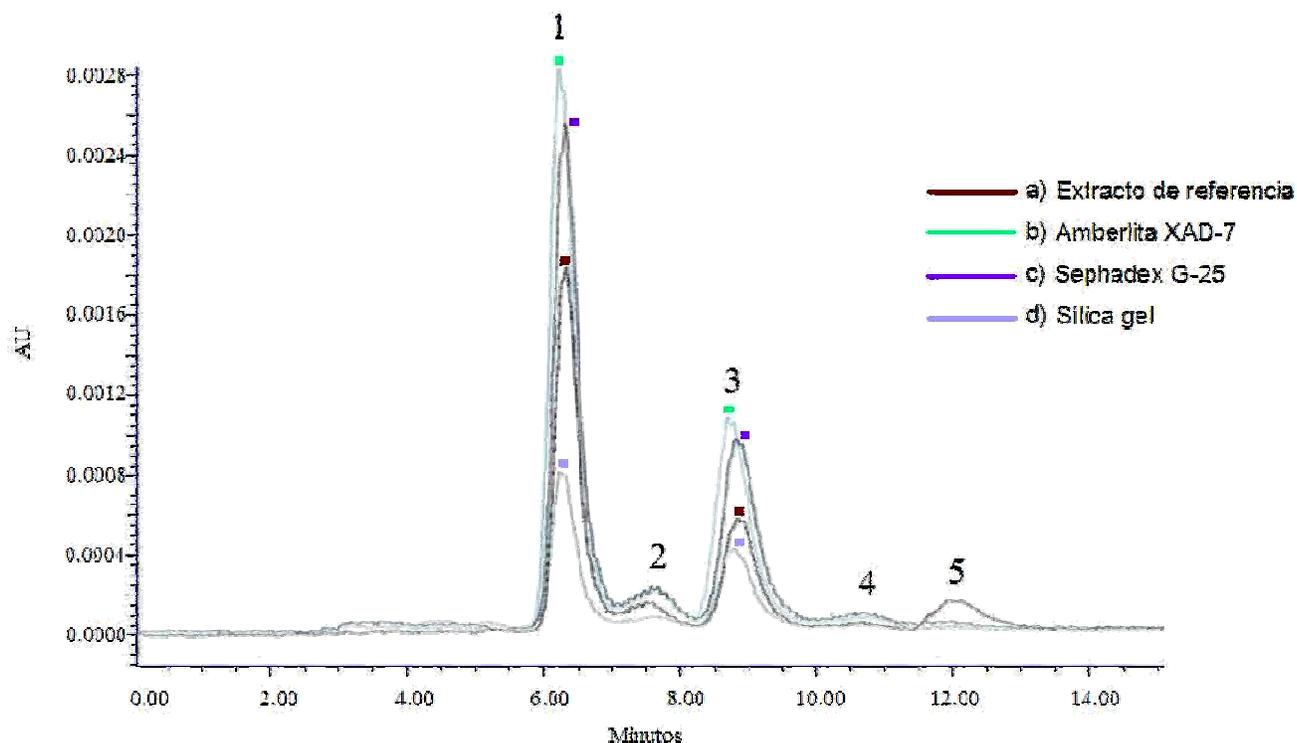
Como se muestra en la Figura 23, la separación del pigmento fue evidente cuando se utilizó una concentración de 1:9 y 9:1 de metanol/etanol, obteniendo probablemente dos betalaínas diferentes una de color rojo y la otra de color amarilla, de donde fue posible aislar un azúcar. Con base en los resultados obtenidos en las placas de TLC, se llevó a cabo la separación de los pigmentos utilizando este sistema de disolventes en una placa preparativa de sílica gel. Sin embargo, como el tiempo de elusión fue mayor la marca del pigmento rojo se atenuó, perdiendo la coloración final. En el frente de la placa de sílica, se observaron compuestos diferentes que solo se evidenciaron por luz ultravioleta.

### **6.6.2. Cromatografía en columna evaluada por HPLC**

Los cromatogramas de HPLC de las fracciones obtenidas en la separación de los pigmentos por cromatografía en columna (amberlita, sephadex y sílica gel), se muestran en la Figura 24. Las curvas fueron comparadas con un extracto de xoconostle, sin previa separación en columna cromatográfica. En el cromatograma del extracto de referencia, se observaron cinco picos característicos (1-5), mientras que en las fracciones obtenidas por cromatografía en columna fueron evidentes sólo cuatro de los picos observados inicialmente.

Cuando el extracto se separó con amberlita el área de los picos aumentó, debido probablemente a que la amberlita retuvo pectinas y mucílagos presentes en el extracto, incrementando el contenido de betalaínas. Como se observa en la Figura 24, en la separación con sephadex también se observó un incremento del área de los picos del extracto; el pico 1 y el 3, presentaron áreas ligeramente menores a las obtenidas con amberlita, sin embargo, con esta columna se puso de manifiesto el pico 4, que apenas se puede diferenciar en el extracto de referencia.

En la columna empacada con sílica gel, se obtuvo una menor separación de los pigmentos, aunque existe una clara diferenciación de las fracciones separadas y previamente observadas por TLC, en el cromatograma de HPLC los picos tuvieron una menor intensidad debida probablemente a la acidez que tiene originalmente la columna.

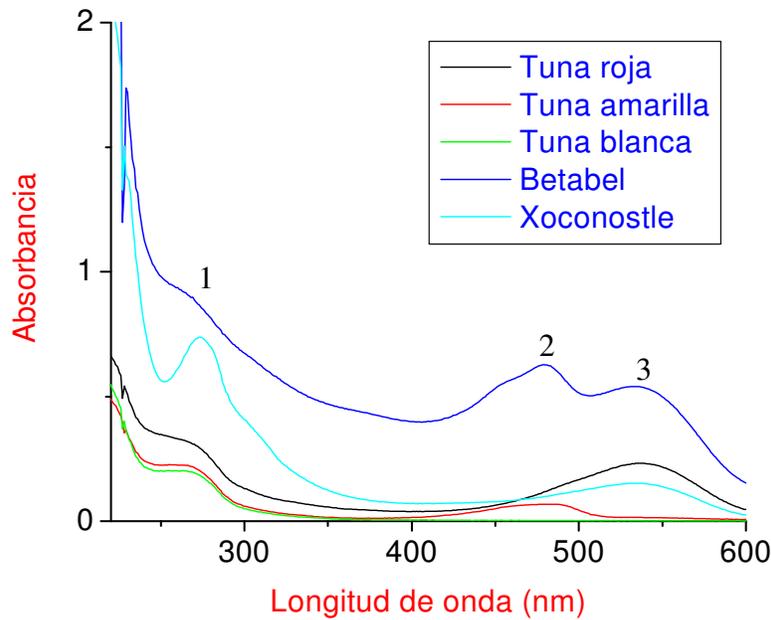


**Figura 24. Cromatogramas de HPLC por elusión de gradiente después de Cromatografía en columna por amberlita, sephadex, sílica gel y el extracto de referencia (apéndice II)**

## 6.7. Caracterización de los pigmentos

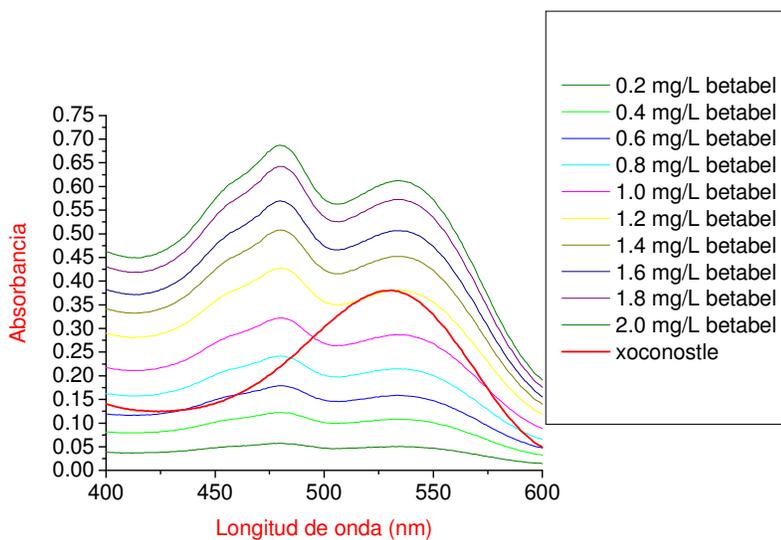
### 6.7.1. Caracterización por espectroscopia UV-VIS

En los espectros de UV-VIS observados en la Figura 25 de tres tunas, el betabel y el xoconostle se observó un hombro entre 270-280 nm correspondiente a la estructura del ciclo-Dopa, para el xoconostle a esta longitud de onda se observó un pico con mayor intensidad (1). La tuna amarilla y el betabel presentaron picos mas resueltos a aproximadamente 475 nm, correspondientes a las betaxantinas (2), y una tercer absorción máxima para la tuna roja y el betabel en el intervalo del visible, alrededor de 535-538 nm (3), correspondiente a la betanina o isobetanina (Schwartz and von Elbe 1980).

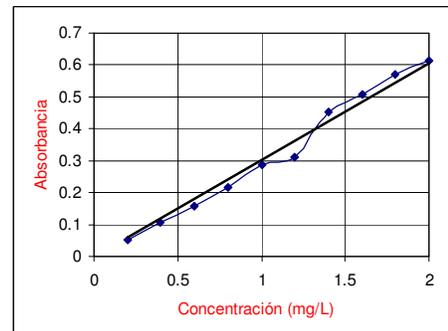


**Figura 25. Espectros de absorción UV-VIS de (1) Ciclo dopa, (2) betaxantina y (3) betacianina de tuna roja, tuna amarilla, tuna blanca, betabel y el xoconostle**

La cuantificación de las betalaínas fue estimada por espectroscopia UV-VIS y el resultado obtenido indicó un bajo contenido de betalaínas 1.25 mg/L, en el xoconostle, comparada con la concentración del betabel, como se observa en las Figuras 26 y 27.



**Figura 26. Espectro de UV-VIS del betabel de 0.2 a 2 mg/L**



**Figura 27. Curva de regresión de los máximos de absorbancia del betabel**

## 6.7.2. Caracterización por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Para la caracterización de los pigmentos del xoconostle, se realizaron primero los cromatogramas de HPLC, tomando al betabel como referencia, y considerando los tiempos de retención de los pigmentos del betabel a dos longitudes de onda,  $\lambda = 484 \text{ nm}$  y  $\lambda = 535 \text{ nm}$ , para betaxantinas y betacianinas respectivamente y utilizando el método isocrático propuesto por Schwartz (1980). En los cromatogramas de la Figura 28a se observan dos picos muy resueltos a 2.5 y 3.48 min de tiempo de retención ( $t_R$ ) y otro menor, a 2.8 min, que probablemente se pueden identificar como betanina (1) e isobetanina (2) para 2.5 y 2.8 min y betanidina (3) para 3.48 min, como lo indica Schwartz y Von Elbe (1980). Cuando se realiza el cromatograma a 535 nm solo se observó un pico muy resuelto a 3.48 min, los demás picos observados anteriormente son menores pero mantienen un tiempo de retención similar (Figura 28b), indicando probablemente que a esta longitud de onda es más resuelta la betanidina que las anteriormente indicadas.

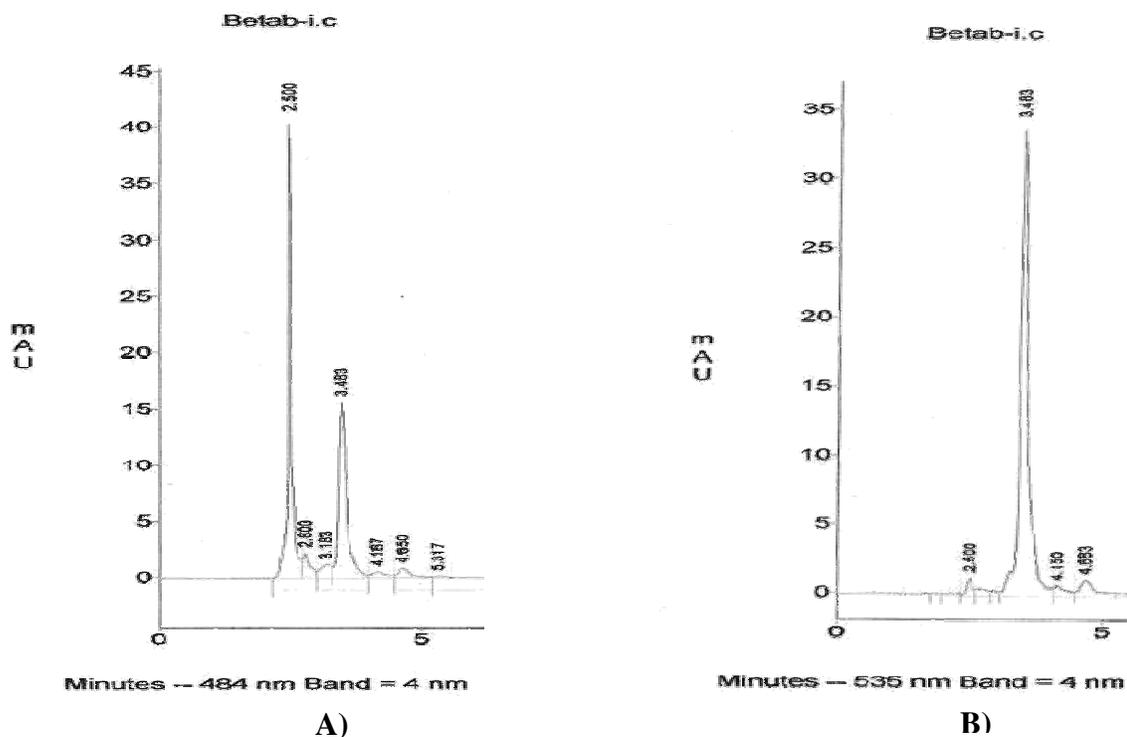
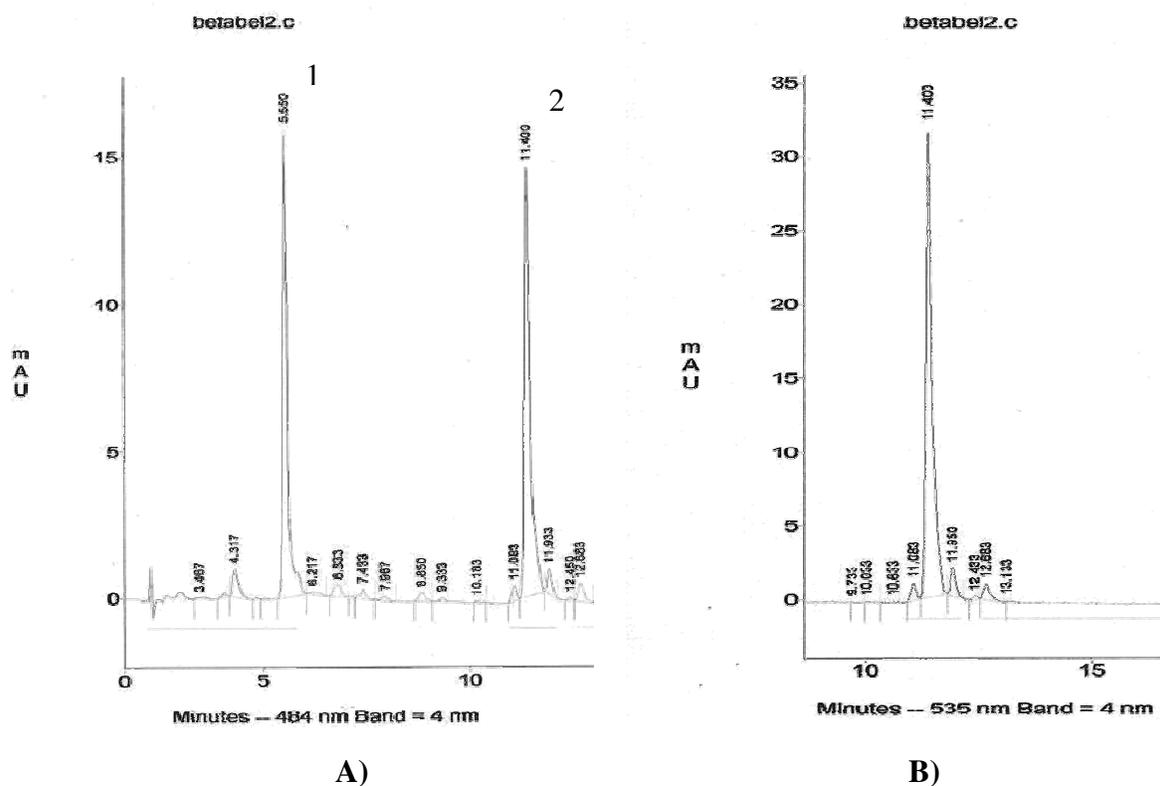


Figura 28. Cromatogramas de HPLC por elución isocrática de los pigmentos del Betabel.

A)  $\lambda = 484 \text{ nm}$ , (B)  $\lambda = 535 \text{ nm}$

Utilizando el método de gradientes, se tuvo una mejor separación de los pigmentos en el betabel, como se puede observar en la Figura 29. Cuando se evalúa a 484 nm, se obtienen dos picos, el pico 1 puede ser de la betanina y el pico 2 la isobetanina, como ha sido indicado por Schwartz y Von Elbe 1980 y Reynoso et al., (1997).

Nuevamente, cuando se realiza el cromatograma a 535 nm se observó un solo pico a 11.4 min que puede corresponder a la betanina.



**Figura 29. Cromatogramas HPLC por elución de gradiente de los pigmentos del betabel. (A)  $\lambda= 484$  nm, (B)  $\lambda= 535$  nm.**

Una vez que el método se adecuó con los pigmentos del betabel, utilizado como referencia, se obtuvieron los cromatogramas de HPLC para el xoconostle y la tuna roja, como se observa en la Figura 30. En los cromatogramas de tuna roja a 480 nm se observaron 4 picos que pueden corresponder a la betanina (1), isobetanina (2), betanidina o filocactina (3) y betaxantina (A), responsables de la coloración roja. Cuando se realizó el cromatograma a 535 nm, no se observó el pico (A), manteniendo los demás picos correspondientes a los pigmentos indicados

anteriormente. En el caso del xoconostle, a 480 nm también se observaron 4 picos con los mismos tiempos de retención que la tuna roja, lo que indica la presencia de estas 4 betalaínas pero en menor concentración. También en los cromatogramas a 535 nm, sólo se observó la presencia de 3 picos correspondientes a la betanina (1), isobetanina (2) y filocactina (3). En estas muestras, la betanina (1) fue la mayoritaria, pero en xoconostle hubo mayor cantidad de isobetanina (2) y filocactina (3) que en la tuna roja, con menor resolución (Reynoso et al., 1997).

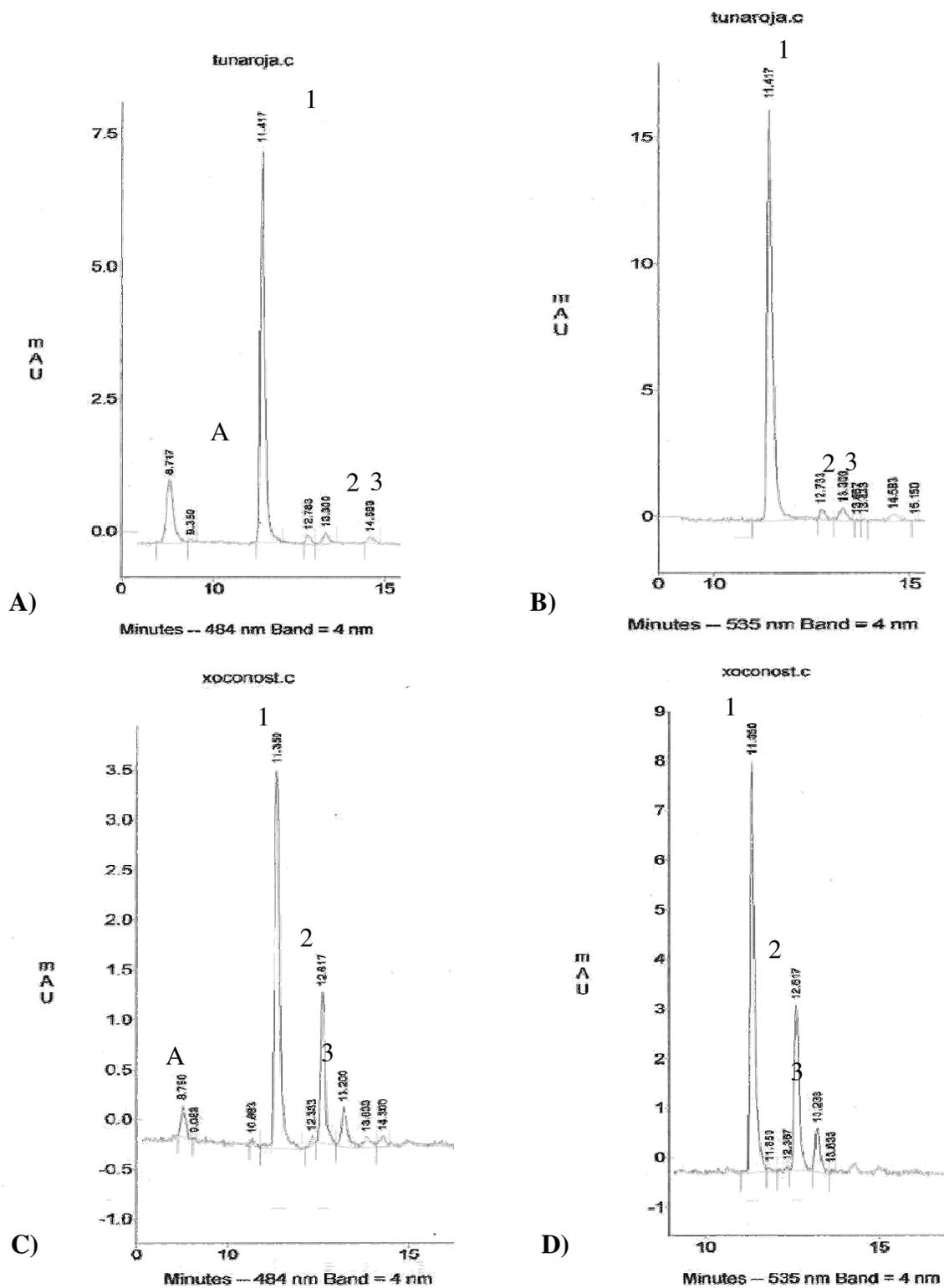


Figura 30. Cromatogramas HPLC por elusión de gradiente con un tiempo de retención entre 8-15 min. De la tuna roja (A) $\lambda= 484$  nm (B) $\lambda= 535$  nm y el xoconostle (C)  $\lambda= 484$ nm (D) $\lambda= 535$  nm

## 6.8. Identificación de la estructura por RMN

La identificación de los pigmentos, que se separaron por cromatografía de columna obtenida por amberlita, sephadex y C<sub>18</sub> de fase reversa, no se pudieron identificar por resonancia magnética nuclear debido al alto contenido de azúcares que se encuentran enlazados a su estructura o se encuentran embebidos en algunos oligosacáridos que no se pudieron separar por las técnicas propuestas en la revisión bibliográfica. No fue posible observar los espectros definidos de los desplazamientos esperados para el ácido betalámico observado en RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Sólo se pudieron comprobar cuatro enlaces glucósidicos, donde se podría tener cuatro azúcares, dos diglucósidos o una variedad de combinaciones que pueden enlazarse en el ciclo dopa de las betalaínas (apéndice III).

## 7. CONCLUSIONES

- El mejor disolvente para la extracción de los pigmentos del xoconostle fue metanol/agua (80:20), comparada con los diferentes disolventes estudiados.
- El mayor rendimiento en la extracción y la menor degradación de los pigmentos fue obtenida en ausencia de luz, trabajando a una temperatura de 4°C y evitando corrientes de aire. El diagrama de flujo de extracción propuesto fue mejorado, realizando primero la centrifugación y enseguida la filtración para evitar la obstrucción de los poros del filtro.
- Las betalaínas en solución a pH alcalino (9 a 11) tienen una disminución en la absorbancia de estos pigmentos, esto probablemente se deba a que tanto en las betaninas como en las isobetaninas pueda ocurrir una ruptura en el enlace aldimina, obteniendo dos compuestos, uno de ácido betalámico (color amarillo brillante) y otro de Ciclo Dopa 5-O-β-glucósido (incolore). Resultados similares fueron observados a pH ácido (menor a 3).

- Los pigmentos del xoconostle fueron estables a pH ácido-neutro (3-7), mostrando mayor estabilidad a pH 5. Debido a esta estabilidad estos colorantes naturales podrían tener un uso potencial en alimentos, substituyendo a los colorantes artificiales.
- Cuando las betalaínas del xoconostle cuando fueron procesadas a temperaturas mayores a la temperatura ambiente, perdieron color debido a una probable deshidrogenación y descarboxilación formando los compuestos de neobetainas (amarillo) y 17-decarboxi-betanina (naranja rojo).
- Se ha observado que el efecto combinado del pH y la temperatura provoca una mayor deshidrogenación y descarboxilación de las betalaínas del xoconostle. Cuando se tiene pH alcalino y alta temperatura la pérdida de color es mayor debido a que se incrementa la ruptura del enlace almidina resultando en compuestos incoloros.
- Las principales betalaínas del xoconostle caracterizadas por las técnicas usadas de cromatografía en columna, TLC, UV-VIS y HPLC fueron betanina, isobetanina, betanidina o filocactina e isobetanidina pudiendo observar por comparación y también las betaxantinas en forma natural.

## 8. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Una mayor caracterización de las betalaínas del xoconostle a través técnicas de RMN después de separar mejor los azúcares con los que se encuentra enlazado.
- Estudiar o determinar que azúcares (pentosas o hexosas) están enlazadas a las betalaínas del xoconostle y determinar si la separación de estas agliconas disminuyen la estabilidad de las betalaínas.
- Aplicar un método de cromatografía HPLC con una columna preparativa, para poder separar las betalaínas de los compuestos que interfieren en su determinación y cuantificación.
- Estudiar el método de cromatografía HPLC acoplado a masas (HPLC-DAD) para la identificación de las betalaínas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Allegra, M., Furtmüller, P. G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Tesoriere, L., Livrea, M. A., and Obinger, C. **2005**. Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 332, 837-844.
2. Altamirano, R. C., Drdák, M., Simon, P., Rajniakoba, A., Karovicová, J., and Preclík, L., **1993**. Thermal degradation of betanine in various water alcohol model systems, *Food Chem.*, 46, 73-75.
3. Arias, M. C. G. y Martínez, C. M. A. **1988**. Jardín de introducción de procedencia de Nopal (*Opuntia sp.*). *En: Memoria de la III Reunión Nacional y I Reunión Internacional. El Nopal. 10-14 de octubre. Saltillo. Coah. México pp: 81-86.*
4. Attoe, E. L. y von Elbe, J. H. **1985**. Oxygen Involvement in Betanine Degradation: Effect of antioxidants. *J. Food Sci.*, 50:106.
5. Attoe, E. L. and von Elbe, J. H. **1981**. Photochemical degradation of betanine and isolated anthocyanins, *J. Food Sci.* 46: 1934-1937.
6. Aurstad, K. and Dahle, H. K., **1973**. The effect of heat treatment UV and gamma radiation on some beet root pigments, *Z. Lebensm. Unters-Forsch.*, 151: 171-174.
7. Bedolla, B. S., Dueñas, G. C., Esquivel, I. I., Favela, T. T., Guerrero, H. R., Mendoza, M. E., Navarrete, L. A., Olguín, M. L. E., Ortiz, G. J., Pacheco, P. O., Quiroz, B. M., Ramirez, S. A., Trujillo, C. M. **2003**. *Introducción a la Tecnología de Alimentos 2da. ed. Ed. Limusa, México Distrito Federal.*
8. Bilyk, A., **1979**. Extractive fractionation of betalains, *J. Food Sci.*, 44, 1249-1251.
9. Bilyk, A., Kolodij M. A., and Sapers, G. M., **1981**. Stabilization of red beet pigments with isoascorbic acid. *J. Food Sci.*, 46, 1616-1617.
10. Böhm, H. and Rink, E., **1988**. Betalains. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, New York, 449-463.*

11. Bokern, M. and Strack, D., **1988**. Synthesis of Hydroxycinnamic Acid Esters of Betacyanins via 1-*O*-acylglucosides of Hydroxycinnamic Acids by Protein Preparations from Cell Suspension Cultures of *Chenopodium rubrum* and Petals of *Lampranthus sociorum*, *Planta*, 174: 101-105.
12. Borrego, E. F. y Burgos, V. N. **1986**. El Nopal. Ed. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México, p.145.
13. Bravo, H. H. **1978**. Las Cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Volumen I.
14. Butera, D., Tesorire, L., Di Gaudio, F., Bongiorno, A., Allegra, M. Pintaudi, A. M., Kohen, R. and Livrea, M. A. **2002**. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6895-6901.
15. Cai, Y. Z., Corke, H. **1999**. *Amaranthus* betacyanin pigments applied in model food systems. *J. Agric. Food Chem.* 64, 869-873.
16. Cai, Y. Z., Sun M., Corke, H. **1998**. Colorant Properties and Stability of *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4491-4495.
17. Cai, Y. Z., Sun, M., Schliemann, W., Corke, H. **2001**. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigment from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4429-4435.
18. Cai, Y., Sun, M. and Corke, H. **2003**. Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *J. Agric, Food Chem.* 51, 2288-2294.
19. Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W. and Corke, H., **2001**. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigments from *Celosia argentea*. *J. Agric, Food Chem.* 49, 4429-4435.
20. Casas, A. and Barberá, G. 2002. Mesoamerican domestication and diffusion. In P. S. Nobel (Ed), *Cacti. Biology and uses* (pp. 143-162) Berkeley/ Los Angeles/ London: University of California Press.
21. Castellanos, C. P., I. E. López C., J. M. De Luna E. Y C. A. Flores V. **1999**. Costos de Producción y Comercialización de Tuna (*Opuntia* spp.) en la Región de San Martín de las Pirámides. *En: Memoria del VIII Congreso*

- Nacional y IV Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento de el Nopal. 6-10 de septiembre. San Luís Potosí, México. pp: 54-55.
22. Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M. and Fernandez, J. A., **2003**, Color Properties and Stability of Betacyanins from Opuntia Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2772-2776.
  23. Clement. J. S., Mabry. T. J. **1996**. Pigment evolution in the Caryophyllales: a systematic overview. *Botánica Acta.* 109. 360-367.
  24. Colunga, G. M. S., Hernández, X. E., y Castillo, M. A. **1986**. Variación morfológica, manejo agrícola tradicional y grado de domesticación de *Opuntia* spp. En el Baj o Guanajuatense. *Agrociencia.* 65, 7.
  25. Cohen, E., Saguy, I. **1983**. Effect of water activity and moisture content on the stability of beet powder pigments. *J. Food Sci.* 48 703-707.
  26. De León, R. J. M., J. M. De Luna E. y C. A. Flores V. **1999**. Costos de Producción y Comercialización de Tuna (*Opuntia* spp.), en el Altiplano Potosino-Zacatecano. *En: Memoria del VIII Congreso Nacional y IV Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento de el Nopal.* 6-10 de septiembre. San Luís Potosí, México. pp: 56-57.
  27. Delgado-Vargas, F., A. R. Jiménez, and O. Paredes-López. **2000**. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 40: 173-289.
  28. Dominguez-Lopez., A. **1995**. Review: Use of the Fruits and Stems of the Prickly Pear Cactus (*Opuntia* spp.) into Human Food. *Food Sci. Technol. Int.* 1, 65-74.
  29. Drd k, M., and Vallová, M., **1990**. Kinetics of the thermal degradation of betanine, *Die Nahrung*, 34, 307-310.
  30. Fennema Owen R. Dekker M. **1996**. Química de los alimentos. N. Y. pag 826-833.
  31. Fernández-López, J. A., Castellar, R., Ob n, J. M., Almela, L. **2002**. Screening and Mass-Spectral Confirmation of Betalains in Cactus Pears. *Cromatographia*, 56(9):591-594.

32. Fernandez, M. L., Lin, E. C., Trejo, A., McNamara, D.J. **1992**. Prickly Pear (*Opuntia sp*) Pectin Reverses Low-density Lipoprotein Receptor Suppression Induced by a Hypercholesterolemia Diet in Guinea Pigs. *J. Nutr.*, 122, 2330-2340.
33. Filardo, K. S., Peña, R. M., Scheinvar, L., Cruz M., B. R., Tapia A., J. T., y Estrada, Z. **2006**. Validación de un mermelada elaborada con xoconostle (*Opuntia matudae* sheinvar). *Tecnología*. Enero/Febrero. 18-29.
34. Forni, E., Polesello, A., Montefiori, D., Maestrelli, A. **1992**. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of the Pigments of Blood-Red Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*). *J. Chromatographic*. 593, 177-183.
35. Fossen, T., Slimestad, R., Ovstedal, D. O., & Andersen, O. M. **2002**. Anthocyanins of grasses. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 855-864.
36. Frati, A. C., Jiménez, E., Ariza, C. R. **1990**. Hypoglycemic Effect of *Opuntia ficus indica* in non insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Phytother. Res.* 4, 195-197.
37. García-Pedraza, L. G., Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., Pinos-Rodríguez, J. M. **2005**. Preliminary Nutritional and Organoleptic Assessment of Xoconostle Fruit (*Opuntia spp.*) as a Condiment or Appetizer. *Italian J. Food Sci.* 17(3), 333-340.
38. Gurrieri, S., Miceli, L. C., Lanza, M., Tomaselli, F., Bonomo, R. P., and Rizzarelli, E. **2000**. Chemical Characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) and Perspectives for the Storage of Its Juice. *J. Agric Food Chem.* 48, 5424-5431.
39. Harland, J. R. **1992**. *Crops and Man* 2<sup>nd</sup> ed. American Society of Agronomy and Crop Science Society of American, Madison, Wisconsin.
40. Herbach K. M., Stintzing, F. C. and Carle R. **2004**. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J. Food Sci.* 69, 491-498.

41. Herwood, D. A. **1990**. Human healthy discoveries with *Opuntia sp.* (Prickly pear). *Hort. Sci.* 25, 1515-1516.
42. Huang, A. S., and Von Elbe, J. H. **1985**. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci*, 50, 1115-1120, 1129.
43. Huang, A. S., and Von Elbe, J. H. **1987**. Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *J. Food Sci*, 52, 1689-1693.
44. Jackman, R. L. and Smit, J. L. **1996a**. Anthocianins and betalains. In G. F. Hendry, and J. D. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants* (pp. 244-309). London: Blackie Academic and Professional.
45. Jackman, R. L.; Smith, J.L. **1996b**. In *Natural Food Colorants*, 2<sup>nd</sup> Ed.; Hendry, G. A. F.; Houghton, J. D. Eds., Blackie, London.
46. Kujala, T., Loponen, J., Pihlaja, K. **2001**. Betalains and phenolics in red beet root (*Beta vulgaris*) peel extracts: extraction and characterization. *Z. Naturforsch.* 56c, 343-348.
47. López, Z., E., **1977**. El agua, la tierra, los hombres de México, Ed. Fondo de Cultura Económica, México, p.321.
48. Mabry, T. J., **1980**. Betalains. In: Bell, E. A. and Charlwood, B. V. Eds. *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol 8, *Secondary Plant Products*. Springer-Verlag, Berlin, 513-533.
49. Mabry, T. J., and Dreiding, A. S. **1968**. The Betalains. In: Mabry, R., Alston, E., and Runeckless, V. C., Eds., *Recent advances in Phytochemistry*, Vol. 1, Appleton Century Crofts, New York, 145-160.
50. Mayorga, V. M. C., M. Urbiola, L., G. Suárez R. Y H. M. Escamilla S. **1988**. Estudio Agronómico de Xoconostle *Opuntia spp.* En la Zona Semiárida del Estado de Querétaro. *In: Memoria de la III Reunión Nacional y I Reunión Internacional. El Nopal. 10-14 de octubre. Saltillo. Coah. México pp: 239-245.*
51. Mazza, G., Miniatti, E. **1993**. Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton/ Ann Arbor/ London/ Tokyo: CRC Press.
52. Mondragón, J. C. Pérez, G. S. **1994**. Reyna (syn, Alfajayucan) is the leading cactus pear cultivar in Central Mexico. *Fruit Varieties J.* 48, 134-136.

53. Minale, L., Piatelli, M., De Stefano, S., and Nicolaus, R. A., **1966**. Pigments of Centrospermae VI. Acylated Betacyanins, *Phytochemistry*, 5: 1037-1052.
54. Muñoz de Chavez, M.; Chavez, A.; Valles V.; Roldan, J. A. **1995**. A plant of Mainfold Qualities. In *Wold Review of Nutrition and Dietetics*, Simopoulos, A. P., Ed., Karger: Basel, Switzerland. 77, 109-134.
55. Nerd, A., Mizrahi, Y. **1999**. The effect of ripening stage on fruit quality after storage in yellow pitaya. *Postharvest Biology and Technology*. 15, 99-105.
56. Norma Oficial Mexicana. NOM-116-SSA1-1994, bienes y servicios determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico método por arena o gasa.
57. Norma Oficial Mexicana. NOM-086-SSA1-1994, bienes y servicios. alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. especificaciones nutrimentales.
58. Norma Mexicana. NMX-F-608-NORMEX-2002 - Alimentos- Determinación de Proteínas en alimentos-Método de prueba.
59. Norma Mexicana. NMX-F-607-NORMEX-2002 - Alimentos- Determinación de cenizas en alimentos- Método de prueba.
60. Palevitch, D., Earon, G., Levin, I., **1993**. Treatment of Benign Protatic Hypertrophy with *Opuntia ficus indica* (L) Miller. *J. Herbs. Spices Med. Plants* 2, 45-49
61. Pedreño, M. A., Escribano, J. **2001**. Correlation between antiradical activity and stability of betanin from *Beta vulgaris* L. roots under different pH, temperature and light condition. *J. Sci. Food Agric.* 81, 627-231.
62. Piatelli, M. and Imperato, F., **1970**. Pigments of *Bougainvillea glabra* *Phytochemistry*, 9: 455-458.
63. Piatelli, M. Impellizzeri. G., **1970**. 2-Descarboxybetanidin, a minor Betacyanin from *Carpobrotus acinaciformis*. *Phytochemistry*, 9: 25553-2556.

64. Piatelli, M. and Minale, L., **1964a**. Pigments of Centrospermae. I. Betacyanins from phyllocactus hybridus Hort and *Opuntia ficus-indica*, *Phytochemistry*, 3: 307-311.
65. Piatelli, M. and Minale, L., **1964b**. Pigments of, Centrospermae. II. Distribution of betacyanins, *Phytochemistry*, 3: 547-557.
66. Piatelli, M. B., **1976a**. In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments; Academic Press: London; Chapter 6.
67. Piatelli, M. Betalains. In: Goodwin, T. W., Ed., **1976b**. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Vol. 1*. Academic Press, New York, 560-596.
68. Piatelli, M., **1981**. The Betalains: Structure, Biosynthesis and Chemical Taxonomy. In: Conn, E. E., Ed., and the Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. Vol. 17. Secondary Plant Products, Academic Press, New York, 557-575.
69. Pourrat, A., Lejeune, B., Grand, A., and Pourrat, H., **1988**; Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography, *J. Food Sci.*, 53 (1), 294-295.
70. Rayner, P. B., **1993**. Food and drink colors from natural sources, *Food Marketing Technol.* 7 (1), 9-10.
71. Reyes-Agüero J. A. Aguirre R. J. R. and Valiente B. A. **2005**. Reproductive biology of Opuntia: a review. *J. Arid Environ.* In press.
72. Reynoso, R. García, F. A. Morales, D., and González de Mejía, E. **1997**. Stability of Betalain Pigments from a Cactacea Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2884-2889.
73. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación SAGARPA, 2004. Procesos de estadística básica agropecuaria certificados ER-1282/2004, pag-998. Y anuario Estadístico de la Producción Agrícola 1995-2004. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON).

74. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación SAGARPA, 2005. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesca. Resumen nacional DDR. Año agrícola 2005.
75. Sapers, G. M., Hornstein, J. S. **1979**. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *J. Food Sci.* 44, 1245-1248.
76. Saguy, I., Kopelman, I. J., Mizrahi, S., **1978**. Thermal Kinetic Degradation of Betanin and Betalamic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 26, 360-362.
77. Sánchez, V. G. y B. Figueroa S. **1988**. Estudio Preliminar sobre Distribución y Variabilidad de *O. joconostle* Weber, en el Estado de Zacatecas. *En: Memoria de la III Reunión Nacional y I Reunión Internacional. El Nopal.* 10-14 de octubre. Saltillo. Coah. México pp: 67-72.
78. Sánchez, V. G. y Ortega, D. M. L. **1996**. Componentes químicos durante la maduración del fruto de *Opuntia joconostle* Weber forma cuaresmero. *Agrociencia.* 30, 541.
79. Santamaría F.J. **1992**. Diccionario de Mejicanismos 5 ed. Porrúa, México Distrito Federal.
80. Scheinvar, L. **1988**. Los nopales silvestres del estado de Querétaro en sus tipos de vegetación. *En: Memoria de la III Reunión Nacional y I Reunión Internacional. El Nopal.* 10-14 de octubre. Saltillo. Coah. México pp: 39.
81. Scheinvar, L. **1999**. Biosistemática de los Xoconostles Mexicanos y su Potencial Económico. *En: Memoria del VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento de el Nopal.* 6-10 de septiembre. San Luís Potosí, México. pp: 255-274.
82. Scheinvar, L. **2001**. Estudio Biosistemático de los Xoconostles Mexicanos y su Potencial Económico. *En: Memoria del XV Congreso Mexicano de Botánica.* 13-21 de Octubre. San Luís Potosí, México. pp: 255-274.
83. Schwartz, S. J., Von Elbe, J. H., **1980**. Quantitative determination of individual Betacyanin pigments by high- performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 28, 540-543.

84. Sepúlveda, E., Sáenz C. and Álvarez, M. **2000**. Physical, chemical and sensory characteristics of dried fruit sheets of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. and quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Ital. J. Food Sci.* 12, 47.
85. Simon, P., Drdák, M., and Altamirano, R. **1993**. Influence of water activity on the stability of betanin in various water/alcohol model systems, *Food Chem.* 46: 155-158.
86. Stafford, H. A. **1994**. Review article: Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science.* 101, 91-98.
87. Steglich, W. and Strack, D., **1991**. Betalains. In: Brossi, A., Ed., the Alkaloids. Vol. 39, Academic Press, Orlando, 1-62
88. Steglich, W. Strack, D., **1990**. Betalains. In: The Alkaloids Chemistry and Pharmacology; Brossi, A., Ed., Academic Press: London, 39, 1-62.
89. Stintzing, F. C. and Carle R. **2004**. Functional properties of Anthocyanins and Betalains in Plants, Food, and in Human nutrition. *Trends in Food Science y Technology.* 15, 19-38.
90. Stintzing, F. C. Schieber, A., y Carle, R. **1999**. Amino Acid Composition and Betaxanthin Formation in Fruits from *Opuntia ficus indica*. *Planta Medica,* 65, 632-635.
91. Stintzing, F. C. Schieber, A., y Carle, R. **2002**. Identification of betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.), by High-performance Liquid Chromatography-electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem,* 50, 2302-2307.
92. 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.
93. Stintzing, F. C., Conrad J., Klaiber I., Beifuss U. and Carle, R. **2004**. Structural Investigations on Betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry.* 65, 415-422.
94. Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle R., Yi, W., Selleppan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., and Felker, P. **2005**. Color, Betalain

- Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *J. Agric. Food Chem.* 53, 442-451.
95. Stuppner, H. and R. Egger. **1996**. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris*. *Journal of Chromatography* 735: 409-413.
  96. Strack, D., Steglich, W., and Wray, V., **1993**. Betalains. In: Methods in plant Biochemistry Vol. 8, Academic Press Orlando 421-450.
  97. Strack, D., Vogt, T., and Shliemann, W. **2003**. Recent Advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.
  98. Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M., and Livrea, M. A. **2005**. Distribution of Betalains Pigments in Red Blood Cells After Consumption of Cactus Pear Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex Vivo Induced Oxidative Hemolysis in Humans. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1266-1270.
  99. Trezzini, G. F. and Zrýd, J. P. **1991**. Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochemistry*, 30(6): 1901-1903.
  100. Trezzini, G. F. and Zrýd, J. P. **1991**. Two Betalains from *Portulaca grandiflora*, *Phytochemistry*, 30(6): 1897-1899.
  101. Vicent, K. R. and Scholz, R. G., **1978**. Separation and quantification of red beet Betacyanins and betaxanthins by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food. Chem.* 264, 812.816.
  102. Viguera G. A. L. and Portillo L. **2001**. Uses of *Opuntia* species and the potencial impact of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) in México. *Fla. Entomol.* 84, 493.
  103. Vilorio-Matos A, Moreno-Álvarez M. J. **2001**. Betalaínas: una síntesis de su proceso *BIOTAM*. 12 (3) 7-18.
  104. Vilorio-Matos A, Moreno-Álvarez M. J. Hidalgo-Báez D. **2001**. Isolation and identification of betacyanin in *Opuntia boldinghi* Br. Et R. by HPTLC. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3, 140-143.

105. Vincent, K. R. Scholz, R. G. **1978**. Separation and quantification of red beet Betacyanins and betaxanthins by high-performance liquid chromatography *J. Agric. Food Chem.* 264, 812-816.
106. Vitoria-Matos A, Corbelli-Moreno D. **2001**. Evaluación del contenido y estabilidad de bataínas en pulpa de fruto *Opuntia boldinghii* Br. Et R. Tesis. Universidad Simón Rodríguez. Canoabo, Venezuela. 70 pp.
107. Von Elbe, J. H. **1975**. Stability of Betalains as Food Colors. *Food Technol.* 29, 42-46.
108. Von Elbe, J. H. **1977**. In Current Aspects of Food Colorants, Furia. T., Ed., CRC Press, Cleveland, OH. 29-39.
109. Von Elbe, J. H., Klement, J. T., Amundson, C. H., Cassens, R. G., Lindsay, R. C. **1974**. *J. Food Sci.*, 39, 123-132.
110. Von Elbe, J. H., **1987**. Influence of water activity on pigment stability in food products. In: Rockland, L. B. and Belichat, L. R., Eds., *Water Activity: Theory and Applications to food*, IFT Basic Sym. Ser. Marcel Dekker, New York, 55-83.
111. Zavaleta-Beckler, P., Olivares-Orozco, L. J., Montiel-Salero, D., Chimal-Hernández, A. y Scheinvar, L. **2001**. Fertilización Orgánica en xoconostle (*Opuntia joconostle* y *O. Mutudae*). *Agrociencia* 35(6): 609-614.

## APÉNDICE I



### INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

PROL. DE CARPIO Y PLAN DE AYALA  
11340, MÉXICO, D.F.  
FAX: 5356 - 3503

#### DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

México, D.F. a 5 de junio de 2006.

**Q.I. NOE SÁNCHEZ GONZÁLEZ**  
**PROFESOR INVESTIGADOR**  
**DEL CICATA, I.P.N.**

Por medio de la presente tengo el gusto de informar a Usted los resultados del trabajo de identificación taxonómica que se realizó a las muestras vegetales recibidas con fecha 5 de abril del año en curso.

Se recibieron muestras vegetales de 2 tipos de nopal, con las siguientes características:

- a) Muestras de nopal, correspondientes a ramas (pencas), con flores y frutos; con el nombre común de "Nopal xoconostle de tuna rosa". Se menciona que es una planta cultivada, procedente de Zempoala y Pachuca, Estado de Hidalgo.
- b) Muestras de nopal, correspondientes a ramas (pencas), con flores y frutos; con el nombre común de "Nopal xoconostle de tuna roja". Planta cultivada procedente de la misma localidad que la muestra anterior.

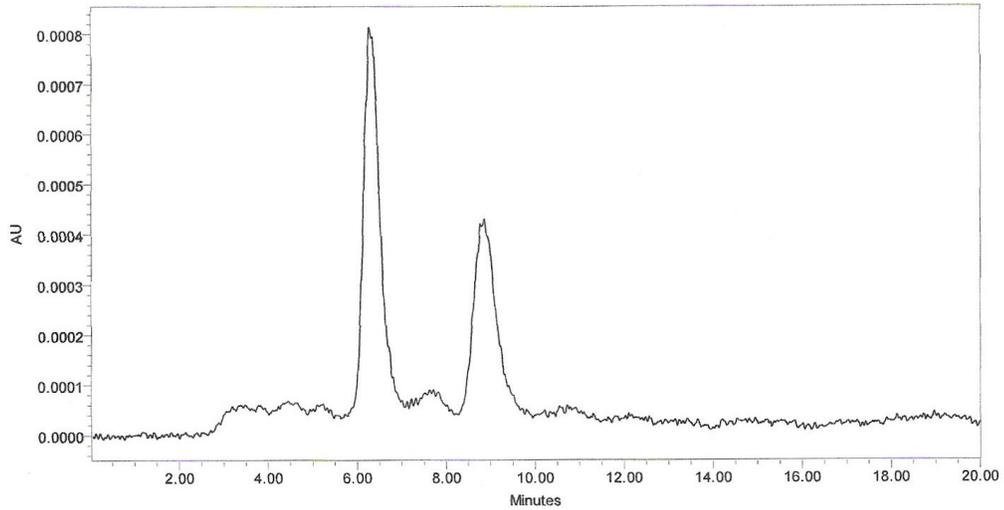
Por las características de las muestras, primeramente se procedió a revisar las características morfológicas de la flor, el fruto y las ramas de cada ejemplar, posteriormente y con base en Claves Taxonómicas especializadas se identificó hasta especie cada una de las muestras, una vez identificadas se revisó la descripción botánica correspondiente comparándola con los ejemplares. Concluida la identificación, se procedió a corroborar con ejemplares depositados en el herbario ENCB de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del I.P.N.

Finalmente podemos informar a Usted, que todas las muestras proporcionadas corresponden a la especie:

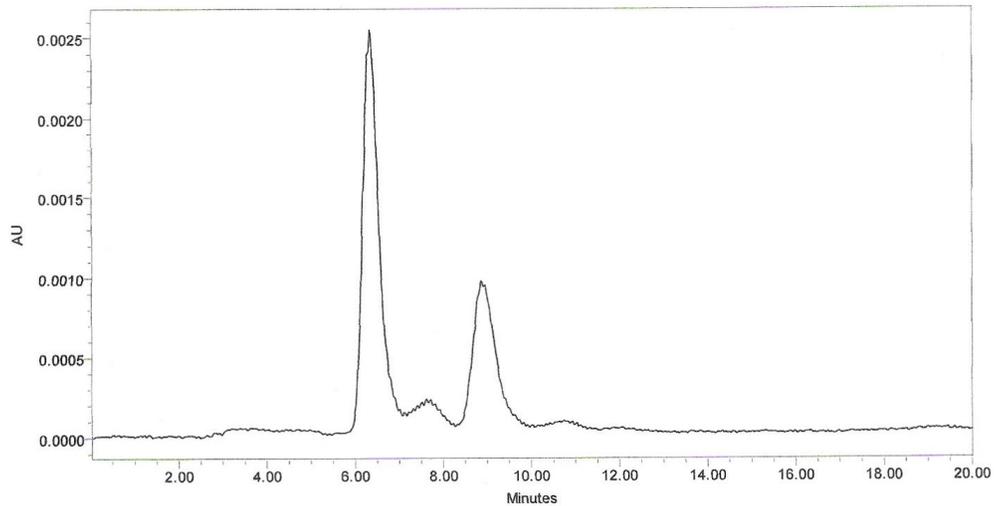
***Opuntia joconostle* Weber in Diguét** ----- **Nopal Xoconostle**  
**Familia Botánica CACTACEAE**

## APÉNDICE II

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Columna Si	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	8/4/06 12:55:12 PM
Vial:	3	Acq. Method Set:	VITAMINAS
Injection #:	1	Date Processed:	****
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	****
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	****
Sample Set Name:	4 Agosto 06	Proc. Chnl. Descr.:	****

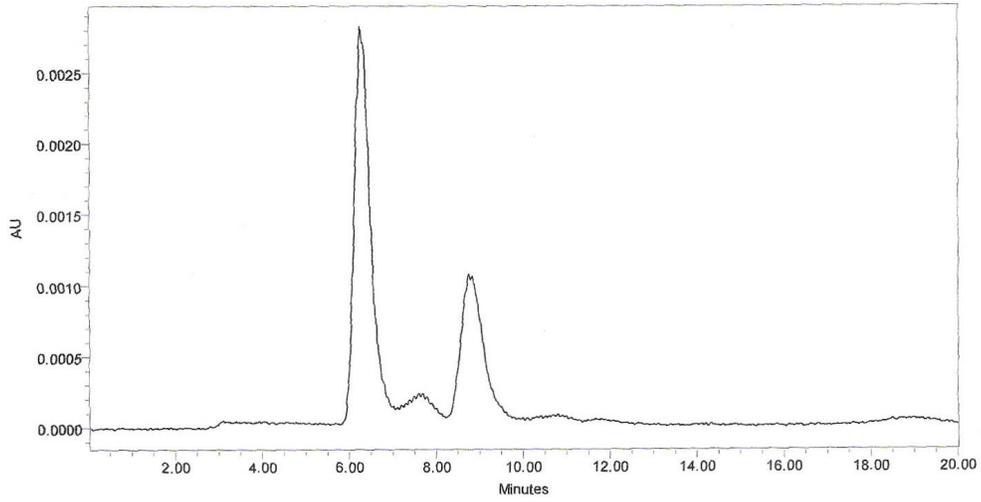


SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	Shephadex	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	8/4/06 12:33:48 PM
Vial:	2	Acq. Method Set:	VITAMINAS
Injection #:	1	Date Processed:	****
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	****
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	****
Sample Set Name:	4 Agosto 06	Proc. Chnl. Descr.:	****



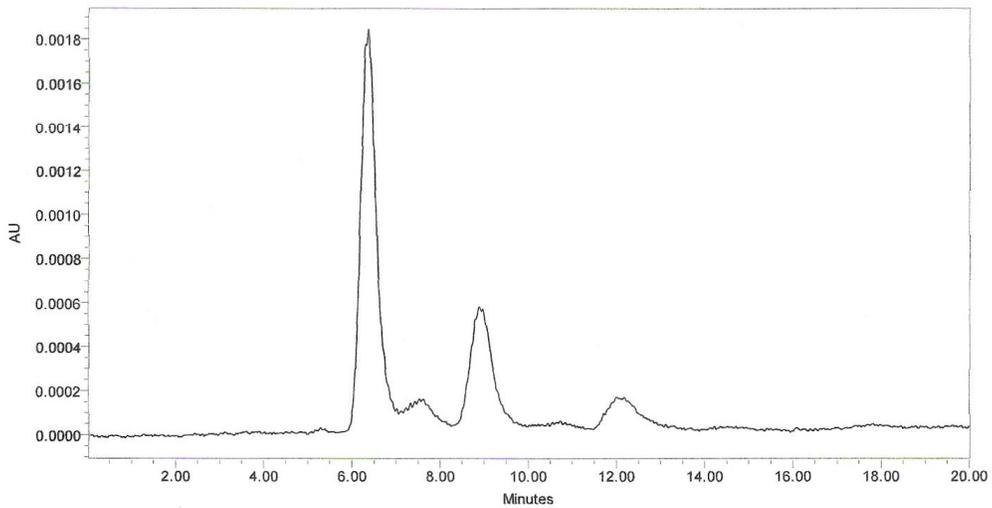
### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Amberlita	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	8/4/06 1:16:37 PM
Vial:	4	Acq. Method Set:	VITAMINAS
Injection #:	1	Date Processed:	****
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	****
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	****
Sample Set Name:	4 Agosto 06	Proc. Chnl. Descr.:	****

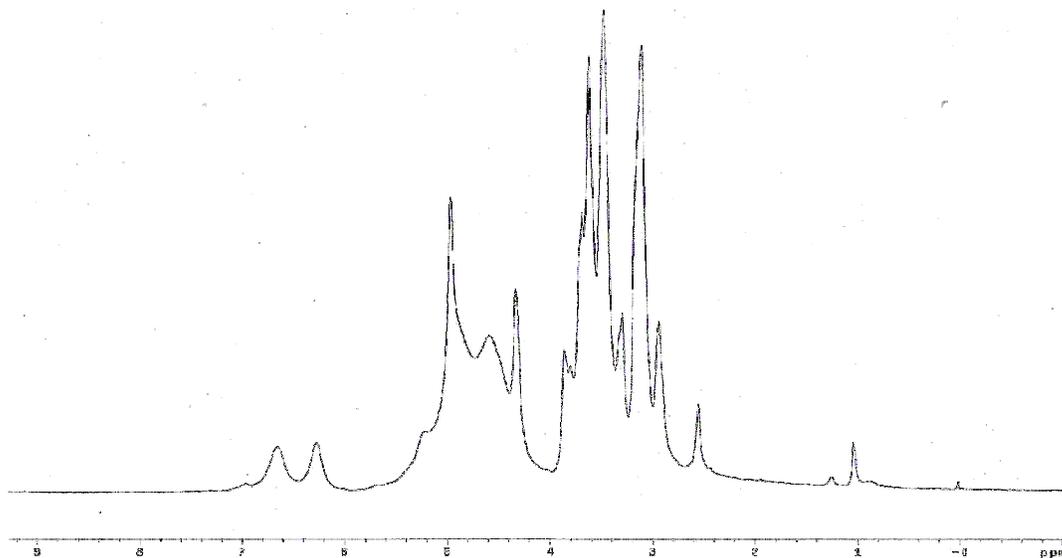


### SAMPLE INFORMATION

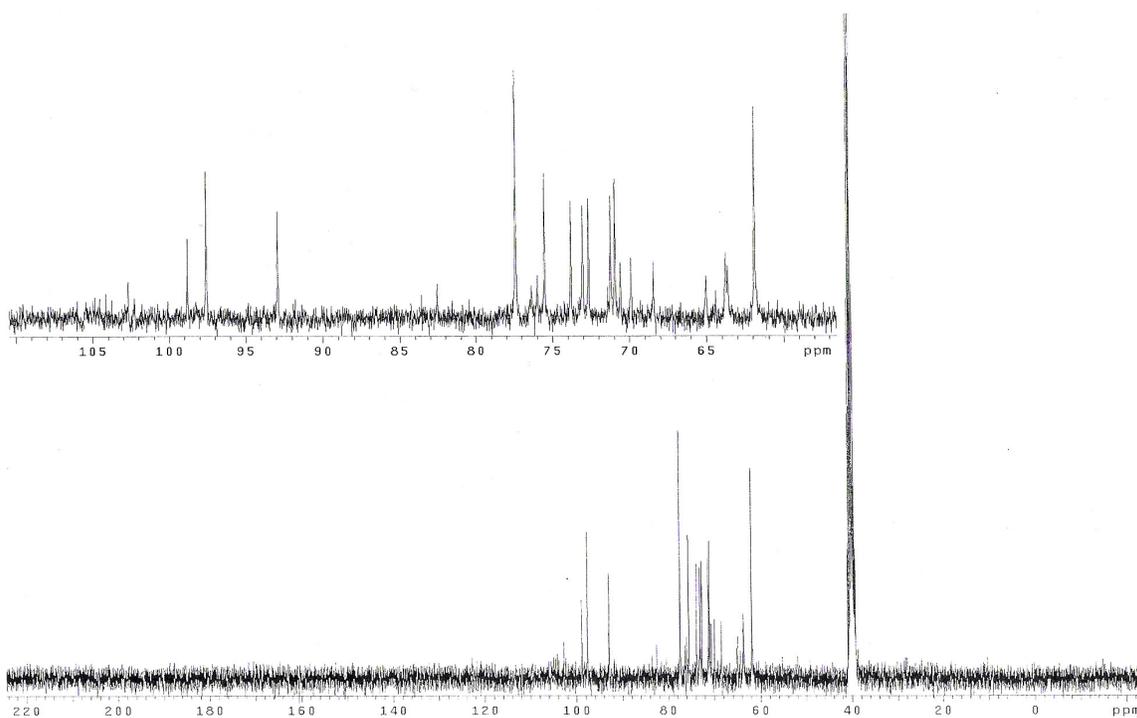
Sample Name:	Figmento	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	8/4/06 12:12:23 PM
Vial:	1	Acq. Method Set:	VITAMINAS
Injection #:	1	Date Processed:	****
Injection Volume:	20.00 ul	Processing Method:	****
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	****
Sample Set Name:	4 Agosto 06	Proc. Chnl. Descr.:	****



### APÉNDICE III



Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ .



Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$ .

## APENDICE IV

### ANOVA Superficie de respuesta del modelo cuadratico del sistema de extracción I: Disolvente metanol

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	2192.20	9	243.58	37.04	0.0005
Residual	32.88	5	6.58		
<i>Lack of Fit</i>	28.19	3	9.40	4.01	0.2060
<i>Pure Error</i>	4.69	2	2.34		
Cor Total	2225.08	14			

Root MSE	2.56	R-Squared	0.9852
Dep Mean	76.42	Adj R-Squared	0.9586
C.V.	3.36	Pred R-Squared	0.7925
PRESS	461.62	Adeq Precision	17.003

Desire > 4

Factor	Coefficiente Estimado	Standar GL	Error	t for H <sub>0</sub> Coeff=0	Prob >  t	VIF
Intercepto	79.67	1	1.48			
A-Temperatura (°C)	-1.76	1	0.91	-1.94	0.1095	1.00
B-Tiempo (min)	-0.91	1	0.91	-1.01	0.3604	1.00
C-Metanol (%)	-15.40	1	0.91	-16.99	< 0.0001	1.00
A <sup>2</sup>	0.079	1	1.33	0.059	0.9550	1.01
B <sup>2</sup>	1.38	1	1.33	1.030.3488	1.01	
C <sup>2</sup>	-7.55	1	1.33	-5.65	0.0024	1.01
AB	1.93	1	1.28	1.500.1936	1.00	
AC	2.40	1	1.28	1.870.1201	1.00	
BC	-0.10	1	1.28	-0.078	0.9409	1.00

#### Ecuación en terminos de factores actuales:

$$\begin{aligned}
 \text{Betacianina (mg/100g)} = & \\
 & +106.04 \\
 & -0.66 * \text{Temperatura (°C)} \\
 & -0.90 * \text{Tiempo (min)} \\
 & -0.087 * \text{Metanol (\%)} \\
 & +5.067\text{E-}04 * \text{Temperatura (°C)}^2 \\
 & +0.014 * \text{Tiempo (min)}^2 \\
 & -4.716\text{E-}03 * \text{Metanol (\%)}^2 \\
 & +0.015 * \text{Temperatura (°C)} * \text{Tiempo (min)} \\
 & +4.800\text{E-}03 * \text{Temperatura (°C)} * \text{Metanol (\%)} \\
 & -2.500\text{E-}04 * \text{Tiempo (min)} * \text{Metanol (\%)}
 \end{aligned}$$

**ANOVA Superficie de respuesta del modelo cuadratico  
del sistema de extracción I: Disolvente etanol**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL</b>	<b>Media Cuadrado</b>	<b>F Valor</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Modelo	5405.03	9	600.56	14.07	0.0048
Residual	213.47	5	42.69		
Falta de ajuste	192.81	3	64.27	6.22	0.1416
Error puro	20.67	2	10.33		
Cor Total	5618.50	14			

Raíz MSE	6.53	R-Cuadrado	0.9620	
Dep Media	66.62	Adj R-Cuadrado	0.8936	
C.V.	9.81	Pred R-Cuadrado	0.4427	
PRESS	3131.42	Adeq Presición	10.403	Desire > 4

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente Estimado</b>	<b>Standar GL Error</b>	<b>t de H0 Coeff=0</b>	<b>Prob &gt;  t </b>	<b>VIF</b>	
Intercepto	80.07	1	3.77			
A-Temperatura (°C)	3.26	1	2.31	1.41	0.2170	1.00
B-Tiempo (min)	0.088	1	2.31	0.038	0.9713	1.00
C-Etanol (%)	-22.52	1	2.31	-9.75	0.0002	1.00
A <sup>2</sup>	-5.55	1	3.40	-1.63	0.1638	1.01
B <sup>2</sup>	-2.10	1	3.40	-0.62	0.5646	1.01
C <sup>2</sup>	-17.57	1	3.40	-5.17	0.0036	1.01
AB	1.32	1	3.27	0.41	0.7018	1.00
AC	3.45	1	3.27	1.06	0.3393	1.00
BC	-0.20	1	3.27	-0.061	0.9536	1.00

**Ecuación final en terminos de factores actuales:**

$$\begin{aligned}
 \text{Betacianinas (mg/100g)} = & \\
 & +69.17 \\
 & +1.02 \quad * \text{ Temperatura (°C)} \\
 & +0.68 \quad * \text{ Tiempo (min)} \\
 & +0.20 \quad * \text{ Etanol (\%)} \\
 & -0.035 \quad * \text{ Temperatura (°C)}^2 \\
 & -0.021 \quad * \text{ Tiempo (min)}^2 \\
 & -0.011 \quad * \text{ Etanol (\%)}^2 \\
 & +0.011 \quad * \text{ Temperatura (°C)} * \text{ Tiempo (min)} \\
 & +6.900\text{E-}03 \quad * \text{ Temperatura (°C)} * \text{ Etanol (\%)} \\
 & -5.000\text{E-}04 \quad * \text{ Tiempo (min)} * \text{ Etanol (\%)}
 \end{aligned}$$

## APENDICE V

### ANOVA Superficie de respuesta del modelo cuadratico de estabilidad de las betalainas del betabel

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Media Cuadrado	F Valor	Prob > F
Modelo	3.15	9	0.35	48.77	< 0.0001
Residual	0.072	10	7.176E-03		
Falta de ajuste	0.067	5	0.013	13.83	0.0060
Error puro	4.839E-03	5		9.677E-04	
Cor Total	3.22	19			
Raíz MSE	0.085	R-cuadrado		0.9777	
Dep media	0.84	Adj R-cuadrado		0.9577	
C.V.	10.05	Pred R-cuadrado		0.8404	
PRESS	0.51	Adeq Precision		24.701	Desire > 4

Factor	Coefficiente Estimado	DF	Standar Error	t de H <sub>0</sub> Coeff=0	Prob >  t	VIF
Intercepto	1.11	1	0.035			
A-Tiempo (min)	-0.085	1	0.023	-3.69	0.0042	1.00
B- Temperatura (°C)	-0.25	1	0.023	11.11	< 0.0001	1.00
C-(pH)	0.29	1	0.023	12.51	< 0.0001	1.00
A <sup>2</sup>	-0.033	1	0.022	-1.48	0.1700	1.02
B <sup>2</sup>	-0.15	1	0.022	-6.58	< 0.0001	1.02
C <sup>2</sup>	-0.21	1	0.022	9.50	< 0.0001	1.02
AB	-0.033	1	0.030	1.09	0.3005	1.00
AC	-0.083	1	0.030	2.78	0.0196	1.00
BC	-0.11	1	0.030	3.79	0.0035	1.00

#### Ecuación final en terminos de factores actuales:

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbancia} = & -1.94 \\
 & +0.014 * \text{Tiempo (min)} \\
 & +0.023 * \text{Temperatura (°C)} \\
 & +0.85 * (\text{pH}) \\
 & -6.817\text{E-}05 * \text{Tiempo (min)}^2 \\
 & -1.941\text{E-}04 * \text{Temperatura (°C)}^2 \\
 & -0.053 * (\text{pH})^2 \\
 & -5.405\text{E-}05 * \text{Tiempo (min)} * \text{Temperatura (°C)} \\
 & -1.889\text{E-}03 * \text{Tiempo (min)} * (\text{pH}) \\
 & -2.064\text{E-}03 * \text{Temperatura (°C)} * (\text{pH})
 \end{aligned}$$

**ANOVA Superficie de respuesta del modelo cuadratico  
de la estabilidad de las betalainas del xoconostle**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>DF</b>	<b>Media Cuadrados</b>	<b>F Valor</b>	<b>Prob &gt; F</b>
Modelo	0.41	9	0.046	16.69	< 0.0001
Residual	0.027	10	2.729E-03		
Falta de ajuste	0.026	5	5.140E-03	16.21	0.0041
Error	1.585E-03	5	3.171E-04		
Cor Total	0.44	19			

Raíz MSE	0.052	R-Cuadrado	0.9376
Dep media	0.36	Adj R-Cuadrado	0.8814
C.V.	14.42	Pred R-Cuadrado	0.5427
PRESS	0.20	Adeq Precision	12.221

4

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente Estimado</b>	<b>DF</b>	<b>Standar Error</b>	<b>t de H0 Coeff=0</b>	<b>Prob &gt;  t </b>	<b>VIF</b>
Intercepto	0.45	1	0.021			
A-Tiempo (min)	-0.023	1	0.014	-1.64	0.1326	1.00
B-Temperatura (°C)	-0.13	1	0.014	-9.49	< 0.0001	1.00
C-pH	0.052	1	0.014	3.66	0.0044	1.00
A <sup>2</sup>	-2.273E-03	1	0.014	-0.17	0.8721	1.02
B <sup>2</sup>	-0.060	1	0.014	-4.33	0.0015	1.02
C <sup>2</sup>	-0.073	1	0.014	-5.31	0.0003	1.02
AB	-0.011	1	0.018	-0.59	0.5664	1.00
AC	4.625E-03	1	0.018	0.25	0.8073	1.00
BC	0.012	1	0.018	0.63	0.5457	1.00

**Ecuación final en terminos de factores actuales:**

$$\begin{aligned}
 \text{Absorbancia} &= -0.020 \\
 &-2.705E-04 * \text{Tiempo (min)} \\
 &+3.021E-03 * \text{Temperatura (°C)} \\
 &+0.19 * \text{pH} \\
 &-4.696E-06 * \text{Tiempo (min)}^2 \\
 &-7.870E-05 * \text{Temperatura (°C)}^2 \\
 &-0.018 * \text{pH}^2 \\
 &-1.810E-05 * \text{Tiempo (min)} * \text{Temperatura (°C)} \\
 &+1.051E-04 * \text{Tiempo (min)} * \text{pH} \\
 &+2.100E-04 * \text{Temperatura (°C)} * \text{pH}
 \end{aligned}$$

