

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de
Recursos Naturales
(Especialidad en Ingeniería)

**ESTABILIDAD DE LAS BETALAINAS EN JUGO DE PITAYA
(*Stenocereus pruinosus*) SECADO POR ASPERSION**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Marlene Cruz Gracida

Directora:

Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

Santa Cruz Xoxocotlan, Oaxaca

Junio, 2014



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 19 del mes de mayo del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Estabilidad de las Betalainas en Jugo de Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Secado por Aspersión",

Presentado por la alumna:

Cruz	Gracida	Marlene							
Apellido paterno	materno	nombre(s)							
Con registro:									
<table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">A</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">2</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">2</td> <td style="padding: 2px 5px;">6</td> <td style="padding: 2px 5px;">6</td> </tr> </table>			A	1	2	0	2	6	6
A	1	2	0	2	6	6			

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

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
 Directora de tesis

 Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas

 Dr. Juan Rodríguez Ramírez

 Dr. Sadoth Sandoval Torres

 Dra. Anabel López Ortiz

 M. en C. Laura Victoria Aquino González

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

 Dr. Rafael Pérez Pacheco



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
 DE INVESTIGACION PARA EL
 DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
 C.I.I.D.I.R.
 UNIDAD OAXACA
 IPN



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 19 del mes mayo del año 2014, el (la) que suscribe Cruz Gracida Marlene, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro A120266, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas cede los derechos del trabajo titulado: "Estabilidad de las Betalainas en Jugo de Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Secado por Aspersión", 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 **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó quimica_marlen@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Cruz Gracida Marlene



RESUMEN

El color es un atributo de calidad importante en los alimentos, actualmente se emplean colorantes sintéticos por su capacidad de tinción, estabilidad y bajo costo, sin embargo existe evidencia de toxicidad responsable de reacciones de intolerancia y alergias. Por ello nuevos orígenes de colorantes naturales inocuos para los consumidores están siendo estudiados.

Entre los pigmentos naturales de gran interés se encuentran las *betalaínas* y una fuente promisoría de estos pigmentos son los frutos de la cactácea columnar (*Stenocereus pruinosus*), cuyos frutos reciben el nombre genérico de **pitaya de mayo**. Las betalaínas son pigmentos nitrogenados solubles en agua y se dividen en dos grupos: las betacianinas con tonalidades del rojo al violeta y las *betaxantinas* con tonalidades del amarillo al naranja.

Las betalaínas son moléculas químicamente muy sensibles a factores como el pH, temperatura, luz, oxígeno y humedad que afectan su estabilidad. Moléculas termosensibles similares han sido estabilizadas usando el secado por aspersión con ayuda de aditivos, atrapándolas dentro del material para aislarlas de las condiciones ambientales y protegerlas de la oxidación.

Este método se utilizó para encapsular las betalaínas obtenidas del jugo de pitaya de cuatro variedades de color (amarillo, rojo, naranja y guinda) provenientes de Tianguistengo, Oaxaca y dos variedades de color (naranja y guinda) de Puebla, usando como aditivos mezclas de maltodextrina/pectina y variando las condiciones de operación del secador, con el propósito de identificar el efecto de la temperatura y del encapsulante sobre las propiedades químicas.

En los polvos obtenidos se caracterizaron utilizando técnicas cromatográficas (TLC), espectrofotométricas UV-Vis, IR-FT y se cuantificó el contenido de betacianinas por HPLC.

Los resultados mostraron que las características espectrales de los colorantes contenidos en Extractos Orgánicos Totales (EOT) y polvos son consistentes con betacianinas y betaxantinas, mostrando estabilidad al pH ácido y un comportamiento hipsocrómico a pH básico.

La cuantificación de betacianinas se realizó en EOT obtenidos de pulpa y polvos de las variedades de color rojo y guinda. La cuantificación se expresa en ppm de betanina porque los pigmentos contienen en su estructura al menos un segmento del tipo betanina.

La mayor concentración se encontró en las pulpa guinda de Puebla, seguida de la guinda y roja de Oaxaca, demostrando que el origen y las condiciones de desarrollo tienen un efecto. La cuantificación de betacianinas en polvos mostró el mismo comportamiento que en los extractos de pulpa.

Se encontró que cuanto mayor el porcentaje de aditivos y menor la temperatura de secado, mayor es la preservación de los colorantes. Un flujo de alimentación mayor previene la pérdida de color.

Los polvos de pitaya con menor pérdida de pigmentos fueron los obtenidos usando una $T_e=150\text{ }^\circ\text{C}$, un $F_a=2.0\text{ L/h}$, $V_a=27500\text{ rpm}$ y una proporción de aditivos 60/30%.

ABSTRACT

Color is an important attribute of food quality. Synthetic dyes are currently used in the food industry for their ability to color, their stability and their low cost, however there is evidence that their toxicity is responsible for allergic reactions and intolerance. New sources of natural, consumer-safe plant pigments are therefore being studied.

Among the natural pigments that have attracted growing interest are **betalains**, and columnar cactacea (*Stenocereus pruinosus*) fruit, generically known as “pitaya de Mayo”, is a promising source of these pigments. Betalains are water-soluble, nitrogen-containing pigments that can be divided into two groups: red–violet betacyanins and yellow-orange betaxanthins.

Betalains are very sensitive to factors such as pH, temperature, light, oxygen and moisture, all of which affect their stability. Similar thermosensitive molecules have been stabilized with spray drying and the help of additives so as to trap them inside the isolating material thus protecting them from environmental conditions and oxidation.

This method was used to encapsulate pitaya juice betalains obtained from four varieties (yellow, red, orange and purple) from Tianguistengo, Oaxaca and two varieties (orange and purple) from Puebla. The additives used were a maltodextrin / pectin mixture. The operating conditions of the dryer were varied so as to identify the effect of the temperature and of the encapsulant on chemical properties.

The powders were characterized using chromatographic (TLC) and spectrophotometric (UV-Vis and FT-IR) techniques and the betacyanins content was quantified with HPLC.

The spectral characteristics of the natural pigments and powders contained in the total organic extracts (EOT) are consistent with betaxanthins and betacyanins, showing stability at an acidic pH and a basic pH with hypsochromic behavior.

The betacyanin content of pulp and powder was quantified in the red and purple varieties. Quantification is expressed as ppm of betanin, because the pigments contain at least one betanin type segment in their structure.

The highest concentration was found in the Puebla purple pulp, followed by the Oaxaca purple and red pulp, demonstrating that origin and development conditions do have an effect. The betacyanin content of the powders had the same behavior as the pulp extracts.

It was found that the higher the percentage of additives and the lower the drying temperature, the better the preservation of the colorants. A larger feed flow prevents color loss.

Pitaya powders with a reduced pigment loss were obtained with $T_e=150\text{ }^\circ\text{C}$, $F=2.0\text{ /h}$, $V_a= 27500\text{ rpm}$ and an additive ratio of 60/30%.

DEDICATORIA

A Dios: Por ser mi guía, por sostenerme en los momentos de adversidad.

A Ángel: Por tu amor e infinita paciencia, que me ayudaron a alcanzar mis ideales.

A Axel: Por tus palabras: "*Te quiero mucho mami*" que me alientan día a día.

A mis padres: Por su incondicional apoyo, amor y comprensión sin ustedes no lo hubiese logrado.

A mis hermanos: Por sus consejos brindados en los momentos de duda que me incentivaron a seguir.

.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Lilia Leticia Méndez Lagunas, directora de tesis, quién me brindó su apoyo durante la realización de esta investigación y por poner a disposición los medios necesarios para la culminación de éste trabajo.

Agradezco las facilidades proporcionadas por el Laboratorio de Análisis Instrumental de ESIQIE en especial al Dr. Samuel Siles Alvarado por haberme ayudado y permitido realizar los análisis, así como también por sus consejos, lecciones, apoyo incondicional, paciencia y amistad otorgada.

De igual manera a los sinodales asignados, Dr. Juan Rodríguez Ramírez, Dr. Sadoth Sandoval Torres, Dra. Anabel López Ortiz, M en C. Laura Victoria Aquino González, por sus importantes recomendaciones y comentarios para la redacción de la tesis.

Al *Instituto Politécnico Nacional (IPN)* por la beca institucional para llevar a cabo mi estancia de investigación en la ESIQIE-IPN

Al *Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI)* por la beca otorgada durante los periodos: Enero-Diciembre 2012 y Enero-Diciembre 2013.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)* por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema	16
1.2 Justificación	16
1.3 Antecedentes	16
1.4 Objetivo General	17
1.5 Objetivos Especificos	17
1.6 Hipótesis	17

II. MARCO TEORICO

2.1 La cactácea <i>Stenocereus pruinosus</i> .	18
2.2 Betalaínas una clase particular de pigmentos	19
2.3 Estructura de las betalaínas	19
2.3.1 Las Betacianinas	20
2.3.2 Las Betaxantinas	22
2.4 Estabilidad de las betalainas.	22
2.4.1 pH	22
2.4.2 Actividad de Agua	23
2.4.3 Atmosfera	23
2.4.4 Luz	23
2.4.5 Temperatura	23
2.4.6 Cationes Metálicos y enzimas	23
2.5 Reacciones químicas de degradación.	24
2.5.1 Isomerización	25
2.5.2 Desglicosilación.	25
2.5.3 Hidrólisis	25
2.5.4 Descarboxilación	25
2.5.5 Deshidrogenación	26
2.6 Secado por aspersión	26

2.7	Técnicas de Análisis	27
2.7.1	Cromatografía de Capa Delgada (TLC)	27
2.7.2	Espectrometría UV-VIS	27
2.7.3	Espectrometría Infrarrojo (IR-FT)	28
2.7.4	Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC	28

III. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1	Pulpa de pitaya	30
3.1.1	Preparación de extractos	30
3.1.2	Separación	30
3.1.3	Purificación	30
3.1.4	Evaluación de la Influencia del pH	31
3.2	Polvos de pitaya	33
3.2.1	Pitaya de Puebla	33
3.2.2	Pitaya de Tianguistengo Oaxaca	33
3.3	Técnica de Análisis	36
3.3.1	Cromatografía en capa delgada (TLC)	36
3.3.2	UV-Vis	36
3.3.3	IR-FT	36
3.3.4	HPLC	36

IV. RESULTADOS

4.1	Pulpa de pitaya	38
4.1.1	TLC	38
4.1.2	UV-Vis	41
4.2	Polvos de pitaya	47
4.2.1	TLC	47
4.2.2	UV-Vis	48
4.2.3	IR-FT	54
4.2.4	HPLC	54
4.2.4.1	Cuantificación de betanina en EOT	55
4.2.4.2	Cuantificación de betanina en polvos	56

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones	59
5.2 Recomendaciones	60
Referencias	61
Anexos	64

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1	Cactácea <i>Stenocereus pruinosus</i>	18
Figura II.2	Pitaya de mayo	18
Figura II.3	Acido betalámico	19
Figura II.4	Betacianina	20
Figura II.5	Betaxantinas	20
Figura II.6	Betacianinas no glicosidadas (R=H)	20
Figura II.7	Betanidina 5- <i>O</i> glucosido	21
Figura II.8	Betanidina 6- <i>O</i> glucosido	21
Figura II.9	Glutamina-betaxantina	22
Figura II.10	Prolina-betaxantina	22
Figura II.11	Posibles sitios de descarboxilación, deshidrogenación y desglicosilación.	24
Figura II.12	Etapas del secado por aspersion	27
Figura III.1	Esquema de análisis de pulpa de pitaya	32
Figura III.2	Secador por aspersion a escala piloto Niro Atomizer	34
Figura III.3	Esquema de análisis de polvos de pitaya	35
Figura IV.1	Extractos Orgánicos Totales filtrados	38
Figura IV.2	Separación de pigmentos en EOT	38
Figura IV.3	Pigmentos de color precipitados con 1-pentanol	40
Figura IV.4	Espectro UV-Vis en medio acido de los EOT: F.O.A-1 (naranja) y F.O.B-1 (guinda) de Puebla	43
Figura IV.5	Espectro UV-Vis en medio acido de los EOT: F.O.C-1 (amarillo) , F.O.D-1 (rojo), F.O.E-1 (naranja) y FO.F-1 (guinda) de Tianguistengo, Oaxaca	43
Figura IV.6	Cambio de color en medio básico del EOT:F.O.B-1 (Pu)	44
Figura IV.7	Espectro UV-Vis en medio básico del EOT: F.O.B-1 (Pu).	44
Figura IV.8	Espectro UV-Vis en medio básico del EOT: FO.F-1 (TI)	45

Figura IV.9	Espectro UV-Vis en pigmentos de color: F.O.A-2 (naranja) y F.O.B-2 (guinda) (Pu)	46
Figura IV.10	Espectro UV-Vis en pigmentos de color: F.O.C-2 (amarillo) , F.O.D-2 (rojo), F.O.E-2 (naranja) y FO.F-2 (guinda) (TI)	46
Figura IV.11	Cromatografía en capa delgada (TLC) polvos de pitaya	47
Figura IV.12	Espectro UV-Vis de los polvos de pitaya de color guinda (Pu)	49
Figura IV.13	Espectro UV-Vis de los polvos de pitaya de color guinda (TI)	49
Figura IV.14	Espectro UV-Vis de los polvos de pitaya de color rojo de Tianguistengo, Oaxaca	50
Figura IV.15	Perdida de color en los polvos P2-R y P6-R (TI)	50
Figura IV.16	Espectro UV-Vis de los polvos de pitaya de color amarillo (TI)	51
Figura IV.17	Espectro UV-Vis de los polvos de pitaya de color naranja (TI)	51
Figura IV.18	Espectro Infrarrojo de los EOT y polvos	54
Figura IV.19	Concentración de betanina en EOT	56
Figura IV.20	Concentración de betanina en polvos de color guinda (Puebla)	57
Figura IV.21	Concentración de betanina en polvos de color guinda (TI)	57
Figura IV.22	Concentración de betanina en polvos de color rojo (TI)	58

LISTA DE TABLAS

Tabla III.1	Extractos Orgánicos Totales (EOT)	30
Tabla III.2	Fracciones purificadas por columna C ₁₈	31
Tabla III.3	Condiciones de encapsulamiento del jugo guinda (Pu)	33
Tabla III.4	Condiciones de encapsulamiento de los jugos guinda y rojo (TI)	33
Tabla III.5	Condiciones de operación del HPLC	37
Tabla IV.1	Relación de frente (Rf) de los EOT	39
Tabla IV.2	Relación de frente (Rf) de los pigmentos precipitados con 1-pentanol	40
Tabla IV.3	λ_{\max} en EOT de pulpa de pitaya	41
Tabla IV.4	λ_{\max} purificación por columna C ₁₈	42
Tabla IV.5	λ_{\max} en los pigmentos precipitados con 1-pentanol.	45
Tabla IV.6	Rf de los polvos de los compuestos de color presentes en los polvos	48
Tabla IV.7	λ_{\max} de los polvos (Pu)	52
Tabla IV.8	λ_{\max} de los polvos (TI)	53
Tabla IV.9	Modos de vibración presentes en los EOT y polvos	55
Tabla IV.10	Concentración de colorantes en EOT	55
Tabla IV.11	Contenido de humedad en polvos	56

ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
λ_{\max}	Longitud de máxima absorción
ϵ	Factor de polaridad
a_w	Actividad de agua
Ciclo-DOPA	Ciclo-Dihidroxifenilalanina
Nm	Nanómetros
Bs	Base seca
DE	Equivalente de dextrosa
EOT	Extracto Orgánico Total
F.O	Fase orgánica
F.A	Fase acuosa
Fa	Flujo de alimentación
Va	Velocidad de atomización
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IR-FT	Espectrofotometría Infrarrojo por Transformada de Fourier
Pu	Puebla
ppm	Concentración Partes por millón
Rf	Relación de frente
s.s	Sólidos secos
Te	Temperatura de entrada
TLC	Cromatografía de capa delgada
T_R	Tiempo de retención
TI	Tianguistengo
UV-Vis	Espectrofotometria Ultravioleta Visible
Y	Concentración de pigmentos

I. INTRODUCCIÓN

El color es un atributo de calidad importante en los alimentos, actualmente se emplean colorantes sintéticos por su capacidad de tinción, estabilidad y bajo costo. Sin embargo, se ha puesto en evidencia su toxicidad, provocando reacciones de intolerancia y alergias (Azeredo & cols., 2007). Por esto se ha incrementado la búsqueda de nuevos colorantes naturales inocuos para los consumidores (Moreno & cols., 2007). Algunos colorantes naturales tienen además propiedades nutricionales y funcionales favorables para la salud (Pavokovic & cols., 2011; Azeredo & cols., 2006).

Entre estos últimos colorantes se encuentran las *betalaínas*. Estos compuestos son pigmentos nitrogenados solubles en agua y se dividen en dos grupos: las betacianinas (rojo-violeta) y las *betaxantinas* (amarillo-naranja). El ácido betalámico es la unidad estructural básica de estos pigmentos, se encuentra condensado con un aminoácido o una amina en las betaxantinas y conjugado con un *ciclo*-dihidroxiifenilalanina (*ciclo*-DOPA) en las betacianinas (Garcia & cols., 2011).

Las betalaínas presentan propiedades bioactivas antioxidantes gracias a su facilidad para captar radicales libres (Garcia & cols., 2011). Su amina cíclica, análoga a la etoxiquina, es considerado el grupo reductor (Pavokovic & cols., 2011; Moreno & cols., 2007). Las betalaínas son moléculas químicamente muy sensibles a factores como el pH, temperatura, luz, oxígeno y humedad (Viloria & cols., 2002; Herbach & cols., 2006).

Algunos autores han propuesto tratamientos enzimáticos, deshidrataciones controladas y otros métodos para estabilizarlas (Viloria & cols., 2002). La técnica de encapsulamiento usando aditivos y secado por aspersión es una practica común para la estabilización de colorantes naturales. Este proceso permite encapsular compuestos sensibles en un material de recubrimiento o “pared”, que actúa como escudo protector, para aislarlos del entorno y minimizar la oxidación (Lay Tze & cols., 2012; Azeredo & cols., 2007). Una fuente promisoría de betalaínas son los frutos de la familia *Cactaceae*, a esta familia pertenece la cactácea columnar (*Stenocereus pruinosus*) nativa del sur de México cuyo frutos reciben el nombre genérico de **pitaya de mayo**. (Annop & cols., 2011; Luna & cols., 2001; Bonilla & cols., 2010)

1.1 Planteamiento del problema.

A un cuando la pitaya de la cactácea columnar (*Stenocereus pruinosus*) es conocida, es poco aprovechada por su vida de anaquel corta. Como colorante no esta disponible comercialmente y en su estado fresco es poco estable. Por otra parte no hay estudios disponibles sobre su caracterización física y química.

1.2 Justificación

Ante el riesgo para la salud que representan los colorantes sintéticos, la búsqueda de colorantes naturales es una prioridad. Si embargo es necesario caracterizar estos colorantes, mejorar su estabilidad y evaluar su comportamiento químico ante posibles aplicaciones como colorante. Adicionalmente se pueden aprovechar las propiedades nutraceuticas que ya han sido identificadas en frutos de la familia *Cactaceae*.

Un impacto secundario en las comunidades productoras de pitaya generará beneficios económicos, si se obtiene un colorante natural con aplicaciones industriales.

1.3 Antecedentes.

El estudio de betalaínas en cactáceas se ha enfocado principalmente para las especies (*Opuntia ficus-indica*) e (*Hylocereus polyrhizus*), desarrollando trabajos de identificación, cuantificación y estabilidad de los pigmentos a la luz y temperatura (Moreno & cols., 2007).

El método analítico de espectroscopia líquida de alta resolución (HPLC) es el principal método desarrollado para la identificación de betalaínas en cactáceas, la especie (*Hylocereus polyrhizus*) presenta exclusivamente betacianinas (betanina e isobetanina), mientras que en frutos de la especie (*Opuntia ficus*) se identifican betacianinas y betaxantinas (Stintzing & cols., 2002; Wybraniec & cols., 2001; Fernández & cols., 2001)

La cuantificación de betalainas en cactáceas se ha realizado principalmente por espectroscopia UV-Vis donde se señala que un prolongado calentamiento, reduce la cantidad de betacianinas en muestra de jugo calentadas de la especie *Hylocereus polyrhizus* (Herbach & cols., 2004)

Una alternativa de estabilización de pigmentos es el método de microencapsulación de secado por aspersión, donde se ha encontrado que la encapsulación de pigmentos incrementa fuertemente la estabilidad de los pigmentos y los hace estables al tiempo en ausencia de luz y a diferentes temperaturas (Gandía & cols., 2010)

Por otro lado estudios realizados por Bakar, & cols. (2012) encontraron que la retención de betacianina en polvos de pitaya de la especie *Hylocereus polyrhizus* fue positivamente proporcional a la concentración de maltodextrina y afectado negativamente por la temperatura de entrada, se indica también que una alta concentración de maltodextrina y una baja temperatura de secado disminuye la pérdida de betacianinas durante el secado por aspersión.

Actualmente no existen reportes de estudios de caracterización física y química de las betalainas presentes en la especie *Stenocereus pruinosus*, que nos permitan identificar el potencial de los pigmentos como fuente promisoría de colorantes rojos y amarillo.

1.4 Objetivo General

Caracterizar y cuantificar los pigmentos contenidos en la pulpa y polvos de pitaya obtenidos por un proceso de encapsulación evaluando el efecto térmico.

1.5 Objetivos Específicos

- Encapsular los pigmentos del jugo de pitaya.
- Purificar los pigmentos en pulpas y polvos mediante técnicas cromatográficas.
- Identificar los pigmentos en pulpas y polvos mediante técnicas espectroscópicas (UV-Vis, IR-FT).
- Cuantificar los pigmentos en pulpas y polvos en mediante espectroscopia líquida de alta resolución (HPLC)

1.6 Hipótesis

El método de encapsulación no modifica significativamente la composición cualitativa y cuantitativa de las betalainas presentes en la pitaya de la especie *Stenocereus pruinosus*.

II. MARCO TEORICO

2.1 La cactácea *Stenocereus pruinosus*.

Los frutos de cactus son considerados como fuente rica de betalainas (Annop & cols., 2011). Las cactáceas se encuentran distribuidas en todo el continente americano. Cuentan con una gran variedad de formas, adaptaciones y tipos biológicos de acuerdo al tipo de clima (Bonilla & cols., 2010). México es el más importante centro de concentración de cactáceas, con un alto nivel de endemismo, crecen en regiones áridas y semiáridas del país. En Oaxaca las regiones de la Cañada y Mixteca son las principales regiones productoras de pitaya (Bonilla & cols., 2010). Los principales pigmentos naturales en las cactáceas son las clorofilas, los carotenoides y las betalainas (Acosta & cols., 2000).

La cactácea *Stenocereus pruinosus* (Figura II.1) produce un fruto llamado pitaya de mayo durante los meses de abril y mayo (Figuroa Sumano, y otros, 2010). Su consumo es tradicional, considerada exótica y catalogada como especie casi endémica (Bonilla & cols., 2010). La pitayas del genero *Stenocereus*, son consideradas las de mayor valor comercial (Figuroa & cols., 2010).



Figura II.1 Cactácea *Stenocereus pruinosus*.

Morfológicamente la pitaya de mayo (Figura II.2) tiene una forma ovoide, con diámetro ecuatorial (transversal) de entre 5 y 12cm, con un peso entre 150 y 500g, espinas radiales de 1 a 2cm, su cascara es lisa de color verde o rojo. La pulpa del fruto de sabor dulce puede ser de color rojo, amarillo, blanco o violeta, los compuestos responsables que dan color al fruto son las betalainas (Figuroa & cols., 2010).



Figura II.2. Pitaya de Mayo.

2.2 Betalainas una clase particular de pigmentos.

Las betalainas son un grupo de pigmentos vegetales que contienen nitrógeno y son solubles en agua. Se acumulan en flores y frutos de plantas del orden de las *Caryophyllales* que incluye familias como las Cactáceas o las Nictagináceas (Garcia, y otros, 2011). Se dividen en dos grupos estructurales: el rojo-violeta (betacianinas) y el amarillo-naranja (betaxantinas).

La mayoría de las betalainas naturales deben su nombre a la planta en donde se han encontrado, al cual se ha añadido el sufijo «-cianina» (de *kyanos*, «azul» en griego) para las betacianinas, o «-xantina» (de *xanthos*, «amarillo» en griego) para las betaxantinas (Garcia & cols., 2011). La planta principal que contiene estos pigmentos corresponde a la raíz de la remolacha roja (*Beta Vulgaris*), que es particularmente rica en betanina (betanidin.5-*O*- β -glucosido) (Azeredo, 2006).

Las betalainas que contienen la remolacha roja (*Beta Vulgaris*) se utilizan a modo de colorantes en la industria alimentaria y corresponden a los aditivos denominados E-162. Se muestran estables a temperaturas inferiores a 25 °C y en condiciones de pH entre 3,0 y 7,0. La presencia de oxígeno y luz, desestabilizan la estructura.

2.3 Estructura de las betalainas

El ácido betalámico (Figura II.3) es el cromóforo común en todas la betalainas (Azeredo, 2006; Moreno & cols., 2007; Stintzing & cols., 2007).

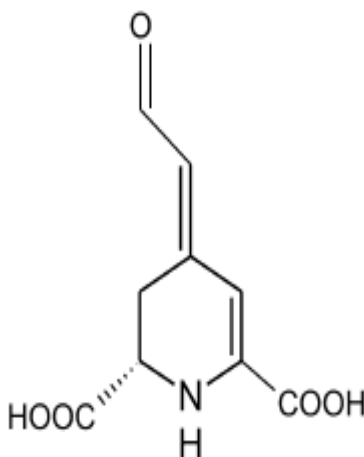


Figura II.3. Acido Betalamico (Azeredo, 2006).

Las betacianinas son los conjugados del ácido betalámico con el ciclo 3-4 Dihidroxifenilalanina (Ciclo Dopa) (Figura II.4) (Moreno & cols., 2007; Azeredo, 2006). El color violeta de las betacianinas se debe a la estructura aromática que induce un fuerte desplazamiento de 60nm en la absorción máxima (λ_{max} 534-554 nm). Las estructuras de las betacianinas y betaxantinas pueden variar en numerosos pasos por reacciones de conjugación como glicosilación o acilación (Laurent, 2004; Azeredo, 2006).

En las betaxantinas el color amarillo (λ_{max} 424nm) se debe al sistema de resonancia inducido por la presencia de tres dobles enlaces conjugados (Figura II.5). Las betaxantinas se forman por la condensación de un aminoácido o una amina con el grupo aldehído del ácido betalámico, dando como resultado una base de Schiff. Esta estructura da un fuerte color amarillo o amarillo-naranja con un máximo de absorbancia de 470-486nm (Laurent, 2004).

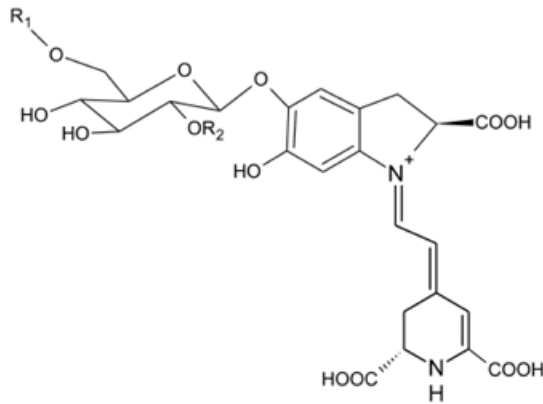


Figura II.4 Betacianina
Betanina= $R_1=R_2=H$ (Azeredo, 2006)

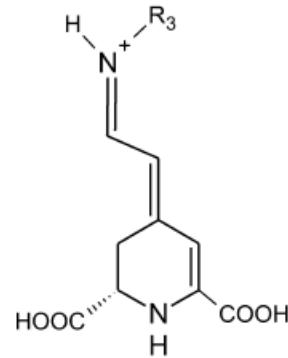


Figura II.5 Betaxantina
(R_3 =Grupo amino o aminoácido) (Azeredo, 2006)

2.3.1 Las Betacianinas

Las betacianinas, son glicósidos o acilglicósidos de los aglicones betanidina o isobetanidina (resultantes de la unión del ácido betalámico a un residuo de ciclo-DOPA) (García & cols., 2011). Ambas moléculas difieren solo en la configuración de su carbono quiral central C_{15} (Figura II.6) (Laurent, 2004).

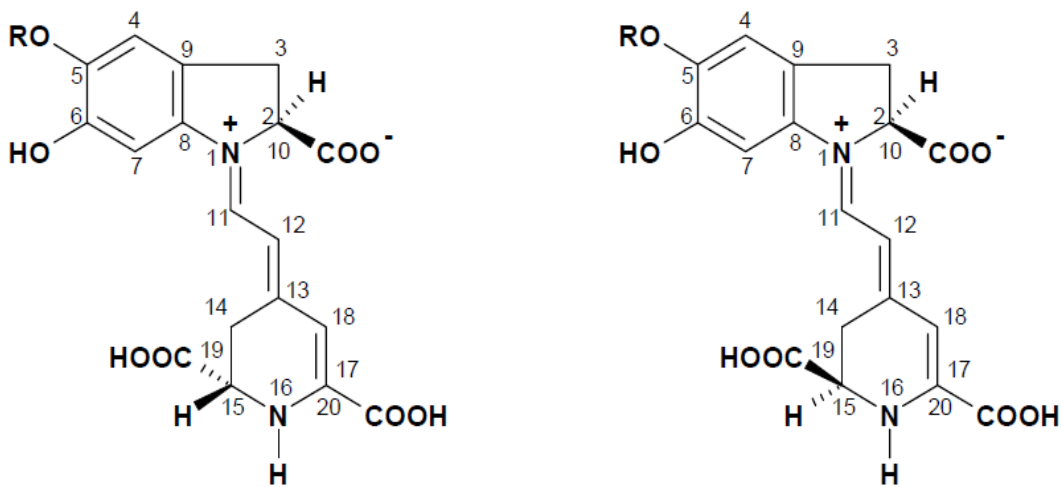


Figura II.6. Betacianinas no glicosidadas ($R=H$) (Laurent, 2004).

Varias betacianinas se derivan de estos dos compuestos por *O*-glicosilación sobre uno de los dos grupos hidroxilo del Ciclo-DOPA. La glicosilación en posición 5 es la más frecuente, produciéndose la betanina, el pigmento rojo principal de la remolacha roja (Figura II.7). Se han identificado en 6-*O*-glucosidos pigmentos poco comunes como la gomfrenina (Figura II.8) (Azeredo, 2006; Laurent, 2004).

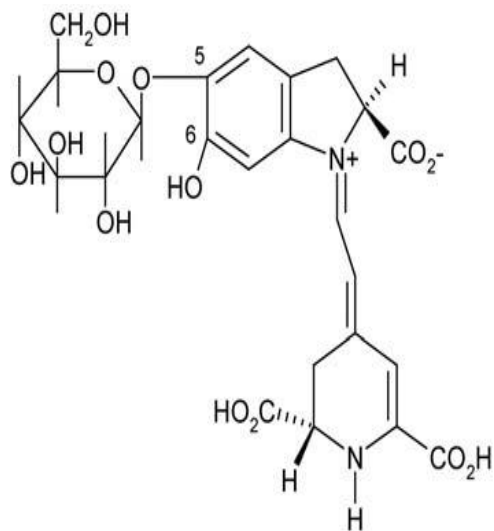


Figura II.7. Betanidina 5-*O*-glucosido (Betanina) (Laurent, 2004)

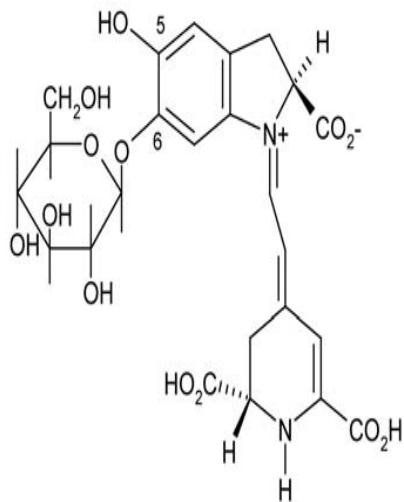


Figura II.8. Betanidina 6-*O*-glucosido (Gomfrenina I) (Laurent, 2004)

2.3.2. Las Betaxantinas

Las betaxantinas son productos de la condensación del ácido betalámico con aminoácidos o aminas. Dependiendo de la estructura particular del compuesto amino, el máximo de absorción de las betaxantinas varía entre 460 y 480nm (Herbach & cols., 2006). Las estructuras de betaxantina más representativas corresponden a la glutamina-betaxantina (Vulgaxantina I) (Figura II.9) de la remolacha roja (*Beta vulgaris L.*) y a la indicaxantina (prolina-betaxantina) (Figura II.10), que es el pigmento amarillo predominante de la tuna del cactus *Opuntia* (*Opuntia ssp.*) (Herbach & cols., 2006; Laurent, 2004).

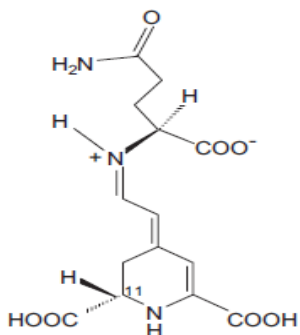


Figura II.9. Glutamina-betaxantina (Vulgaxantina I) (Stintzing & cols., 2007)

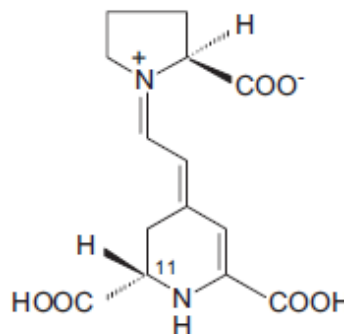


Figura II.10. Prolina-betaxantina (Indicaxantina I) (Stintzing & cols., 2007)

2.4 Estabilidad

La estabilidad de las betalainas es afectada por numerosos factores externos. La a_w y el pH tienen un impacto considerable sobre la estabilidad de los pigmentos. Para asegurar un pigmento óptimo durante la manufactura, se deben tener cuidadosamente controladas condiciones de tiempo y temperatura, y durante el almacenamiento es necesario considerar factores externos como temperatura, luz y exposición a oxígeno.

2.4.1 pH

Las betalainas exhiben un amplio rango de estabilidad al pH de 3 a 7, pero al modificarse induce su degradación. En las betaxantinas las condiciones alcalinas producen la hidrólisis del enlace aldimina, además de la generación del ácido protocatequico donde es imposible la regeneración de la betaxantina. La acidificación induce la recondensación del ácido betalámico en el compuesto amino. En las betacianinas la acidificación induce la recondensación del ciclodopa 5-0- β -glucosido. Los mecanismos de degradación de betalainas en medios ácidos no están bien definidos, valores bajos de pH produce la isomerización del C_{15} de la betanina y betanidina.

Se ha reportado un pH óptimo para betanina entre 4 y 6, pero con la elevación de la temperatura el pH se desplaza a 6. En presencia de oxígeno la betanina es estable entre 5.5 y 5.8, mientras que en condiciones anaerobias los valores de pH bajan de 4.0 a 5.0. Las betaxantinas presentan estabilidad a un pH de 5.5.

2.4.2 Actividad de Agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) es otro factor crucial de susceptibilidad para las betalaínas, el agua da lugar a reacciones hidrolíticas. Esta reacción es dependiente de la disponibilidad de agua, por lo que un decremento en la actividad de agua corresponde a una menor degradación de betanina. Se estima que al disminuir el agua, se reduce la movilidad de los reactantes y la solubilidad del oxígeno molecular (Sánchez, 2006).

2.4.3 Atmosfera

La betanidina y betanina se reportan inestables en presencia de oxígeno, la estabilidad de la betanina disminuye linealmente conforme aumenta la concentración de oxígeno. El hidrógeno y peróxido de hidrógeno causan también degradación a la betanina. La estabilidad de la betanina ha demostrado mejorarse con atmósferas de nitrógeno (Herbach & cols., 2006).

2.4.4 Luz

La iluminación también ha sido reportada como causa de deterioro para la estabilidad de las betalainas. Fue probada su susceptibilidad sometiéndolas a la absorción de luz en el rango UV-Vis para producir la excitación de los electrones π del cromóforo de las betalaínas hacia un estado más energético (π^*), causando alta reactividad o baja energía de activación de la molécula. Se ha reportado también que la degradación de las betalaínas es dependiente del oxígeno porque los efectos de la exposición de la luz es insignificante en condiciones anaerobias (Herbach & cols., 2006; Azeredo, 2006).

2.4.5 Temperatura

La temperatura es el factor más importante de estabilidad de betalaínas durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos. Diversas reacciones como isomerización, descarboxilación o escisión pueden llevarse a cabo por el tratamiento térmico de la betanina, originando la pérdida del color. Fue observado que la degradación térmica de soluciones de betanina de remolacha roja y jugos de pitaya seguían cinéticas de reacción de primer orden (Herbach & cols., 2006; Azeredo, 2006).

2.4.6 Cationes Metálicos y enzimas

La presencia de cationes metálicos (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Cu^{2+}) aceleran la degradación de la betanina que se observa en una inmediata pérdida de color. La formación de complejos de betanina con iones Cu^+ , Cu^{2+} y Hg^{2+} originan desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos.

Agentes quelantes como ácido cítrico y EDTA estabilizan a la betanina contra la degradación catalizada por metales ya que la cantidad de oxígeno se reduce. Las betalaínas presentan también susceptibilidad a la presencia de enzimas. Particularmente las betacianinas son más propensas a la degradación por peroxidasas que las betaxantinas y mas susceptibles a oxidación química por peróxido de hidrogeno (Herbach & cols., 2006; Azeredo, 2006).

2.5 Reacciones químicas de degradación.

Los cambios cromáticos en soluciones de betalaínas pueden ser resultado de varias reacciones de transformación o degradación (Herbach & cols., 2006). Por ejemplo la exposición térmica produce la isomerización y descarboxilación del C₁₅ de la betanina produciendo el estereoisomero isobetanina y descarboxibetanina, afectando totalmente la apariencia de la solución.

La relación de mayor isomerización en la parte del ácido betalámico está asociada con la exposición prolongada al calor y al almacenamiento. La deshidrogenación y descarboxilación son marcadores profundos por la exposición prolongada al calor. Mientras que la desglucosilación es un indicador por la inactivación por calor insuficiente de β-glucosidasa (Stintzing & cols., 2007).

La deshidrogenación del C₁₄ y C₁₅ fue demostrado ambiguamente para soluciones de betacianinas de remolacha roja y pitaya purpura originándose posibles neocompuestos, con un cambio de color amarillento de las soluciones. La descarboxilación del C₁₇ y C₂ modifica también la apariencia y estabilidad del pigmento (Stintzing & cols., 2007).

En la figura II.11 se presenta los posibles sitios de descarboxilación, deshidrogenación y desglucosilación en betacianinas.

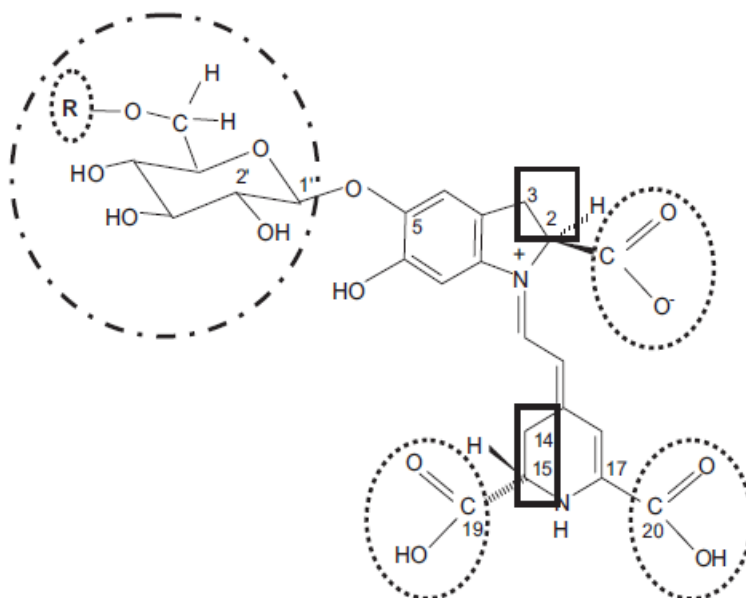


Figura II.11. Posibles sitios de descarboxilación (ovalo-línea punteada), deshidrogenación (cuadrado-línea solida) y desglucosilación (circulo-línea y punto) en betacianinas (Stintzing & cols., 2007).

2.5.1 Isomerización.

La racemización, es una reacción de isomerización en el que un átomo de hidrogeno intercambia su posición estereoquímica solo en el centro quiral de la molécula para invertirlo (Voet & cols., 2006). El centro quiral C₁₅ del ácido betalámico, es el responsable de la formación de los dos epimeros, isobetanina y betanina (Mandujano, 2006). En la indicaxantina el ácido betalámico exhibe una fuerte epimerización en el (C₁₁). La isomerización puede ser inducida por ácidos o por condiciones alcalinas (Herbach & cols., 2006).

2.5.2 Desglicosilación.

Bajo condiciones fuertemente ácidas, altas temperaturas y en la presencia de β-glucosidasa, la mitad de la glucosa de la betanina puede romperse resultando en un desplazamiento batocrómico de cerca de 4nm. De ahí esta reacción puede ser intencionalmente usada para obtener coloraciones rojo-violetas del betabel. Sin embargo la menor estabilidad de la aglicona comparada con la correspondiente glucosidasa incrementa su susceptibilidad hacia la oxidación (Herbach & cols., 2006).

2.5.3 Hidrólisis

El rompimiento hidrolítico del enlace aldimina en las betalaínas ha sido reportado en valores superiores de pH 6 durante tratamiento térmico. La hidrólisis del enlace aldimina en las betacianinas fue encontrado en soluciones purificadas de betabel y jugo de pitaya púrpura, que fueron sometidas a tratamiento térmico pronunciado. La acilación con ácidos aromáticos o alifáticos pueden proteger al enlace aldimina del rompimiento. Una peculiaridad del rompimiento del enlace aldimina es su reversibilidad (Herbach & cols., 2006), el mecanismo de regeneración planteado señala que se requiere de una condensación de una base de Schiff del grupo aldehído del ácido betalámico y del amino nucleofílico del Ciclo-Dopa Glucosido.

2.5.4 Descarboxilación

Teóricamente, la descarboxilación ocurre en el C₂, C₁₅ y C₁₇ en betacianinas y en los carbonos C₁₁ y C₁₃ para betaxantinas. La escisión de los grupos carboxílicos en labetanidina, betanina e indicaxantina se ha reportado en soluciones acuosas calentadas que originan menores máximos de absorción respecto a las betalainas originales. Este desplazamiento hipsocrómico puede explicarse por una reducción de electrones π deslocalizados en los compuestos descarboxilados. Estudios recientes en remolacha roja y pitaya púrpura ha revelado que la descarboxilación ocurre en el C₂, C₁₅ y C₁₇ aunque los grupos carboxilo difieren en susceptibilidad hacia la descarboxilación. El sitio inicial de descarboxilación varía dependiendo del solvente. Medios etanólicos promueven la descarboxilación del C₁₇ de la betacianina (Herbach & cols., 2006).

2.5.5 Deshidrogenación

La deshidrogenación de la betanina y betanidina del jugo de pitaya se lleva bajo condiciones aerobias formándose la neobetanina (Herbach & cols., 2006). La neobetanina, que es 14,15-dehidrobetanina, constituye un grupo genuino de la remolacha roja, agrupado estructuralmente con las betacianinas, la neobetanina esta caracterizada por un color amarillo (λ_{\max} cerca de 470nm). Se ha encontrado que la formación de la neobetanina de la betanina y betanidina se debe a la oxidación con aire cuando la base conjugada del sistema fue desprotonado (Herbach & cols., 2006).

2.6 Secado por aspersión.

El secado por aspersión se define como la transformación de un líquido en un material sólido, esto ocurre cuando se pone en contacto dicha alimentación en forma de gotas finas en una corriente de aire caliente. El tiempo de contacto es muy corto y en consecuencia el daño debido a la temperatura también es mínimo (Masters, 1985).

Es utilizado en la industria alimenticia por ser un método económico y efectivo en la protección de materiales. Los almidones modificados, las maltodextrinas y las gomas son empleadas como acarreadores o materiales pared. El material a encapsular es homogenizado con el material pared; la mezcla es alimentada al secador por aspersión y se atomiza por medio de una boquilla o disco; las microcapsulas se colectan posteriormente (Yañez & cols., 2005).

Las ventajas que el método de secado por aspersión presenta son:

- Aumento del tiempo de vida útil del producto.
- Facilidad de manejo
- Reducción del espacio de almacenamiento.
- Reducción de costos de almacenamiento.

El secado por aspersión involucra cuatro etapas (Figura II.12):

- a) Atomización
- b) Contacto aire-gota
- c) Evaporación
- d) Recuperación del producto.

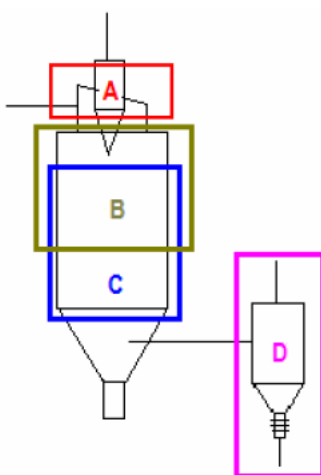


Figura II.12.- Etapas del secado por aspersión A) Atomización, B) Contacto aire-gota, C) Evaporación, D) Recuperación del producto.

2.7 Técnicas de Análisis.

2.7.1 Cromatografía en Capa Delgada

La cromatografía en capa delgada (TLC), es una técnica de separación que permite diferenciar a los componentes de una mezcla debido a la interacción entre los analitos y una fase estacionaria activa.

La fase móvil es un solvente que se desplaza en forma ascendente, llevando consigo a los compuestos de la mezcla, promoviendo un contacto eficiente con la fase estacionaria activa y realizándose un desplazamiento a diferentes velocidades. Los compuestos pueden ser identificados con algún revelador cromatográfico (luz UV, yodo o cloruro férrico) y caracterizados por su relación de frente (Rf).

2.7.2 Espectrometría UV-VIS

La espectroscopia UV-Vis es una técnica de identificación y determinación de especies orgánicas e inorgánicas, que se basa en la absorción de radiación ultravioleta o visible por una especie atómica o molecular.

Cuando la longitud de onda corresponde al nivel de energía requerido para excitar un electrón a un nivel más elevado, la energía es absorbida. Esta absorción se detecta y se expresa en forma gráfica donde se observa la longitud de onda en comparación con la absorbancia (A) definida como:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

De donde I_0 es la intensidad de la luz incidente e I es la intensidad de la luz transmitida a través de la muestra. La cantidad exacta de luz UV absorbida expresa la absorptividad molar de la muestra (ϵ) que se define por la ecuación:

$$\varepsilon = \frac{A}{Cl}$$

Donde A= Absorbancia

C= Concentración en mol/l

l= Longitud de la trayectoria de la muestra en cm

Comúnmente los espectros UV presentan solo un pico, el pico es ancho y su posición se identifica anotando la longitud de onda, en la parte más ancha del pico (λ "lambda max")

El intervalo de interés en la región ultravioleta del espectro electromagnético va de 2×10^{-7} m a 4×10^{-7} m. Las absorciones en esta región suele medirse en nanómetros (nm), donde $1 \text{ nm} = 10^{-9}$ m. La región visible del espectro electromagnética es adyacente a la región ultravioleta y se extiende aproximadamente de 400 a 800 nm.

2.7.3 Espectrometría Infrarrojo (IR-FT)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (IR-FT) es una técnica de identificación de grupos funcionales, la absorción de radiación hace que grupos de átomos vibren respecto a los enlaces que los conectan, estas transiciones vibracionales corresponden a distintas energías, debido a que las moléculas absorben radiación infrarroja específicamente a ciertas longitudes de onda y frecuencia (Wade, 2004).

La frecuencia de la radiación absorbida corresponde con la frecuencia de la vibración molecular. La absorción de radiación infrarroja se limita a especies moleculares que existen en pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales.

Se diferencian dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión, la de tensión supone un cambio en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, las de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces y son de cuatro tipos: tijeras, balanceo, aleteo y torsión (Skoog, 2001).

Las longitudes de onda en el infrarrojo se expresan en micrómetros o micras ($1 \mu\text{m} = 10^{-6}$ m) y las frecuencias, en números de onda ($\tilde{\nu}$). El número de onda se da en cm^{-1} , la región infrarroja más utilizada va de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} (McMurry, 2001).

2.7.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica de separación, de alta sensibilidad, fácil adaptación e idónea para la separación de especies volátiles o termolábiles. Tiene una elevada eficiencia a causa del manejo de elevadas presiones donde la fase móvil es un líquido. En la técnica de HPLC una muestra líquida o sólida en solución se hacen pasar por una columna cromatográfica junto con una fase móvil líquida. La discriminación de los componentes se realiza a través de la interacción entre el soluto, solvente y fase estacionaria.

El equipo de HPLC consta de una columna analítica en la que se lleva a cabo la separación, están empaquetadas con partículas de sílice porosa de forma irregular o esférica.

La fase estacionaria en cromatografía líquido-líquido es una película líquida que recubre el material empaquetado. Cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil es no polar recibe el nombre de cromatografía de fase normal. Por el contrario, en la cromatografía de fase reversa, que es la forma más habitual de HPLC, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar.

El orden de elusión de los solutos en HPLC depende de la polaridad, los tiempos de retención se controlan seleccionando la fase móvil. Se han desarrollado varios detectores para las separaciones cromatográficas en HPLC los más comunes corresponden a los detectores espectroscópicos y electroquímicos. Los primeros se basan en medidas espectroscópicas como UV/vis y fluorescencia. El segundo tipo emplea medidas electroquímicas como amperometría, voltamperometría y conductividad (Skoog, 2001).

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Pulpa de pitaya

La **pitaya de mayo** fruto de la cactácea columnar (*Stenocereus pruinosus*), fue adquirida en la central de abastos de la Ciudad de Oaxaca, en estado de madurez comercial, un producto proveniente de la ciudad de Puebla (Pu) y en un mercado de la comunidad de Tianguistengo Oaxaca (TI). Se almacenaron a -20°C para evitar su deterioro postcosecha. Las pitayas descongeladas fueron cortadas y clasificadas de acuerdo al color, despulpadas y estrujadas manualmente para extraer el jugo.

3.1.1 Preparación de extractos.

350g de pulpa de pitaya (amarilla, naranja, roja, guinda) fueron mezclados con 600ml de una mezcla de solventes EtOH:H₂O (70:30) (HCl \approx 1 M), se colocó en un baño de ultrasonidos durante 1.5h y se filtró con algodón y lana de vidrio. Se obtuvieron seis Extractos Orgánicos Totales (**EOT**) (Tabla III.1), que fueron almacenados a -4°C para su posterior análisis.

Tabla III.1 Extractos Orgánicos Totales (EOT).

Origen	Color	EOT
Puebla (Pu)	Naranja	F.O.A-1
	Guinda	F.O.B-1
Tianguistengo, Oaxaca (TI)	Amarillo	F.O.C-1
	Naranja	F.O.E-1
	Rojo	F.O.D-1
	Guinda	F.O.F-1

3.1.2 Separación.

Se añadió a 1mL de EOT, 2mL de 1-pentanol (Aldrich Chemical), se dejó en reposo durante 24 horas, después del cual se formó un precipitado de color (F.O.A-2, F.O.B-2, F.O.C-2, F.O.D-2, F.O.E-2, F.O.F-2) y un sobrenadante que fue recuperado, evaporado a seco y resuspendido en H₂O destilada (\approx 2 mL). La prospección de los precipitados de color se realizó por TLC [Silicagel 60 FG 254, Merck, Fase Movil: Etanol: Agua: Acido Acetico (8:11:1)] (Figura III.1).

3.1.3 Purificación

Siguiendo la metodología propuesta por Stintzing (2001), se activó una columna abierta C₁₈ (spe Octadecyl, Bakerbond; J.T Baker). El material adsorbente de la columna fue activado con dos volúmenes de MeOH Anhidro (J.T Baker) y lavado con dos volúmenes de agua acidificada pH:3 (TFA Merck, HCl Fermont).

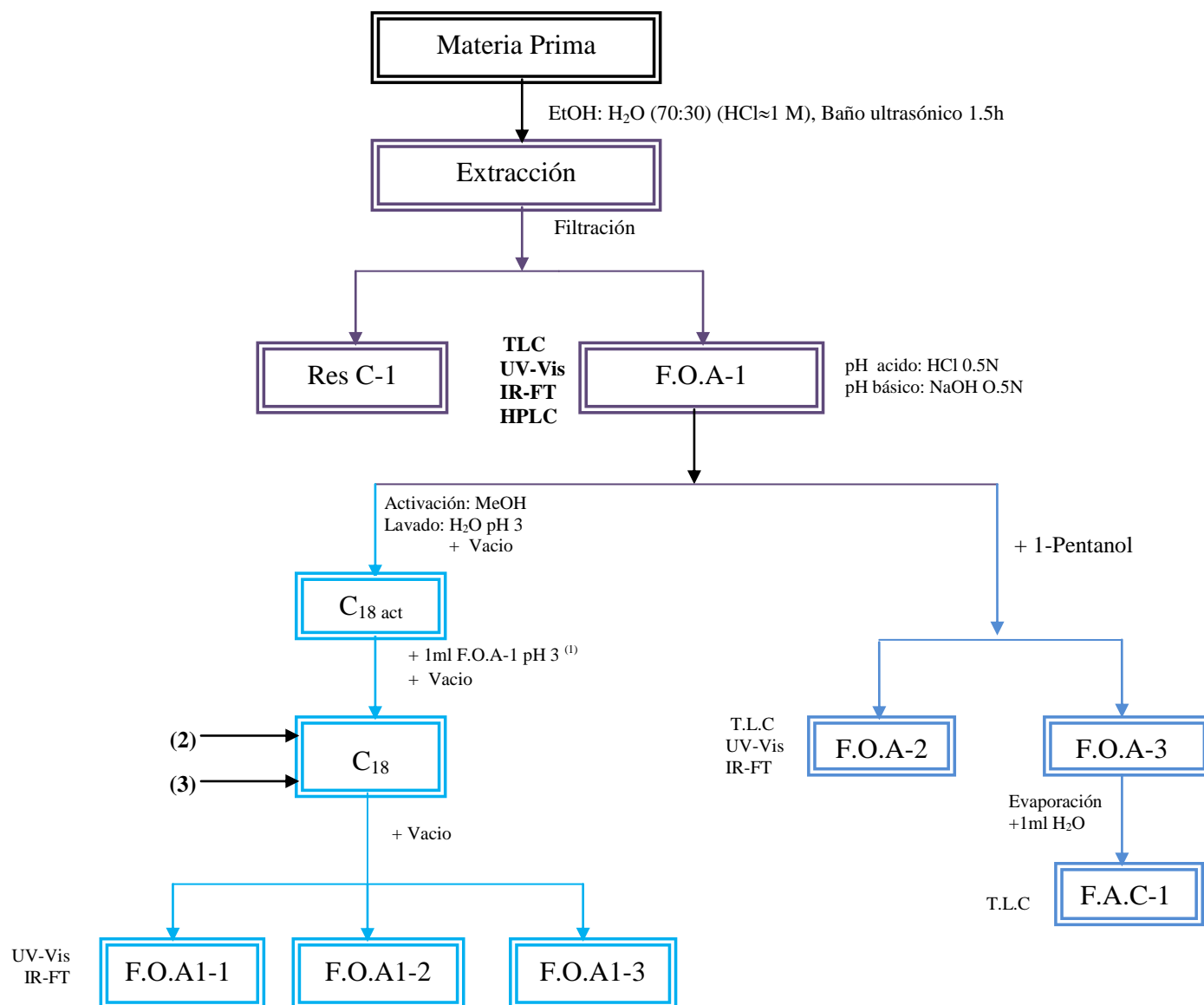
Los EOT fueron ajustados a pH 3 con HCl 0.1 N y aplicado sobre el material adsorbente de la columna C₁₈. Para eluir los colorantes no ionicos se utilizaron dos volúmenes de agua acidificada pH 3, seguido de dos volúmenes de MeOH acidificado (95/5MeOH/H₂O pH: 2, v/v para la elución de betacianinas. Las fracciones se almacenaron a -4 °C para su posterior análisis (Tabla III.2).

Tabla III.2 Fracciones purificadas por columna C₁₈.

No Elución	1	2	3
Extracto Orgánico Total	Vacio	H ₂ O pH 3 (TFA, HCl)	95/5MeOH/H ₂ O pH: 2, v/v
F.O.A-1	FOA1-1	FOA1-2	FOA1-3
F.O.B-1	FOB1-1	FOB1-2	FOB1-3
F.O.C-1	FOC1-1	FOC1-2	FOC1-3
F.O.D-1	FOD1-1	FOD1-2	FOD1-3
F.O.E-1	FOE1-1	FOE1-2	FOE1-3
F.O.F-1	FOF1-1	FOF1-2	FOF1-3

3.1.4 Evaluación de la influencia del pH

2mL de E.O.T (F.O.A-1, F.O.B-1, F.O.C-1, F.O.D-1, F.O.E-1, F.O.F-1) fueron descongelados y puestos en condiciones de pH acido usando una solución acuosa de ácido clorhídrico 0.5 N y básico con Hidróxido de Sodio 0.5 N. La modificación del pH da lugar a la formación de estructuras ionizadas de los colorantes, promoviendo su recuperación por medio de solventes prótico-polares. Estas muestras fueron almacenadas para su posterior análisis (Figura III.1).



- (2) H₂O acidificada pH 3
 (3) Metanol Acidificado/H₂O acidificado pH 2

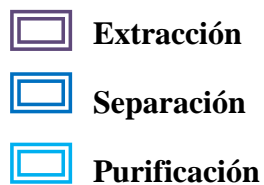


Figura III.1. Esquema de análisis de pulpa de pitaya.

3.2 Polvos de pitaya.

3.2.1 Pitaya de Puebla

Para obtener los polvos de pitaya, la pulpa de pitaya guinda fue estrujada manualmente se hizo pasar por un colador de plástico para retirar fibras y semillas y posteriormente se filtró por tamiz de malla No 100 para obtener el jugo. Se prepararon diluciones de jugo y agua en proporciones de 1:1 y 1:2 con mezclas de aditivos maltodextrina/pectina (Cytecsa, Mexico) que fueron encapsulados con las condiciones que se describen en la tabla III.3.

Tabla III.3 Condiciones de encapsulación del jugo guinda (Pu)

Tratamiento	Te (°C)	Fa (L/h)	% Aditivo (Maltodextrina/Pectina)
P1	180	1.5	40/10
P2	180	1.5	40/10
P3	160	1.5	50/24
P4	160	1.5	50/24
P5	160	1.5	60/24
P6	160	1.5	60/24
P7	160	1.5	25/20
P8	160	1.5	25/20

3.2.2 Pitaya de Tianguistengo, Oaxaca

La pulpa de pitaya de cuatro variedades de color (amarillo, roja, naranja y guinda) estrujada manualmente de Tianguistengo, Oaxaca (TI) se hizo pasar por un colador de plástico para retirar fibras y semillas y posteriormente se filtró por tamiz de malla No 60 para obtener los jugos.

Para obtener los polvos se realizaron mezclas de jugo con aditivos maltodextrina DE13 y pectina (Cytecsa, Mexico), la proporción de aditivos agregados fue calculado con base a los sólidos totales presentes en el jugo. Las condiciones de encapsulación se presentan en la Tabla III.4, Figura III.3.

Tabla III.4 Condiciones de encapsulación de los jugos guinda y rojo (TI).

Tratamiento	Te (°C)	Fa (L/h)	% Aditivo (maltodextrina/pectina)
P1	150	1.5	40/20
P2	180	1.5	40/20
P3	150	2.0	40/20
P4	180	2.0	40/20
P5	150	1.5	60/30
P6	180	1.5	60/30
P7	150	2.0	60/30
P8	180	2.0	60/30

La mezclas fueron alimentadas a un secador por aspersión escala piloto, en paralelo marca Niro Atomizer (Figura III.2) equipado con atomizador rotatorio (TS-Menor, M02/A).



Figura III.2 Secador por aspersión escala piloto Niro-atomizer.

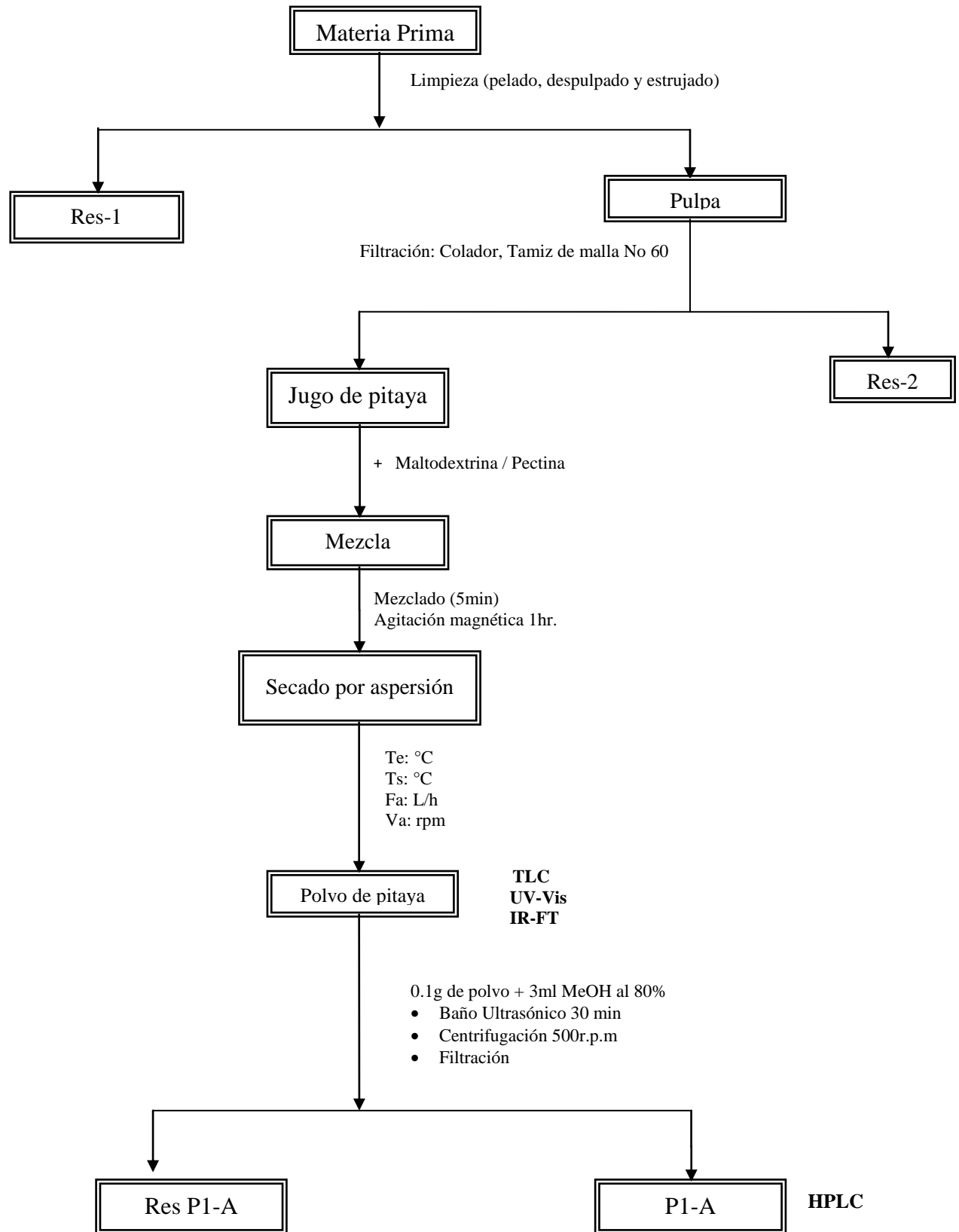


Figura III.3. Esquema de análisis de los polvos de pitaya.

3.3. Técnicas de Análisis.

3.3.1 Cromatografía en Capa Delgada (TLC)

Para discriminar los componentes en los E.O.T y polvos se utilizó la técnica de separación de Cromatografía de Capa Delgada (TLC) empleando como fase estacionaria (Silicagel 60 FG 254, Merck) y como fase móvil Etanol-Agua,-Acido Acético (8:11:1). Dos reveladores fueron usados: luz UV y vapores de yodo.

3.3.2 UV-VIS

El análisis espectrofotométrico de los E.O.T y polvos, se realizó en celdas de cuarzo de 10mm de espesor en un equipo UV-Vis (Perkin-Elmer, Lambda 25; software UV WinLab versión 2.85.04) entre 220-750nm.

3.3.3 IR-FT

El análisis por infrarrojo, de los E.O.T y polvos, fue realizado en un equipo Spectrum GX (Perkin Elmer con láser He-Ne), el cual emite una radiación infrarroja continua. Las lecturas se realizaron de 4000 a 600 cm^{-1} .

3.3.4 HPLC

La cuantificación por HPLC se realizó en tres muestras de EOT [F.O.B.1 (Pu), F.O.D-1 (TI) y F.O.F-1 (TI)] y en todos los polvos de los colores rojo (TI), guinda (TI) y guinda (Pu).

Las muestras para inyectar en el equipo fueron preparadas tomando 1ml de E.O.T, se diluyo con 10ml de mezcla acuétanolica [$(\text{H}_3\text{O}^+(\text{HCl}\approx 1 \text{ M});\text{EtOH} (70:30))$] y se filtro a través de una membrana Millipore de 0.45 μm .

Las muestras de polvos fueron preparadas tomando 0.1g de polvo de pitaya: fueron mezclados con 3ml de MeOH al 80% y colocadas en un baño ultrasónico por 30 min; centrifugación por 20 min a una velocidad de 500 r.p.m. y filtración con membrana Millipore de 0.45 μm .

La curva de calibración se construyó con una serie de soluciones (50, 100, 150, 200 y 250 ppm) de un estándar comercial de betanina (CDS000584-1G, Aldrich Chemistry).

Los análisis de cuantificación fueron realizados en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) Perkin Elmer FLEXAR con detector UV-Vis LC y los datos se analizaron con un software Chromera CDS. 20 μl de muestra fueron inyectados para las pruebas. Las condiciones de operación se describen en la Tabla III.5.

Tabla III.5.- Condiciones de operación de HPLC.

Columna	C ₁₈ Spheri-5 RP-18 5m, 250x4.6mm Perkin Elmer
Solvente A	HCOOH/H ₂ O 2% (v/v)
Solvente B	CH ₃ CN/ H ₂ O (80/20 v/v)
Gradiente	A:B (95:5) 2min; A:B (85:15) 15min; A:B (85:15) 2min
Flujo	0.5ml/min
Volumen de inyección	20 µl
λ _{max}	550nm

La concentración de pigmentos (ppm) en los extractos y polvos fueron obtenidos de la curva de calibración (área vs concentración) con la ecuación 1 que tuvo una R²= 0.905, donde “x” es área y “y” es concentración.

$$y=0.048x + 29.19 \quad (1)$$

Para efectos de comparación de resultados la concentración de pigmentos se expreso en ppm / g pulpa seca empleando la ecuación 1 para los extractos y la ecuación 2 para los polvos.

$$W_{pulpa} \times Y \times FD \times s.s \quad (2)$$

W_{pulpa}= Peso de la pulpa (g)
 Y= Concentración de betanina en pulpa(ppm)
 FD= Factor de dilución
 s.s=Solidos secos de pulpa [0.0108 g]

$$W_{polvo} \times Y \times Ph \times s.s \quad (3)$$

W_{polvo}= Peso del polvo sin aditivo base seca (g)
 Y=Concentración de betanina (ppm)
 Ph=Peso húmedo de la Pulpa (g)
 s.s=Solidos secos de pulpa [0.0108 g]

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Pulpa de pitaya

Las extracción acuoetanólica acidificada [EtOH:H₂O (70:30) HCl≈1 M] de las pulpas húmedas permitió recuperar la totalidad de los pigmentos, confirmándose por la ausencia de color en los residuos.

Se pudo observar que los pigmentos contenidos en estos extractos son estables en el tiempo.

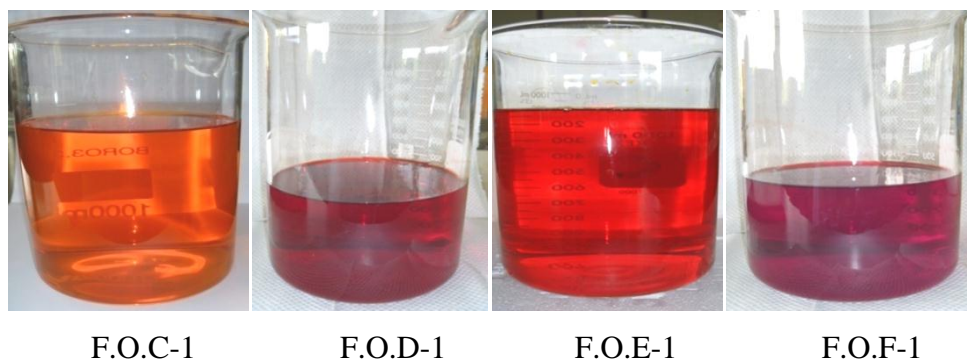


Figura IV.1.- Extractos Orgánicos Totales filtrados.

4.1.1 TLC

Las placas fueron desarrolladas con un eluyente fuertemente polar: (EtOH: H₂O: HCOOH (11:8:1), la separación fue evaluada visualmente y luego revelada con vapores de yodo (Figura IV.2).

A la luz visible se observan dos compuestos de color separados (amarillo y guinda), tanto en los extractos rojos como en los guindas (F.O.B-1, F.O.F-1, F.O.D-1); pero un solo compuesto de color amarillo en los extractos amarillos y naranjas (F.O.A-1, F.O.C-1).

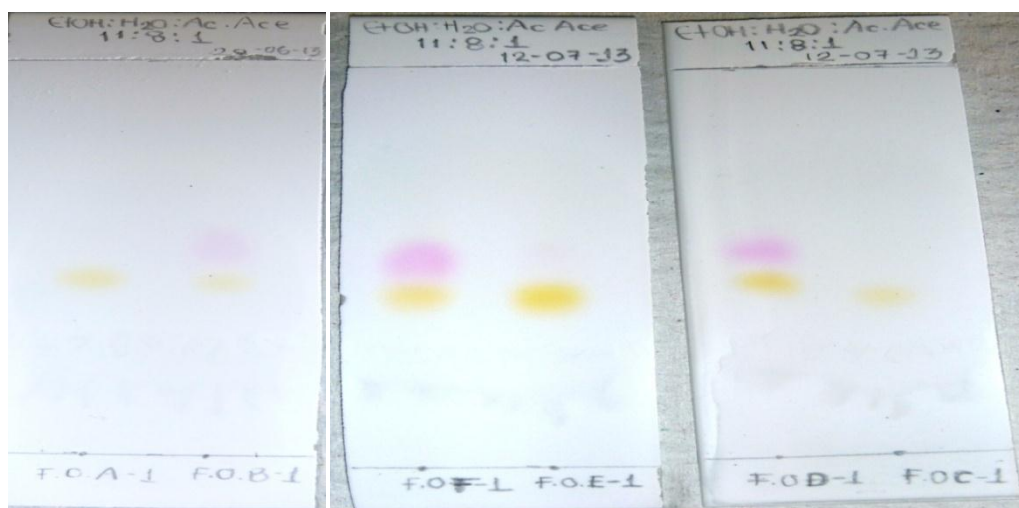


Figura IV.2 Separación de pigmentos en EOT.

Se determinó la relación de frente (Rf) de los compuestos de color separados en los EOT y de los compuestos revelados con iodo. Los compuestos de color rojo presentan una $R_f=0.57\pm 0.01$ mientras que los compuestos de color amarillo presentan una $R_f=0.47\pm 0.02$ indicando una mayor polaridad de los compuestos amarillos respecto a los compuestos de color rojo (Tabla IV.1). El revelado con iodo de las placas de TLC muestra un tercer compuesto en los EOT ($R_f=0.62\pm 0.02$) que no se aprecia en el rango de luz visible, indicando la presencia de otros compuestos en los EOT además de los de color.

Tabla IV.1 Relación de frente (Rf) de los EOT.

Origen	Muestra	Compuestos de Color	Revelador	
			Rf	Rf
PUEBLA (PU)	F.O.A-1	amarillo	0.46	0.43
		otro	-	0.60
	F.O.B-1	amarillo	0.46	0.43
		rojo	0.56	
		otro	-	0.60
TIANGUISTENGO, OAXACA (TI)	F.O.C-1	amarillo	0.45	0.44
		-	-	-
	F.O.D-1	amarillo	0.49	-
		rojo	0.58	-
		otro	-	0.64
	F.O.E-1	amarillo	0.48	-
		rojo	0.58	-
		otro	-	0.62
	F.O.F-1	amarillo	0.48	-
		rojo	0.58	
otro		-	0.62	

La adición de 1-pentanol a los EOT dio lugar a la formación de un precipitado de color (Figura 4.3). Dos compuestos, uno rojo y otro amarillo fueron separados, sin embargo las muestras de Tianguistengo, Oaxaca presentaron una relación de frente ($R_f=0.54\pm 0.02$ y 0.44 ± 0.01) de los precipitados F.O.A-2 y F.O.B-2. Estos resultados demuestran que los compuestos de color corresponden a la misma familia de betalaínas pero difieren en su estructura química (Tabla 4.2).

Los precipitados de color obtenidos de muestras de Tianguistengo, Oaxaca se encontraron también dos compuestos uno rojo y otro amarillo, mientras que en los precipitados (F.O.D-2, F.O.E-2, F.O.F-2) mientras que un solo compuesto de color amarillo fue encontrado en el F.O.C-2.

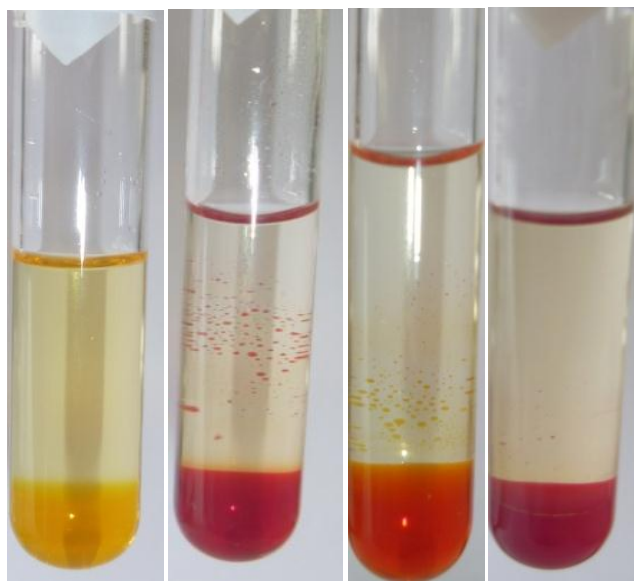


Figura IV.3 Pigmentos de color precipitados con 1-pentanol.

Tabla IV.2 Relación de frente de los pigmentos precipitados con 1-pentanol.

Muestra	Compuestos	Revelador	
		Normal	Yodo
		Rf	Rf
F.O.A-2	amarillo	0.63	0.66
	rojo	0.81	0.81
F.O.B-2	amarillo	0.63	0.66
	rojo	0.81	0.80
F.O.C-2	amarillo	0.47	-
	-	-	-
F.O.D-2	amarillo	0.43	0.43
	rojo	0.56	-
	otro	-	0.62
F.O.E-2	amarillo	0.44	0.40
	rojo	0.54	0.56
F.O.F-2	amarillo	0.45	0.43
	rojo	0.56	0.58

4.1.2 UV-Vis

Los espectros UV-VIS de los extractos orgánicos totales sin tratamiento en medio ácido y básico son mostrados en la Tabla IV.3. Estos resultados son consistentes con lo reportado por otros autores quienes señalan que las betalainas son estables en pH ácido (Herbach & cols., 2006) esto se observa en las bandas de absorción de los espectros UV-Vis obtenidos (Figura IV.4 y IV.5).

Tabla IV.3.- λ_{\max} de EOT de pulpa de pitaya.

λ_{\max}	PUEBLA (PU)						TIANGUISTENGO OAXACA (TI)												
	F.O.A-1	F.O.A-1 ACIDO	F.O.A-1 BASICO	F.O.B-1	F.O.B-1 ACIDO	F.O.B-1 BASICO	FOC-1	FOC-1 ACIDO	FOC-1 BASICO	FOD-1	FOD-1 ACIDO	FOD-1 BASICO	FOE-1	FOE-1 ACIDO	FOE-1 BASICO	FOF-1	FOF-1 ACIDO	FOF-1 BASICO	
λ_1				555	555						555	555	550				555	555	
λ_2	477	477	475	487	487	480	480	480	478	484	484	483	478	478	478	485	485	480	
λ_3																			
λ_4													398		400				
λ_5	268	268	265	265	265	256	265	265	260	265	265	260	260	260	258	265	266	256	

Después de una purificación por una columna C₁₈, se identificaron longitudes de máxima absorbancia características de betacianinas y betaxantinas (Tabla IV.4) (Azeredo, 2006) (Stintzing, 2004). Un segundo máximo de absorción a 330nm, que indica una nueva transición electrónica del cromóforo (ácido betalámico) también fue encontrado.

Tabla IV.4.- λ_{max} (Purificación por Columna C₁₈).

λ_{max}	PUEBLA (PU)						TIANGUISTENGO OAXACA (TI)											
	FOA1-1	FOA1-2	FOA1-3	FOB1-1	FOB1-2	FOB1-3	FOC1-1	FOC1-2	FOC1-3	FOD1-1	FOD1-2	FOD1-3	FOE1-1	FOE1-2	FOE1-3	FOF1-1	FOF1-2	FOF1-3
λ_1				540	536					505	505					500	500	
λ_2				483	481													
λ_3	470	470	475			470												
λ_4			370			370												
λ_5			330			320									328			327
λ_6			280			280												
λ_7	270	268							270			270			270			
λ_8	265	265		260	265		265	265		260	260		260	260		265	263	
λ_9												220						230

Los espectros UV-Vis muestran que las longitudes de onda de máxima absorbancia (λ_{\max}) permanecen constantes con respecto a las muestras sin tratamiento (Tabla IV.3).

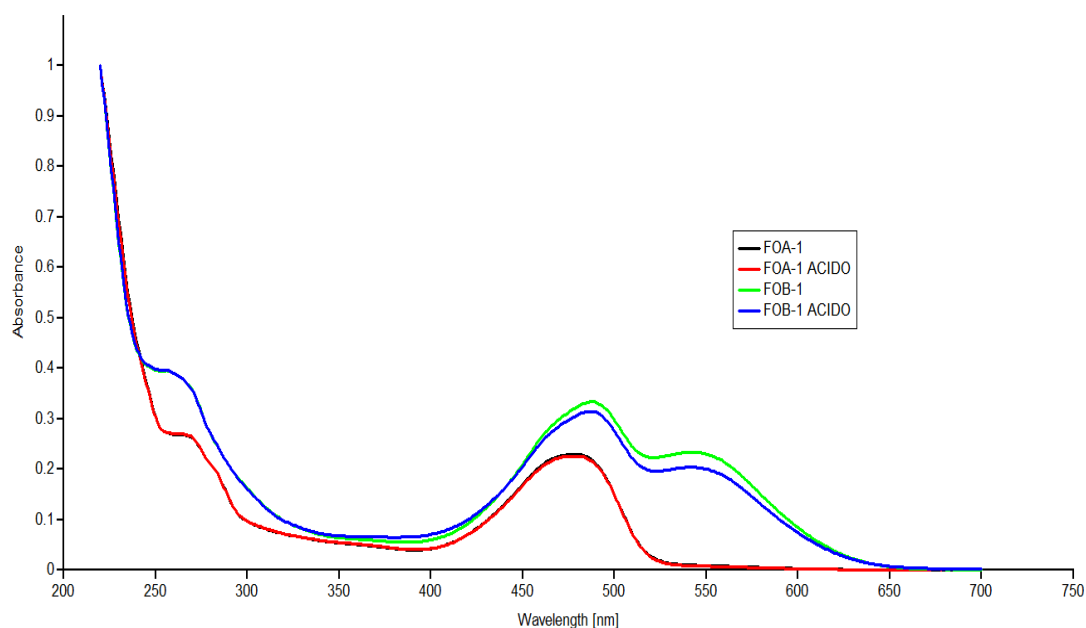


Figura IV.4. Espectro UV-Vis en medio acido de los EOT: F.O.A-1 (naranja) y F.O.B-1(guinda) de Puebla

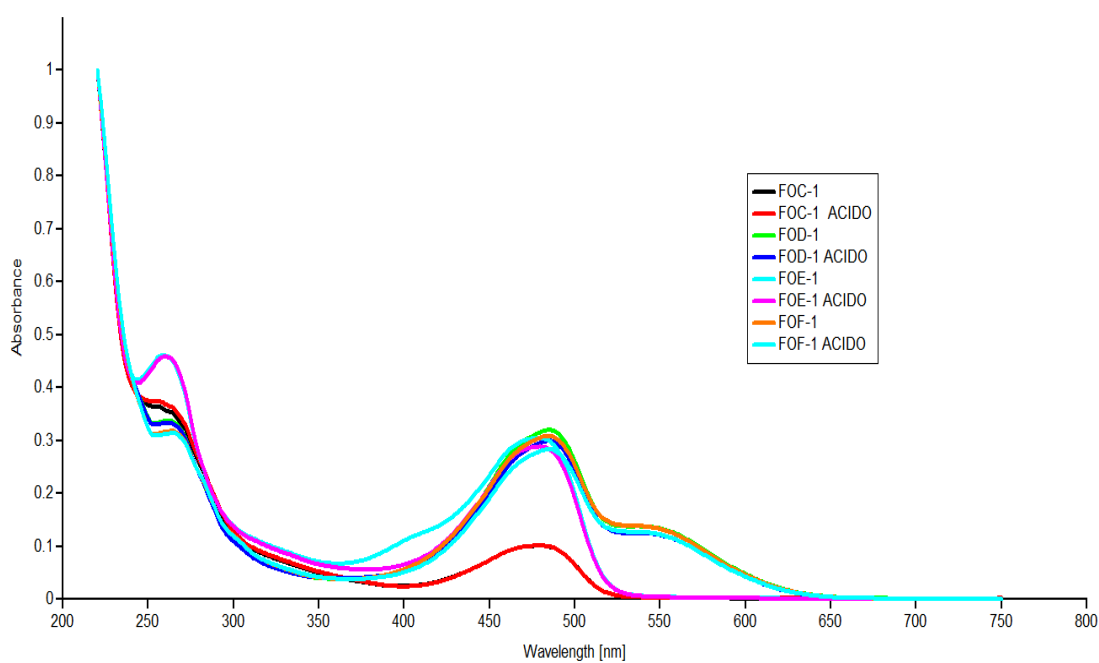


Figura IV.5. Espectro UV-Vis en medio acido de los EOT: F.O.C-1 (amarillo), F.O.D-1(rojo), F.O.E-1(naranja) y F.O.F-1(guinda) de Tlanguistengo, Oaxaca.

Los EOT guindas F.O.B-1 (Pu) y F.O.F-1 (TI) en medio básico presentan un desplazamiento en la λ_{\max} hacia longitudes de onda menor, de mayor energía (comportamiento hipsocrómico), que se debe a la modificación del cromóforo como resultado de la deslocalización electrónica en los centros de la molécula y que da origen a un cambio de color de rojo a amarillo (Figura IV.6). Una reacción de hidrólisis del enlace aldimina puede explicar la desaparición de la longitud máxima (λ_{\max}) de 555nm que es característica de betacinininas (Tabla IV.3). Esta reacción produce la pérdida del ciclo-Dopa 5-O- β glucósido dando origen solo al ácido betalámico (Figura IV.7 y IV.8).



Figura IV.6 Cambio de color en medio básico del EOT: F.O.B-1 (Pu)

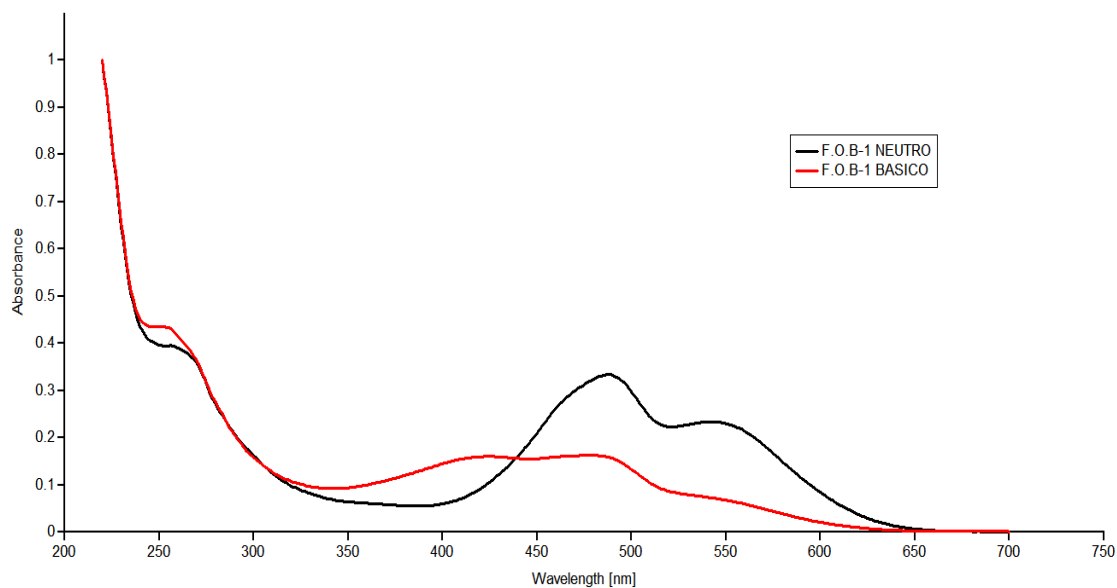


Figura IV.7 Espectros UV-Vis en medio básico del EOT, F.O.B-1 (Pu)

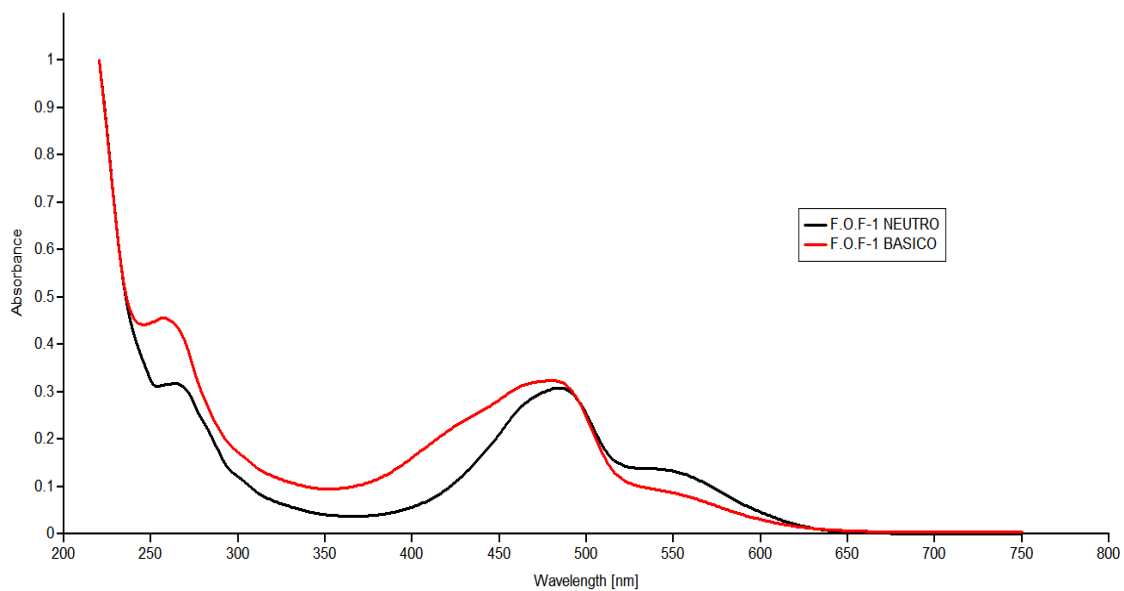


Figura IV.8 Espectros UV-Vis en medio básico del EOT, F.O.F-1 (TI)

Los precipitados obtenidos con tratamiento de 1-pentanol (Tabla IV.5) confirman la presencia de longitudes de máxima absorbancia características de betacianinas y betaxantinas (Azeredo, 2006; V.F, y otros, 2011)

Tabla IV.5.- λ_{max} en los pigmentos precipitados con 1-pentanol.

λ_{max}	Puebla (PU)		Tianguistengo–Oaxaca (TI)			
	F.OA-2	F.O.B-2	FOC-2	FOD-2	FOE-2	FOF-2
λ_1	-	548	-	545	-	545
λ_2	-	485	482	485	485	485
λ_3	-	-	467	465	465	465
λ_3	450	-	-	-	-	-
λ_4	360	-	-	-	-	-
λ_5	-	266	-	260	260	260
λ_6	256	-	-	-	-	-

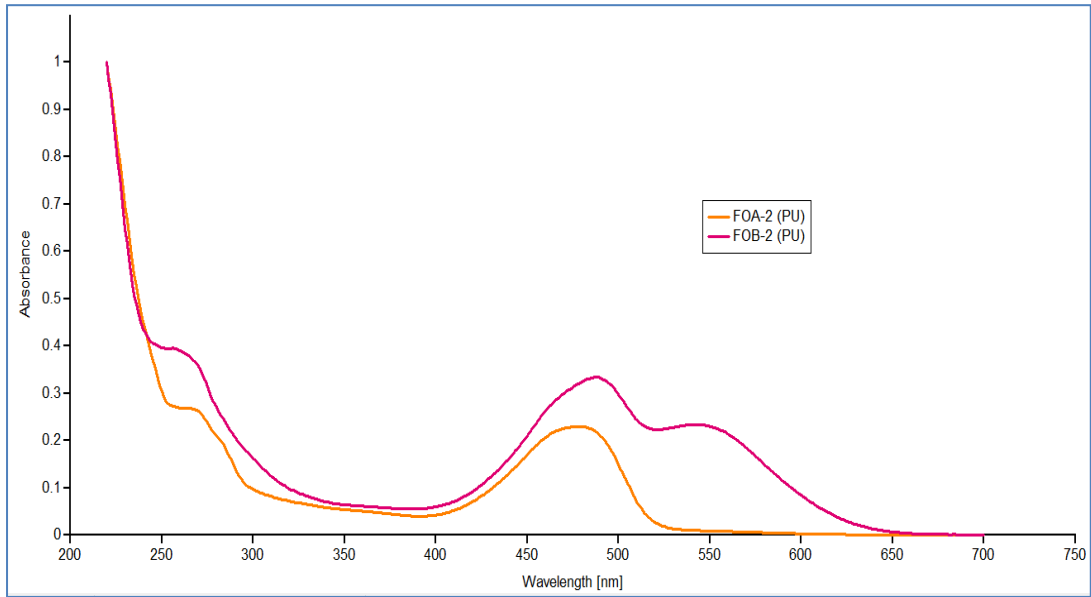


Figura IV.9. Espectros UV-Vis en pigmentos de color: F.O.A-2 (naranja) y F.O.B-2 (guinda) (TI)

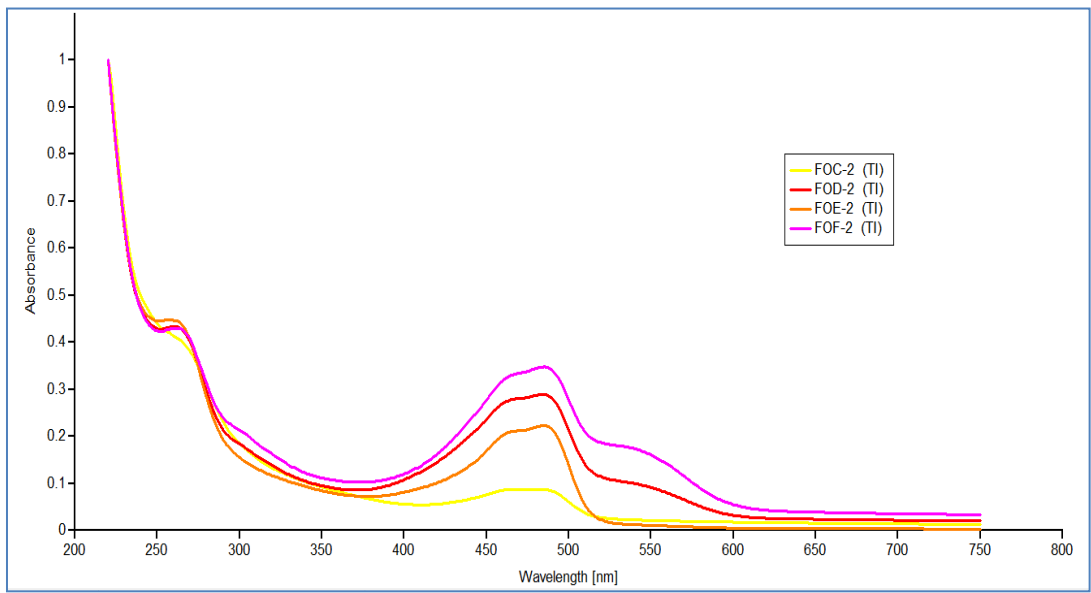


Figura IV.10 Espectros UV-Vis en pigmentos de color: F.O.C-2 (naranja), F.O.D-2 (rojo), F.O.E-2 (naranja) y F.O.F-2 (guinda) (TI)

4.2 POLVO DE PITAYA

4.2.1 TLC

El sistema de solventes EtOH: H₂O: HCOOH (8:11:1) permitió la separación de compuestos en los polvos de pitaya (Figura IV.11). En los polvos guinda (TI) y rojo (TI) se encontraron dos compuestos de color (rojo y amarillo) con $R_f=0.75\pm 0.01$ para el compuesto rojo y $R_f=0.61\pm 0.01$ para el compuesto amarillo (Tabla IV.6). En los polvos guinda de (Pu) se encontraron también dos compuestos de color rojo y amarillo) con un $R_f=0.72\pm 0.01$ para el compuesto rojo y $R_f=0.58\pm 0.01$ para el amarillo.

Los polvos de color naranja (TI) y (Pu) presentaron un solo un compuesto de color amarillo con $R_f=0.59$, mientras que en el polvo amarillo (TI) no fue posible observar en el rango del visible ningún compuesto. Las muestras P5-A y P8-A (TI) al ser reveladas con vapores de yodo presentaron un solo compuesto $R_f=0.75$ atribuible a las betacianinas y que se encuentran en muy baja concentración en los polvos amarillos.

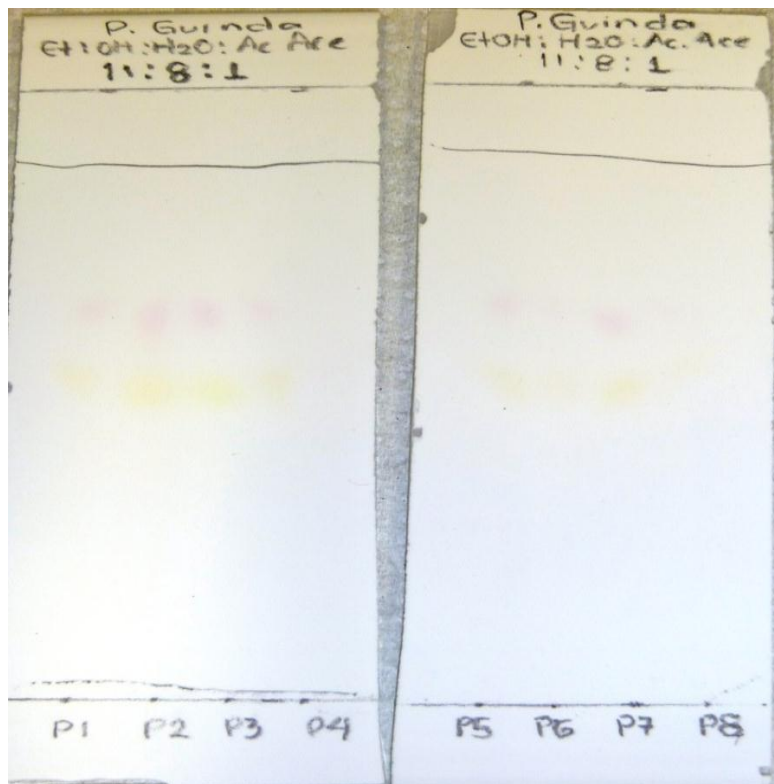


Figura IV.11 Cromatografía en capa delgada (TLC) de polvos de pitaya.

Tabla IV.6.- Rf de los compuestos de color presentes en los polvos.

Polvo	Compuestos	Amarillo (TI)		Rojo (TI)		Naranja (TI)		Guinda (TI)	
		Visible	Iodo	Visible	Iodo	Visible	Iodo	Visible	Iodo
		Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
P1	amarillo	-	-	0.62	-	0.59	-	0.60	-
	rojo	-	-	0.76	0.76	-	0.72	0.75	0.72
P2	amarillo	-	-	0.62	-	0.59	-	0.60	-
	rojo	-	-	0.76	0.74	-	0.69	0.75	0.72
P3	amarillo	-	-	0.62	-	0.59	-	0.62	-
	rojo	-	-	0.76	0.73	-	0.69	0.75	0.69
P4	amarillo	-	-	0.62	-	0.59	-	0.62	-
	rojo	-	-	0.76	0.76	-	0.72	0.75	0.72
P5	amarillo	-	-	0.61	-	0.59	-	0.62	-
	rojo	-	0.75	0.75	0.76	-	0.72	0.75	0.72
P6	amarillo	-	-	0.60	-	0.59	-	0.61	-
	rojo	-	-	0.75	0.76	-	0.72	0.73	0.72
P7	amarillo	-	-	0.60	-	0.59	-	0.61	-
	rojo	-	-	0.75	-	-	0.72	0.73	0.72
P8	amarillo	-	-	0.60	-	0.59	-	0.61	-
	rojo	-	0.75	0.75	0.76	-	0.72	0.75	0.72

4.2.2 UV-Vis

Todos los polvos de color guinda presentaron absorbancias similares que son características de betacianinas y betaxantinas (García & cols., 2011; Stintzing & cols., 2002) (Tabla IV.7 y IV.8). La intensidad de las bandas de absorción varían debido a la concentración, que es función de las condiciones de secado y de la concentración inicial del fruto.

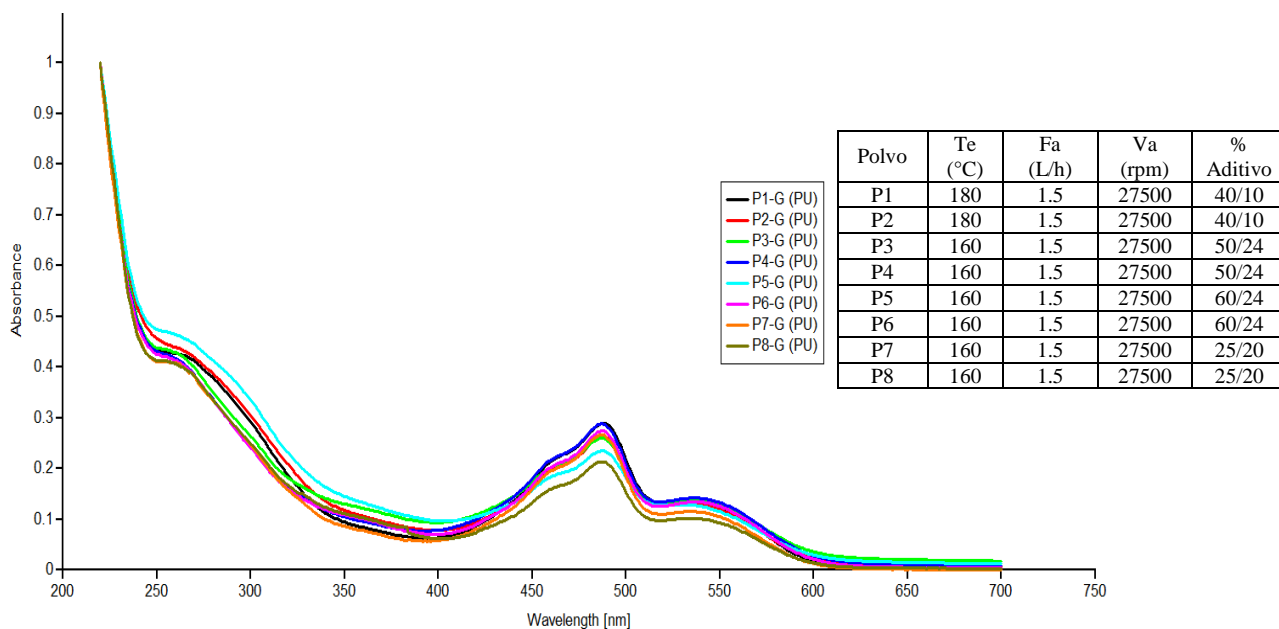


Figura IV.12 Espectros UV-Vis de los polvos de color guinda (Pu).

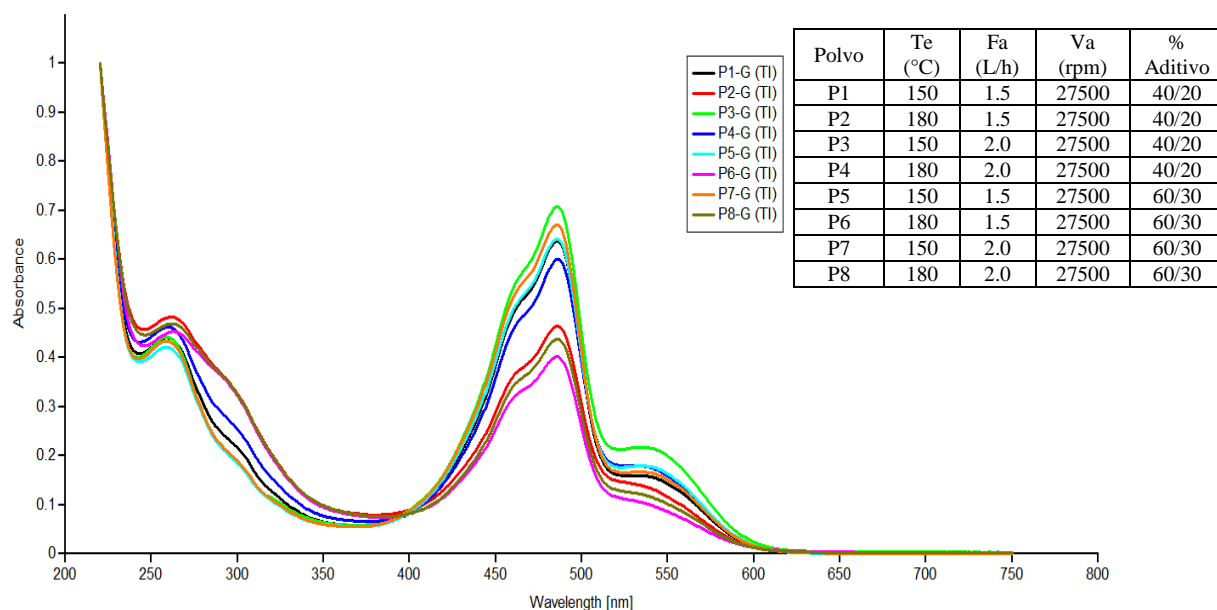


Figura IV.13 Espectros UV-Vis de los polvos de color guinda (TI).

Las longitudes máximas de absorción de los polvos de color rojo (Figura. IV.14) fueron representativas de betalaínas, con excepción de P2-R y P6-R que no presentaron las longitudes máximas de betacianinas (550nm). Una reacción de degradación producida por la temperatura puede explicar este comportamiento que se confirma por la decoloración del color rojo (Figura IV.15)

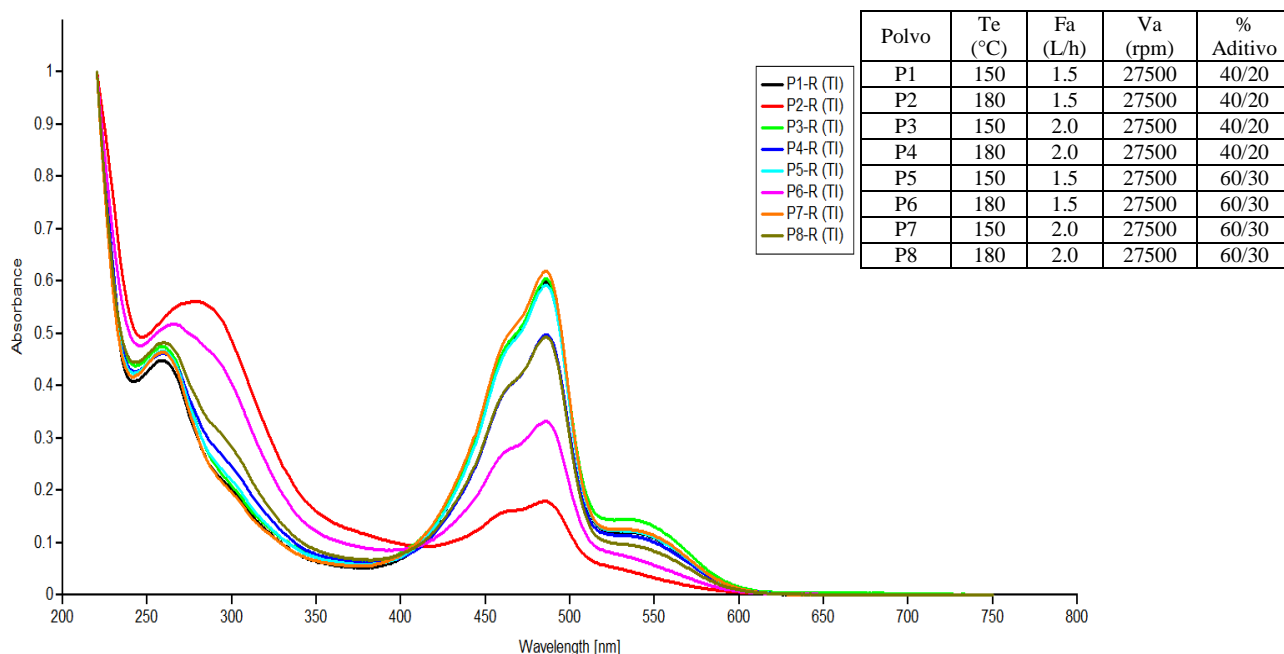


Figura IV.14 Espectros UV-Vis de los polvos de color rojo (TI).

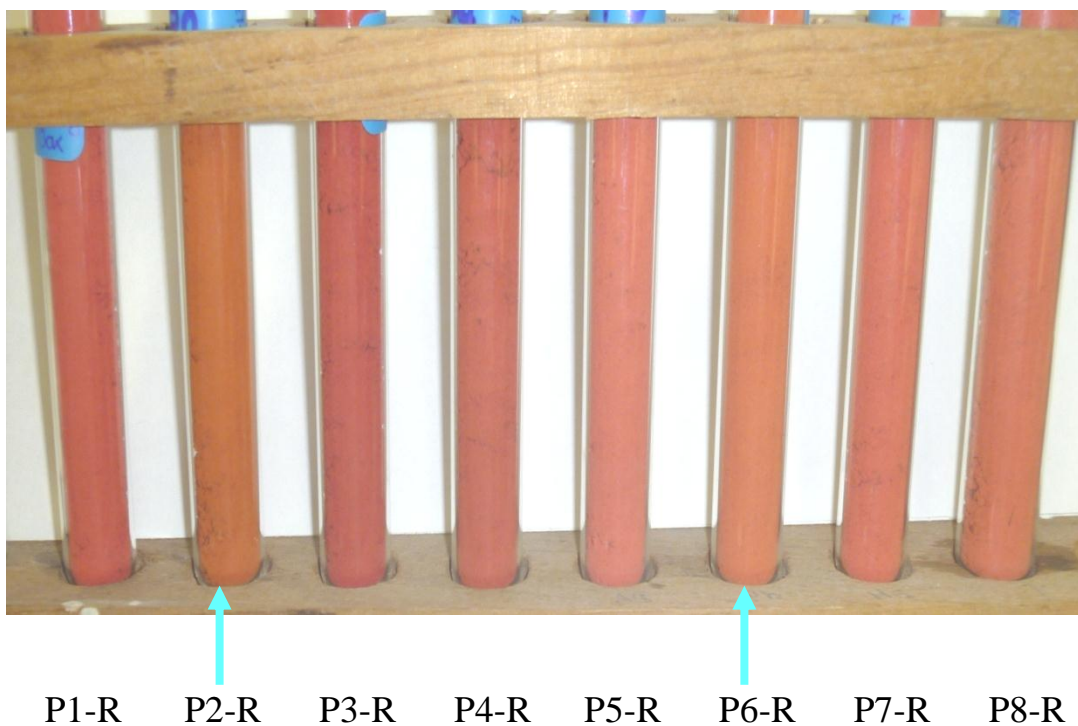


Figura IV.15 Perdida de color en los polvos: P2-R y P6-R (TI)

Los polvos amarillos P5-A y P8-A (TI) y naranjas (P1-N al P8-N (TI) presentaron λ_{max} características de betaxantinas (Tabla IV.7). La longitud máxima varía entre 460 y 480 nm de acuerdo al compuesto amino que se encuentre sustituido en el ácido betalámico (Herbach & cols., 2006). Se confirmó la presencia de betalaínas aciladas (λ_{max} 260nm) donde al menos hay un residuo acilado aromático en la estructura (Figs IV.16 y IV.17).

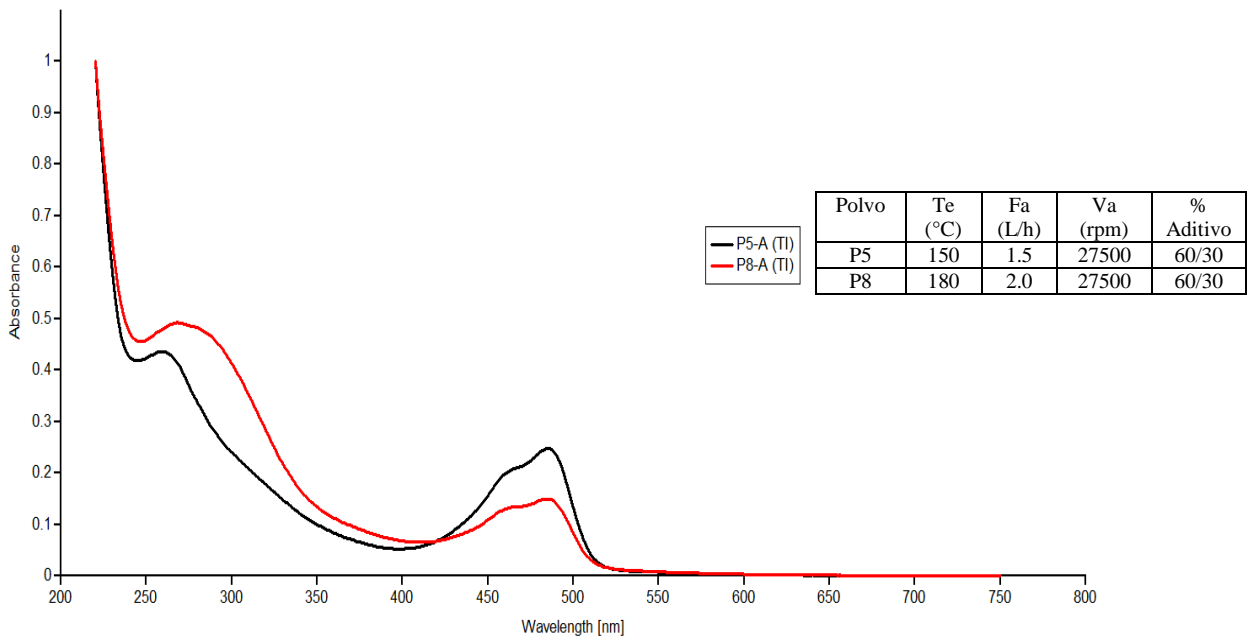


Figura IV.16 Espectros UV-Vis en polvos de color amarillo (TI).

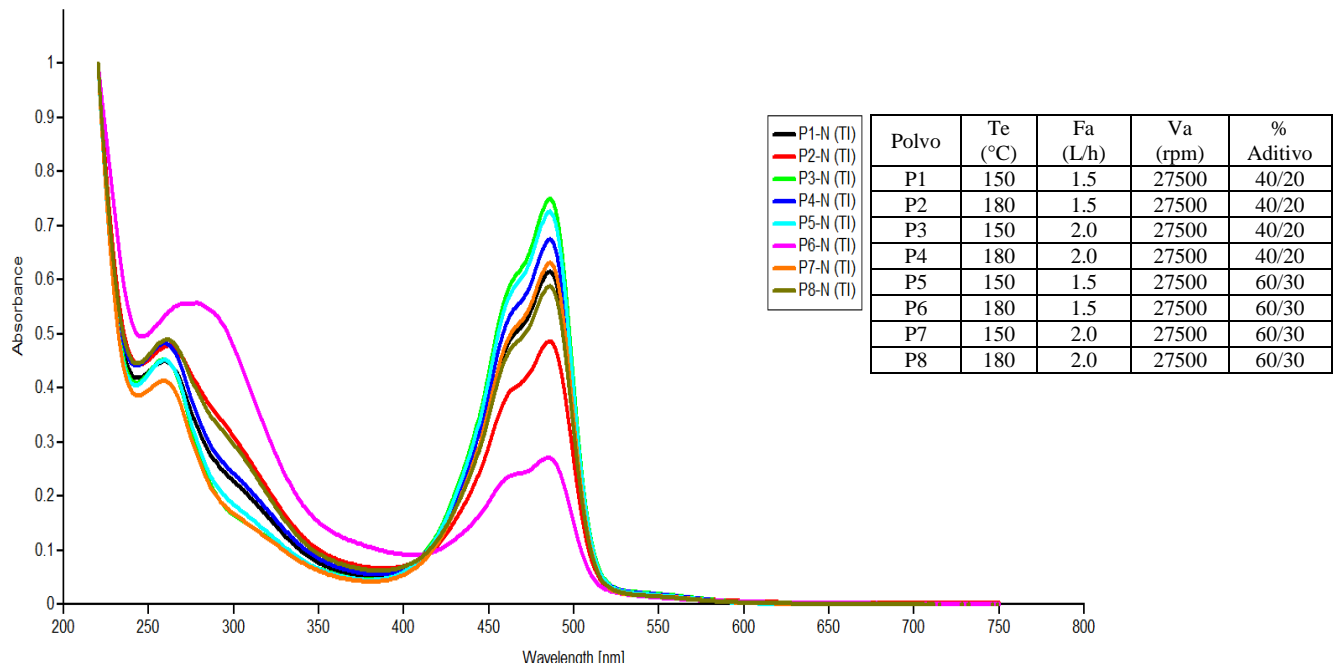


Figura IV.17 Espectros UV-Vis de polvos de color naranja (TI).

Tabla IV.7 $\lambda_{\text{máx}}$ de los polvos (Pu)

Te (°C)	180	180	160	160	160	160	160	160
Fa (L/h)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
% Adt	40/10	40/10	50/24	50/24	60/24	60/24	25/20	25/20
λ_{max}	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
λ_1	540	540	540	540	540	540	540	540
λ_2	488	488	488	488	488	488	488	488
λ_3	460	460	460	460	460	460	460	460
λ_4	266	266	266	266	266	266	266	266

Tabla IV.8 λ_{\max} de los polvos (TI)

Te (°C)	150	180	150	180	150	180	150	180
Fa (L/h)	1.5	1.5	2.0	2.0	1.5	1.5	2.0	2.0
% Adt	40/20	40/20	40/20	40/20	60/30	60/30	60/30	60/30
λ_{\max}	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
λ_1	-	-	-	-	-	-	-	-
λ_2	-	-	-	-	485	-	-	485
λ_3	-	-	-	-	462	-	-	462
λ_4	-	-	-	-	260	-	-	268
λ_{\max}	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
λ_1	550		550	550	550		550	550
λ_2	486	485	485	485	485	486	485	485
λ_3	460	458	462	462	462	460	460	460
λ_4	260	278	260	260	260	260	260	260
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
λ_1	-	-	-	-	-	-	-	-
λ_2	485	485	485	485	485	485	486	486
λ_3	460	460	460	460	460	462	463	463
λ_4	260	260	260	260	260	275	260	260
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
λ_1	550	550	550	550	550	550	550	550
λ_2	485	485	485	485	485	485	485	485
λ_3	460	460	460	460	460	460	460	460
λ_4	260	260	260	260	260	260	260	260

4.2.3 IR-FT

Respecto al análisis IR-FT (Figura IV.18), los extractos orgánicos totales (F.O.A-1 (PU), F.O.B-1 (PU), F.O.C-1 (TI), F.O.D-1(TI), F.O.E-1(TI), FO.F-1 (TI) y los polvos de pitaya de Puebla (Pu) y Oaxaca (TI) presentaron las mismas absorciones en el infrarrojo en la región 4000cm^{-1} a los 600cm^{-1} (Tabla IV.9).

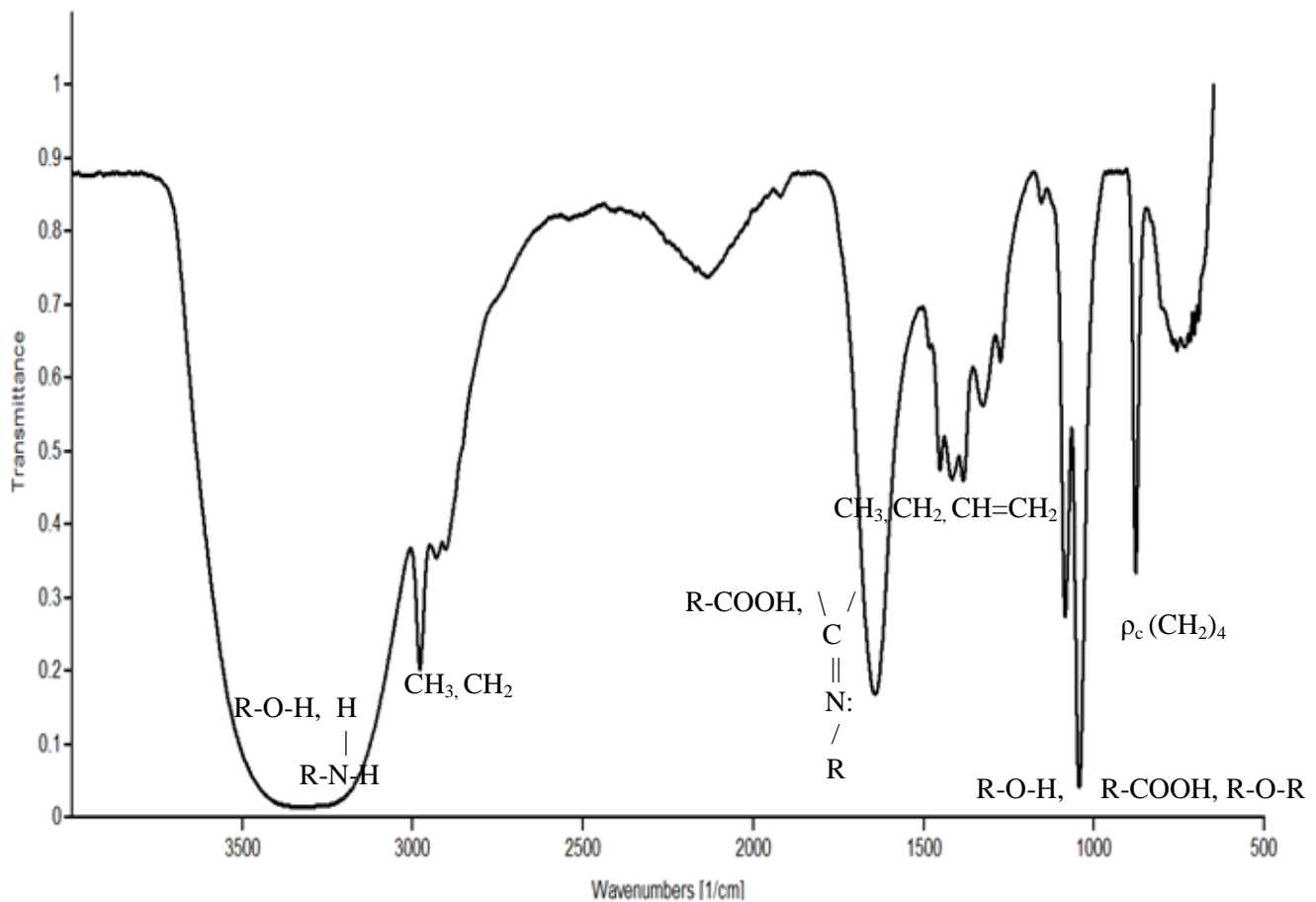


Figura IV.18 Espectro Infrarrojo de los EOT y polvos.

La región comprendida entre 3100 y 3600cm^{-1} corresponde a absorciones causadas por las vibraciones de valencia de enlaces de hidrógenos móviles N-H, O-H.

Abajo de 3000cm^{-1} podemos ver las vibraciones de valencia (asimétricas y simétricas) de los enlaces $\text{Csp}^3\text{-H}$ en grupos CH_3 y CH_2 . Aproximadamente en 1600cm^{-1} podemos ver las bandas de las vibraciones de valencia de los dobles enlaces C=O .

Por debajo de 1400cm^{-1} se pueden observar muchas bandas colapsadas que corresponderían principalmente a los diferentes modos vibracionales de deformación.

Tabla IV.9- Modos de vibración presentes en los EOT y polvos.

No Onda cm ⁻¹	Vibración	Grupo Funcional	
3600-3100	v O-H y/o N-H (libres)	R-O-H	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{R-N-H} \end{array}$
<3000	v _{as} Csp ³ -H	CH ₃	CH ₂
1600	v C=O y/o C=N-R	R-COOH	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=N-R} \\ \diagdown \end{array}$
1400-1200	δ _{as} , δ _s Csp ³ -H, Csp ² -H,	CH ₃ , CH ₂	CH=CH ₂
1100	v C-O	R-O-H	R-COOH
900-600	CH Rocking	ρ _c (CH ₂) ₄	

4.2.4 HPLC

4.2.4.1 Cuantificación de betanina en EOT

Los tiempos de retención de los compuestos de color en extractos orgánicos totales (EOT) y polvos fueron coincidentes con el tiempo de retención de un estándar comercial de Betanina (ALDRICH CDS000584) (Anexo F).

Podemos inferir de esta evaluación y de las características de los espectros ultravioleta que los pigmentos de los polvos contienen en su estructura un segmento del tipo betanina, por lo que los resultados de cuantificación están expresados en ppm de betanina.

Los EOT obtenidos de la pulpa guinda (PU) tiene una mayor concentración de betacianinas que la guinda y roja de TI (Tabla IV.10; Figura IV.19). Esto es razonable debido al origen y condiciones de desarrollo del fruto las cuales son diferentes.

Tabla IV.10.- Concentración de colorantes en EOT.

EOT	Betanina (ppm _{betanina} /g pulpa seca)
F.O.B-1 (Pu)	9853.9
F.O.D-1 (TI)	4980.3
F.O.F-1 (TI)	5225.4

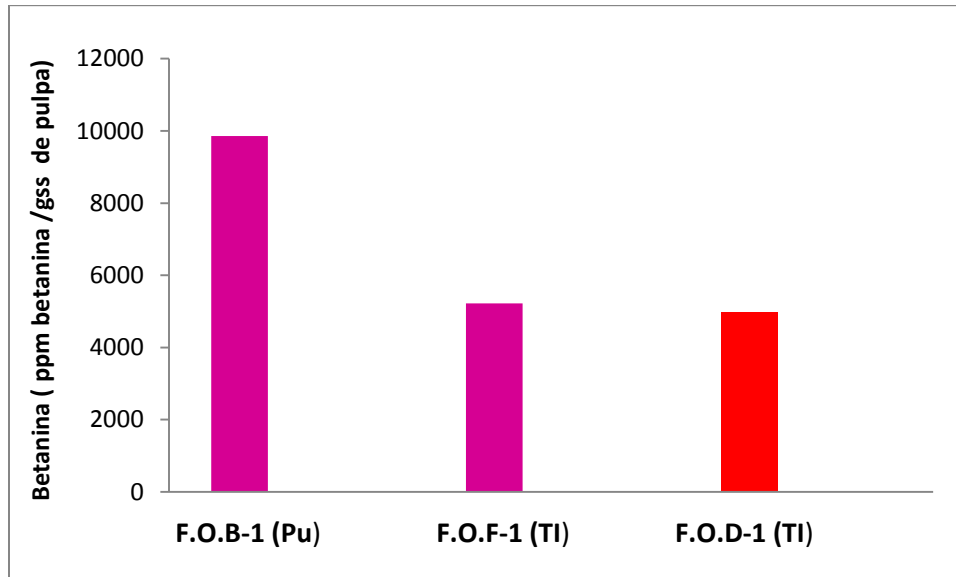


Figura IV.19 Concentración de betanina en EOT.

4.2.4.2 Cuantificación de betanina en polvos

Un mayor porcentaje de aditivos y una temperatura de secado menor preservó las betaninas en todos los polvos (Pu y TI) (Ver anexo G). Un flujo de alimentación bajo, una temperatura alta y una baja proporción de aditivos tiene un efecto negativo en el contenido de betaninas, que se observó en el color de los polvos (Figuras IV.20, 21 y 22).

Ha sido establecido que los compuestos responsables de la coloración guinda, roja es debido a la concentración de betacianinas que en este trabajo se cuantificó como betanina.

El tratamiento P6-G (Te:160°C, Fa:1.5 L/h, %Adt:60/24) es el que preservó mejor las betaninas en polvos guindas de Puebla, mientras que en los polvos guindas y rojos de (TI) fue el tratamiento P5-G y P5-R (Te:150°C, Fa:1.5 L/h, %Adt:60/30). En general los polvos de (TI) presentaron un porcentaje promedio del 50% de retención de betaninas en estos tratamientos. Mientras que en el polvo P6-G (Pu) fue del 30%. Estas condiciones permiten obtener un producto estable con un contenido de humedad inferior al 10% (Tabla IV.11) manteniendo una coloración intensa de rojo y guinda.

Tabla IV.11. Contenido de humedad en polvos.

Polvo	Xbs (g H ₂ O/gss)
Guinda (Pu)	3.28
Rojo (TI)	3.52
Guinda (TI)	2.90

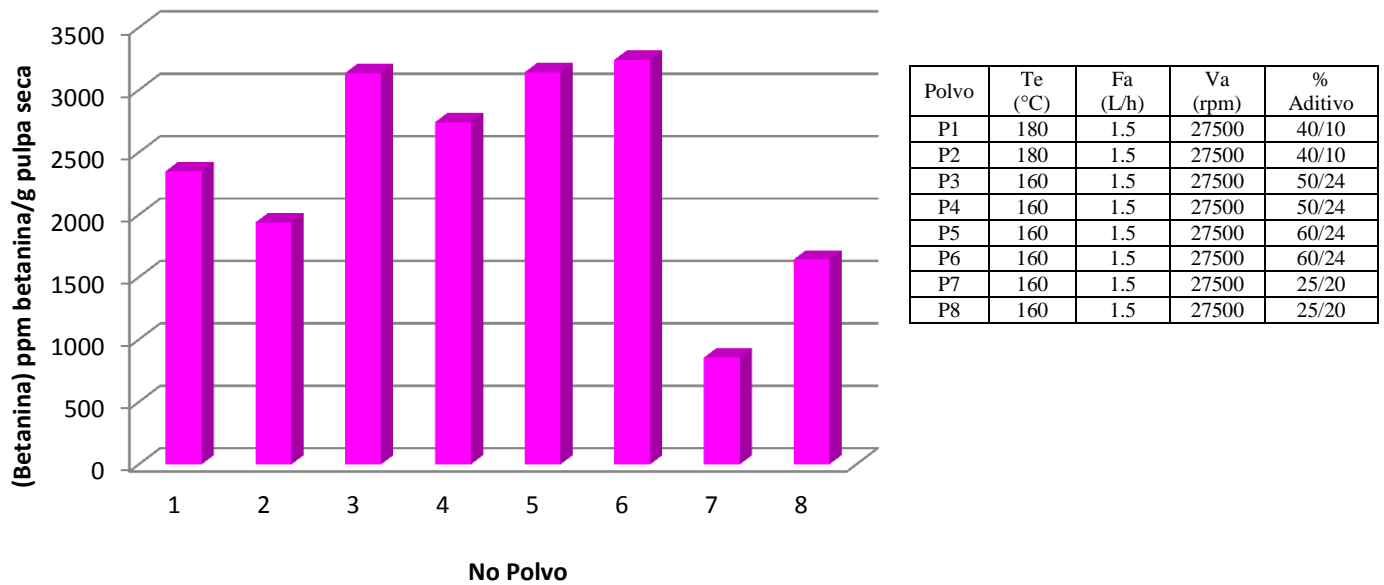


Figura IV.20 Concentración de betanina en polvos de color guinda (Pu).

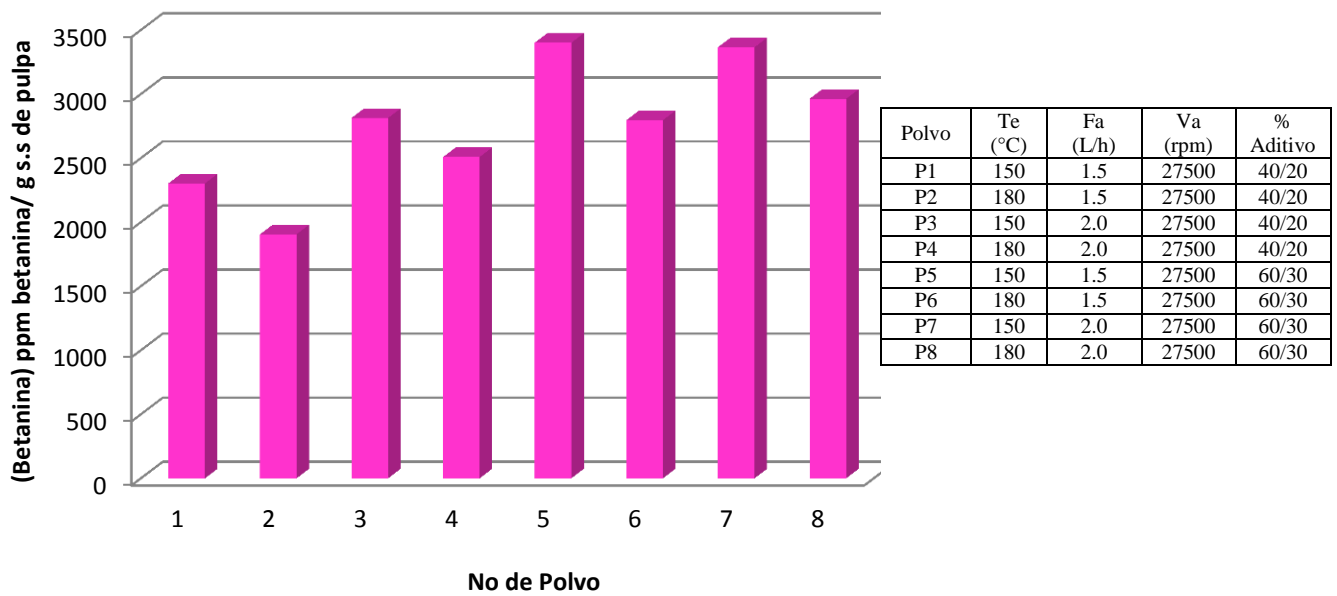


Figura IV.21 Concentración de betanina en polvos de color guinda (TI).

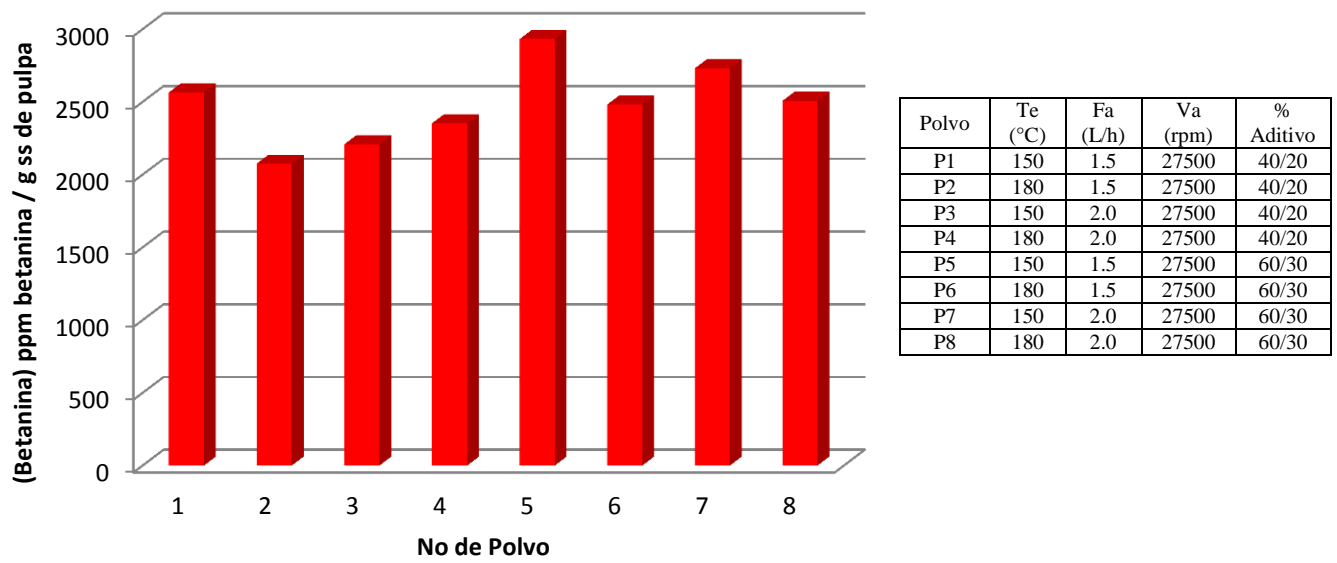


Figura IV.22 Concentración de betanina en polvos de color rojo (TI).

CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En este trabajo se evaluó el efecto térmico sobre los pigmentos contenidos en pulpa y polvo de pitaya sometido a un proceso de encapsulación usando secado por aspersión. Inicialmente se evaluaron diversas mezclas de solventes para la optima extracción de los compuestos seleccionando la de EtOH:H₂O (70:30) acidificada (HCl≈1 M). La separación de compuestos por TLC mostro dos compuestos de color uno rojo y otro amarillo, este ultimo de mayor polaridad. Estos resultados son opuestos a los reportados en las especies *Beta vulgaris* y . Esto sugiere que las betalainas encontradas en los diferentes especies tienen estructuras diferentes que pueden influir en la estabilidad.

Se confirmo mediante espectroscopia UV-Vis que en pulpa y polvos hay betacianinas y betaxantinas con un comportamiento hipsocromico a pH básico, pero estable a pH acido estos resultados son consistentes con los reportados para las betalainas de otras especies de frutos de *Cactaceas*.

Un efecto negativo de la temperatura de secado sobre las betalainas fue encontrado en los polvos reflejada en la perdida de color. Las betacianinas fueron mas afectadas que las betaxantinas, las cuales mostraron mayor estabilidad térmica.

Estos resultados son opuestos a los reportados para la especie *Opuntia* (Moßhammer & cols., 2006) confirmando, que la estructura molecular de las betalainas son diferentes entre las especies. Tomando en cuenta que existen muy pocos colorantes naturales con tonalidad amarilla y naranja, las betaxantinas encontradas en la *Stenocereus pruinosus* son una fuente promisoría de colorante natural.

Se demostró que el uso de aditivos maltodextrina/pectina tiene un efecto protector de las betalaínas proporcionando estabilidad al evaluar la concentración de betaninas. El tratamiento P5 (Te:150°C, Fa:1.5 L/h, %Ade:60/30) mantuvo un contenido de betaninas mayor que 2900 ppm de betanina en los polvos de (TI). Esto se confirmo en la intensidad de color en los polvos.

Se concluye que el método de encapsulación usando el secado por aspersión modifica tanto estructuralmente las moléculas de betalainas como la concentración de betalainas sin embargo la intensidad del color en los polvos indica que la degradación de betalainas no fue tan representativa.

5.2 Recomendaciones

Para ampliar la investigación realizada durante este trabajo, se propone:

- Evaluar otros aditivos y otras condiciones de encapsulamiento para ver si se mejora la retención de pigmentos.
- Hacer la identificación de las especies químicas presentes en los EOT y polvos mediante HPLC-MS.
- Concentrar los jugos de pitaya para obtener un mayor contenido de colorantes en los polvos.
- Evaluar la estabilidad de las betalaínas en los polvos con respecto al tiempo.
- Realizar un estudio detallado de identificación de la pulpa de pitaya amarilla y naranja como fuente promisoría de colorantes amarillos (betaxantinas).

REFERENCIAS

- Adzahan, J.B., Kharidah, M., Dzulkifly, M. H., Adzahan, N. (2012). Spray-Drying Optimization for Red Pitaya Peel (*Hylocereus polyrhizus*). Journal of Food Bioprocess Technology.
- Annop, A.S., Rana, M.K., Preetham S.P. (2011) Cactus: a medicinal food. Journal Food Scientists Technology 49 (5), 530-536.
- Azeredo, H.M.C (2006). Betalains:properties, sources, applications, and stability- a review. Journal Food Science and Technology 44, 2365-2376.
- Bonilla, Gonzales F.A (2010). Plan de Negocios para Comercializar La Pitaya de Mayo Producida en San Jose Chichihualtepec, Tesis, Universidad Tecnologica de la Mixteca, Oaxaca.
- Cai, Y.Z., Corke, H. (2000). Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments Journal of Food Science. 6, 1248-1252.
- Cancino, Joaquin V. (2001). Botanica Economica de Cuatro Especies de San Juan Ixcaquixtla Mixteca Poblana, Tesis, Universidad Autonoma de Chapingo, Mexico.
- Fernandez, Lopez J.A., Almela L (2001). Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits. Journal of Chromatography A 913, 415-420.
- Figuroa, Sumano AR & Sánchez, López O & Santiago, Gomez MP, (2010) 'La pitaya (*Stenocereus Pruinosus*) como alimento funcional' cartel presentado en el VII Congreso del Noroeste y III Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología Hermosillo Sonora, 760-772 Noviembre.
- Gandía, Herrero F., Jiménez, Atienzár M., Cabanes, J., Garcia, Carmona F., Escibano, J. (2010) Stabilization of the Bioactive Pigment of *Opuntia* Fruits through Maltodextrin Encapsulation. Journal Agricultural. Food Chemistry 58 10646–10652.
- Gandia, Herrero F., Garcia, Carmona F., Escibano, Josefa. (2005) Development of a Protocol for the Semi-synthesis and Purification of Betaxanthins. Journal Innovative Food Science and Emerging Technologies 6, 221– 231.
- Garcia, Carmona F., Escibano, Cebrian J., Gandia, Herrero. 2011, *Procedimiento de Obtencion de Acido Betalamico y Uso del Mismo*, ES Patente A61K31/44,C07D211/78, A23L3/3544
- Garcia, Carmona F., Gandia, Herrero., Escibano, J. (2011) Flores Fluorescentes. Journal Investigación y Ciencia.es 51-57
- Gharsallaoui, Adem., Roudaut, Gae'lle., Chambin, Odile., Voilley, Andre'e., Saurel, Re'mi (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Journal Food Research International 40, 1107-1121

- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2006) Betalain Stability and Degradation Structural and Chromatic Aspects. *Journal of Food Science* 4, 41-49.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., Carle, R. (2004). Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] monitored by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analyses *Journal Eur Food Res Technol.* 219, 377-385.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., Carle, R. (2006). Betalain Stability and Degradation Structural and Chromatic Aspects. *Journal Concise Reviews in Food Science.* 4, 41-49.
- Fernandez, Lopez J.A., Almela, L. (2001). Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in *prickly pear* fruits. *Journal of Chromatography* 913, 415-420.
- Laurent, C. (2004). Characterization and Functional Identification of a Novel Plant Extradiol 4,5 Dioxygenase Involved in Betalain pigment Biosynthesis in *Portulaca Grandiflora*, Tesis, Faculté de Biologie et Médecine de l'Université de Lausanne.
- Lay Tze, Ng., Pik Han, Ch., Aniza, Yusof Y., Nyuk, Ling Ch., Talib, Rosnita A., Saleena, Taip F., Gulzarul, Mohammad A. (2012). *Journal Food Sci Biotechnol* 21(3), 675-682
- Luna, Morales C.C., Aguirre, Rivera R., Peña, Valdivia C. (2001) Cultivares tradicionales mixtecos de *Stenocereus pruinosus* y *S.stellatus* (*Cactaceae*). *Journal serie Botanica, Anales del Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México* 72 (2) 131-155
- Mandujano, Ruiz R.R (2006). Estudio Preliminar de los Pigmentos presentes en la Cascara de Pitaya (*Stenocereus stellatus*) de la Region de la Mixteca, Tesis, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca.
- Master, K. (1985). *Spray Drying*. George Godwin. London. 684p.
- McMurry, J (2001), *Química Orgánica*, Harper Perennial, New York.
- Moreno, Diego A., Garcia, Viguera C., Gil J.A., Gil, Izquierdo A. (2007) Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Journal Phytochemistry.* 7, 261-280.
- Moßhammer M. R., Stintzing F. C., Carle, R. (2006). Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from *cactus pear*. *Journal Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 7, 275-287.
- Pavokovic, D., Rasol, Marijana K. (2011). Complex Biochemistry and Biotechnological Production of Betalains. *Journal Food Technology Biotechnology* 49(2) 145-155.
- Rodríguez, Hernández G.R., González, García R., Grajales, Lagunes A., Ruiz, Cabrera M.A. (2005) Spray Drying of Cactus Pear Juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the Physicochemical Properties of Powder and Reconstituted Product. *Journal Drying Technology* 23, 955-973.

Gonzales, Sanchez N. (2006). Extracción y Caracterización de los Principales Pigmentos del Opuntia joconostle c.v. (*xoconostle*), Tesis, CICATA-IPN, Mexico.

Scotter, M.J. (2011) Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Journal Food Additives and Contaminants*. 5, 527-596.

Soriano, Santos J., Franco, Zavaleta M.E., Pelayo, Zaldivar C., Armella, Villalpando M.A, Yañez Lopez M.L, Guerrero Legarreta I. (2007) Caracterización Parcial del Pigmento Rojo del Fruto de la "Jiotilla" (*Escontria Chiotilla* (Weber) Britton & Rose) *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 001, 19-25.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A, 2001, *Principio de Análisis Instrumental*, McGraw Hill, España.

Stintzing, F.C., Carle, Reinhold. (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Journal Trends in Food Science & Technology*. 15, 19-38

Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. (2002) Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus*. *Journal Food Chemistry* . 77, 101–106.

Stintzing, F.C., Carle, R. (2007) Betalains-emerging prospects for food scientists. *Journal Trends in Food Science & Technology*. 18, 514-525.

Marañón, Ruiz V.F., Rizo de la Torre, L. (2011) Caracterización de las propiedades ópticas de Betacianinas y Betaxantinas. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*. 24(4), 113-120

Viloria, Matos A., Corbelli, Moreno D., Moreno, Alvarez M.J (2002) Estabilidad de betalainas en pulpa de tuna (*Opuntia boldinghii* Br. et R.) sometidas a un proceso de liofilización. *Revista de Facultad de Agronomía*. 4, 324-331.

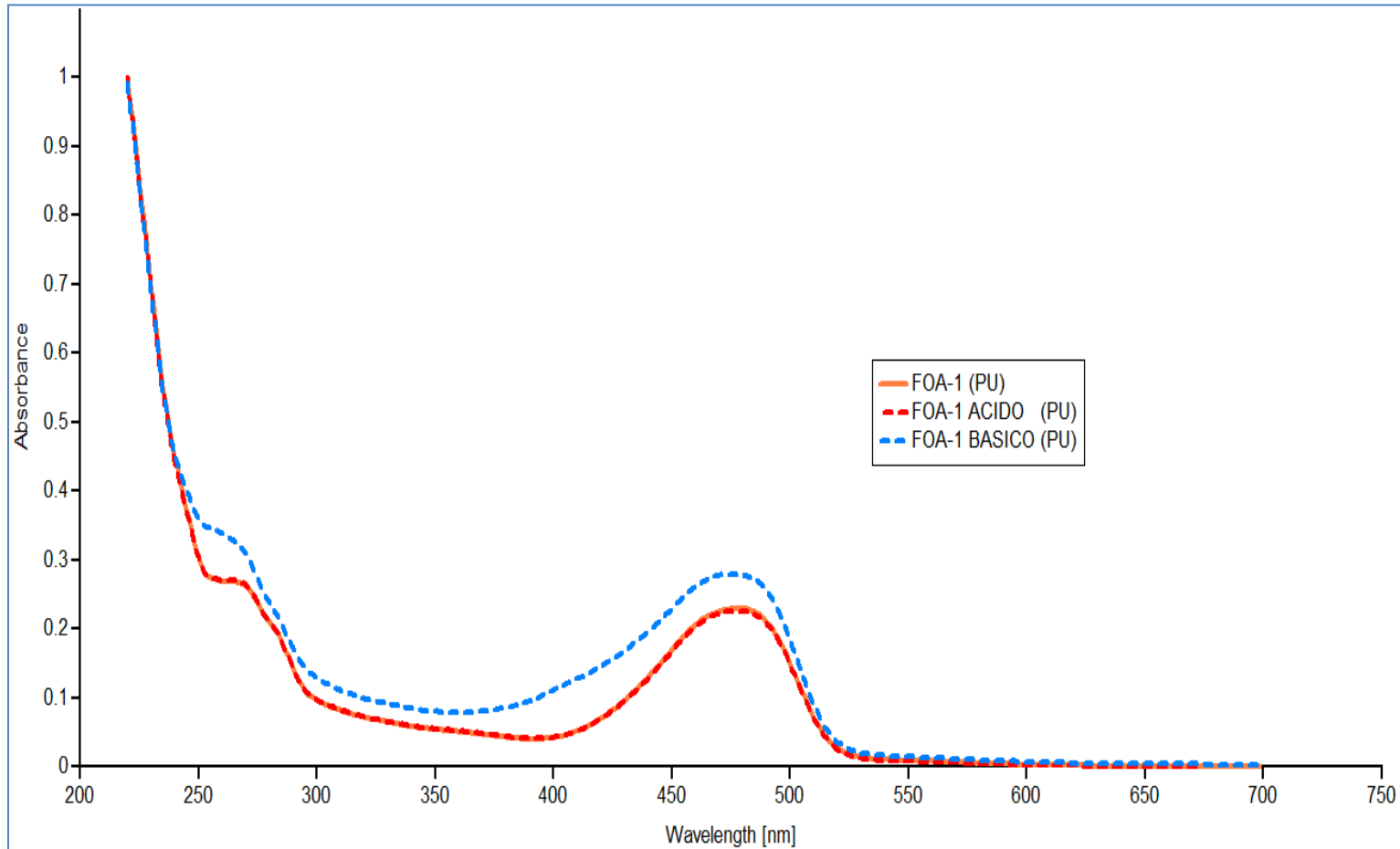
Voet, V, 2006, *Bioquímica*, Medica Panamericana, España.

Wade, JR L.G. (2004) *Química Orgánica*, Pearson Educación S.A, Madrid.

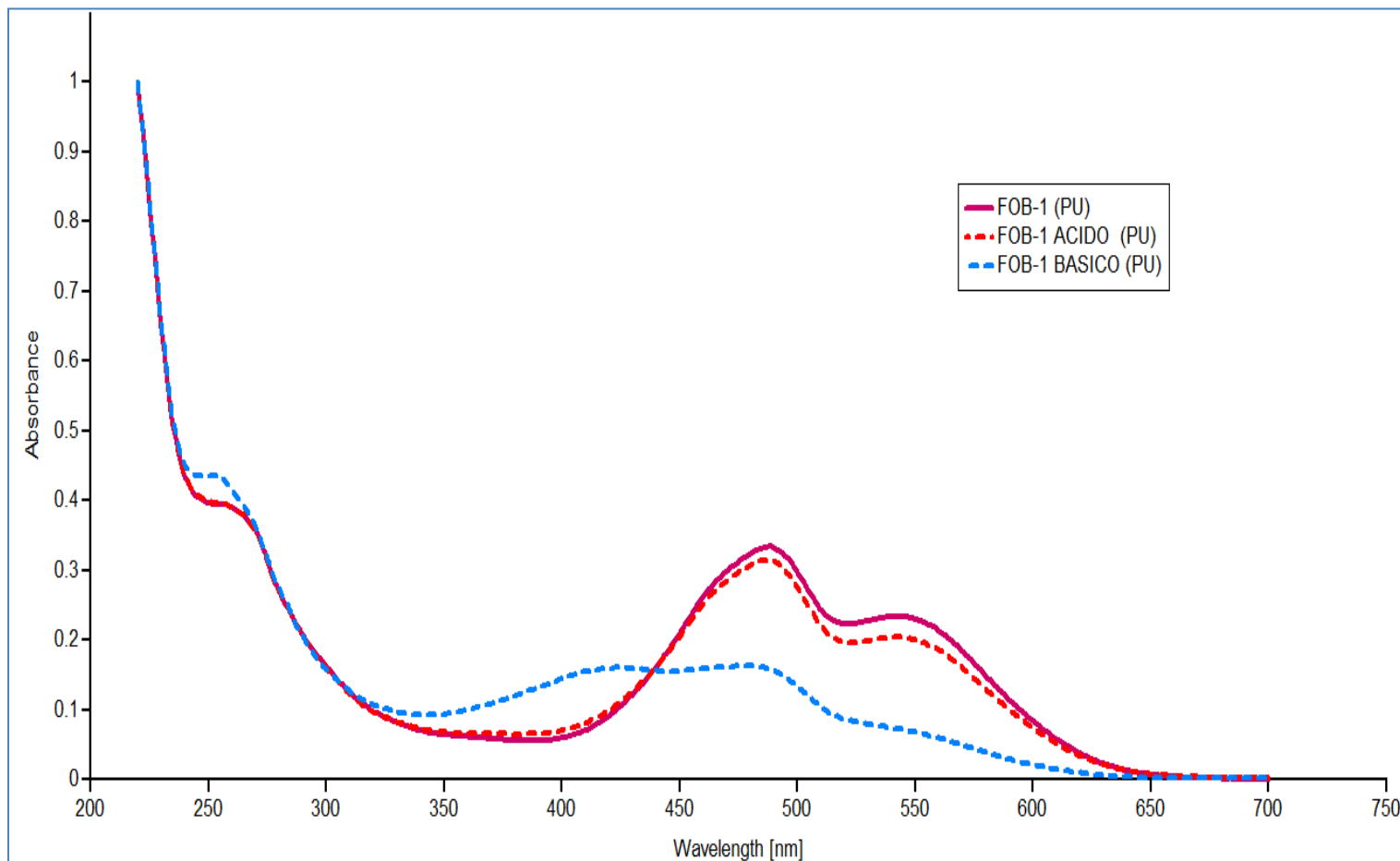
Wybraniec, S., Platzner, I., Geresh, S., Gottlieb, H.E., Haimberg, M., Mogilnitzki, M., Mizrahi, Y. (2001). Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhizus*. *Journal Phytochemistry*. 58, 1209-1212.

ANEXO A. ESPECTROS UV-Vis – Extractos Orgánicos Totales (EOT)

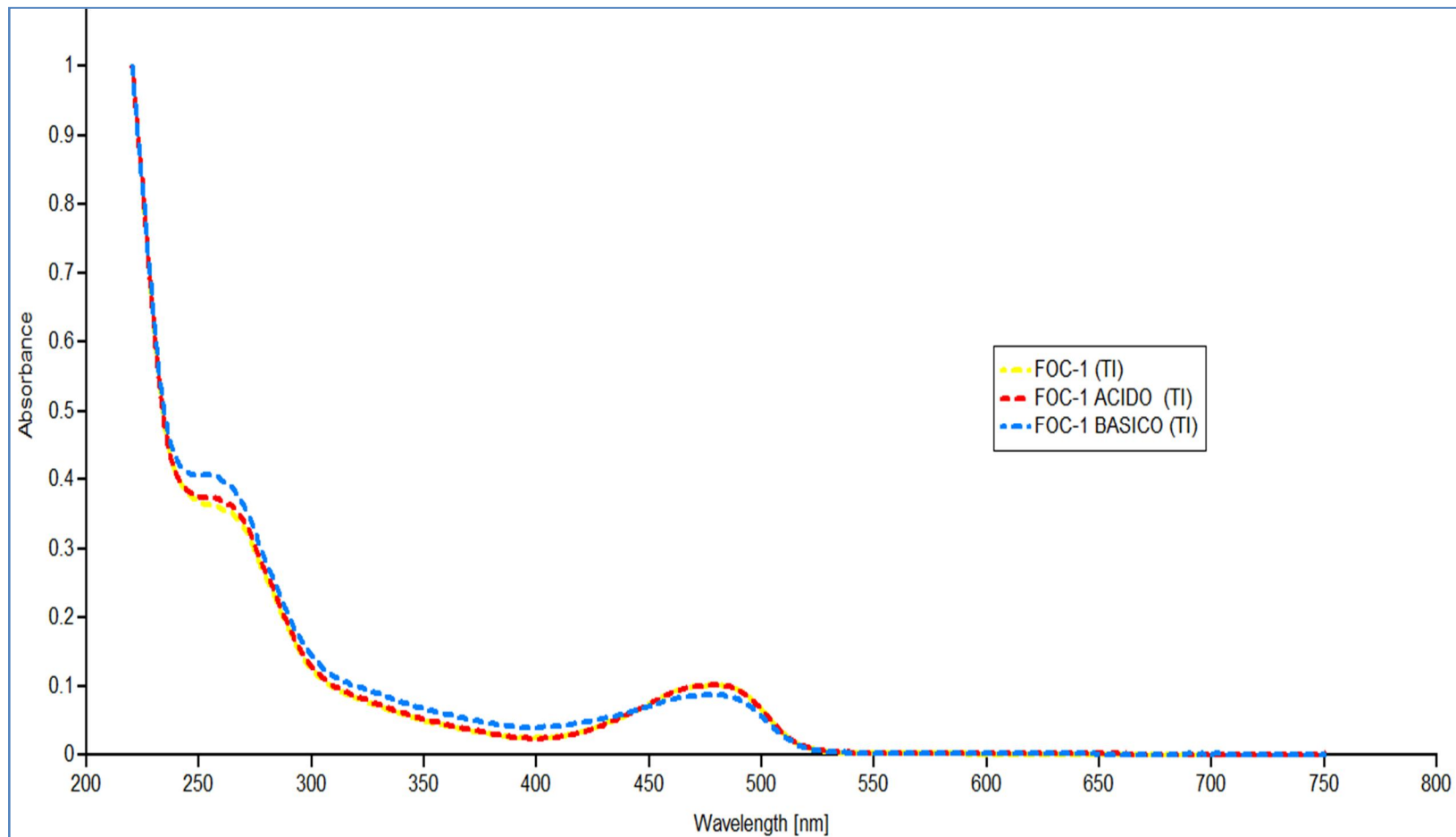
Influencia del pH



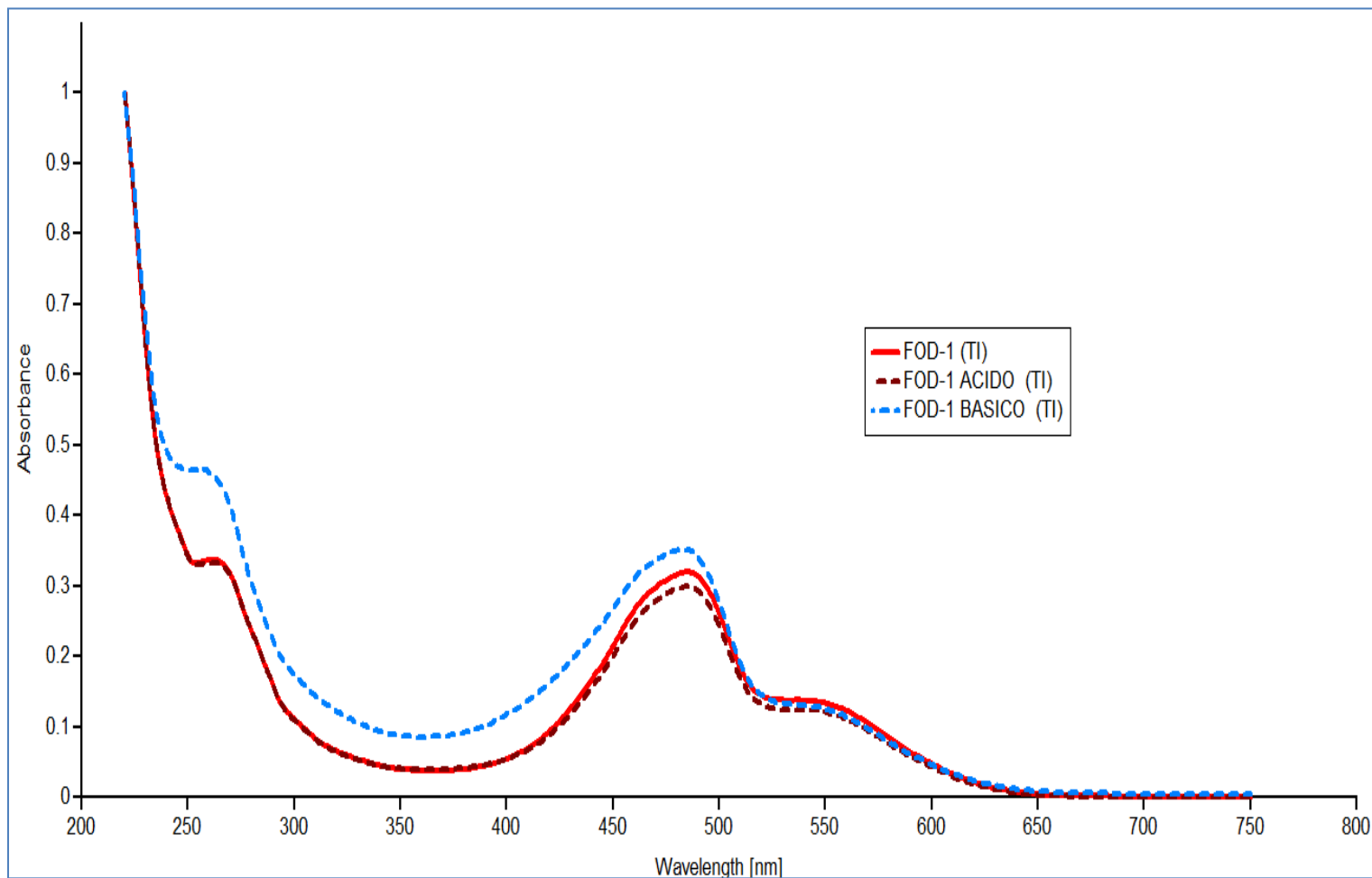
Anexo A.1 Extracto Naranja (F.O.A-1, Pu)



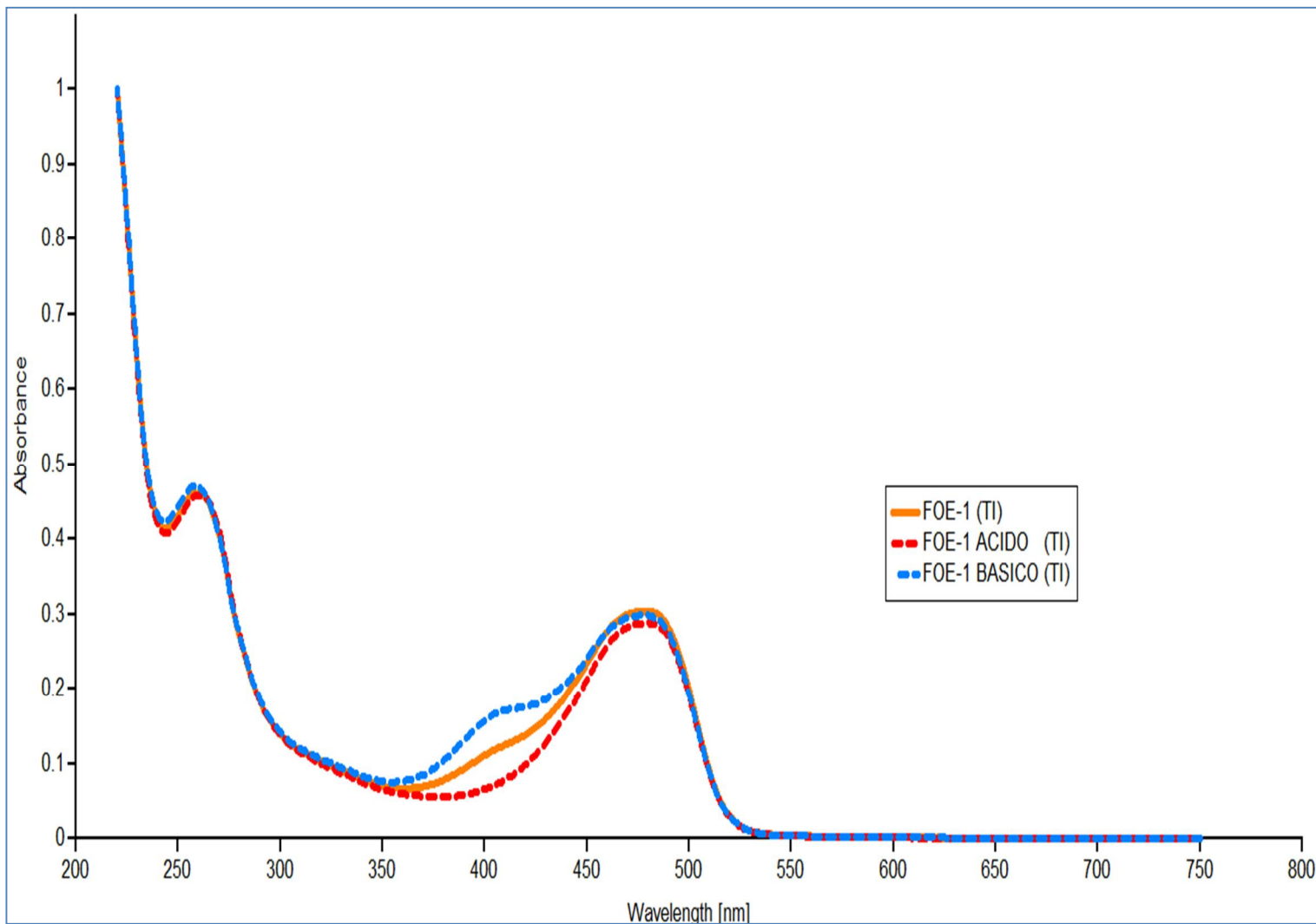
Anexo A.2 Extracto Guinda (F.O.B-1, Pu)



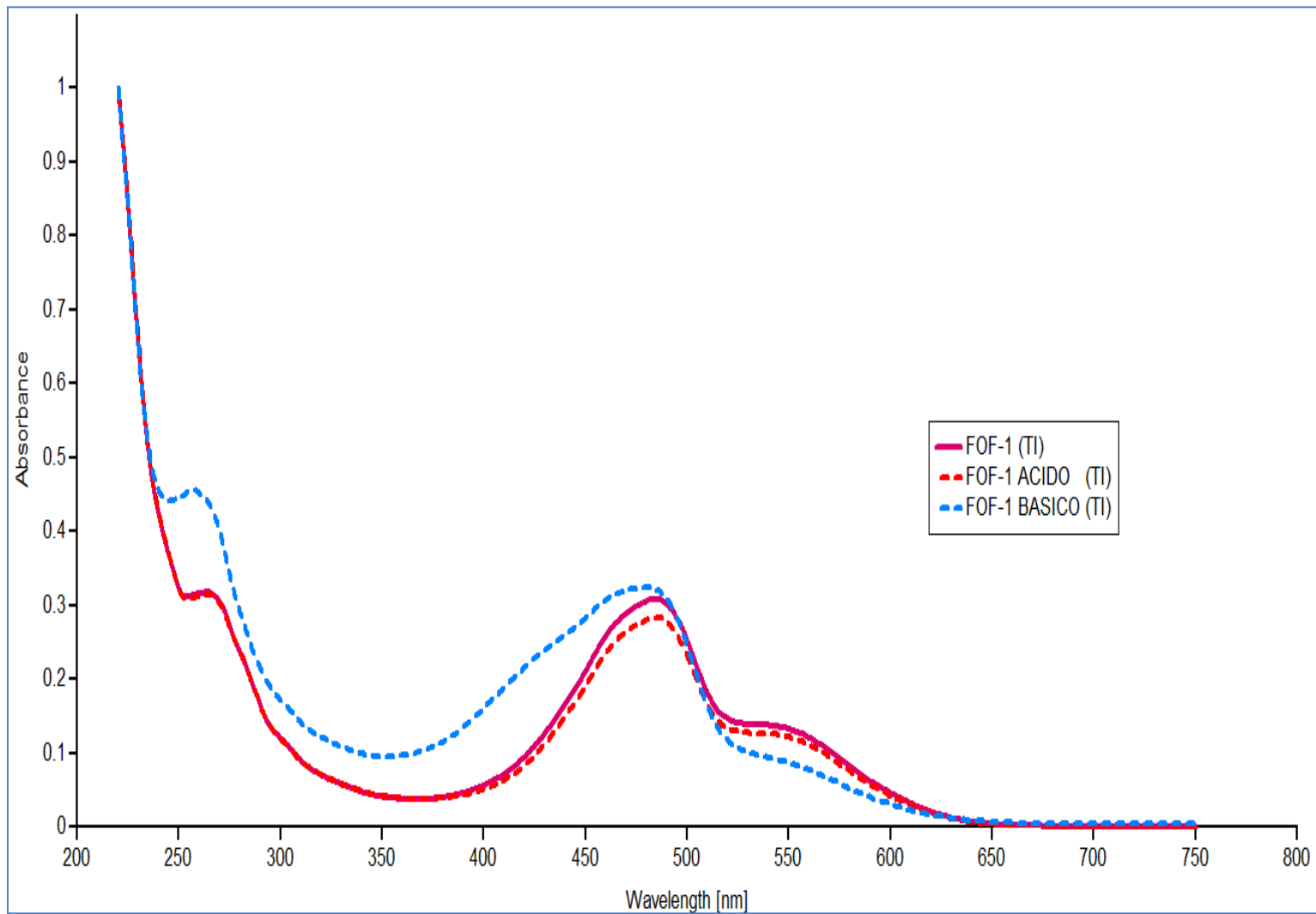
Anexo A.3 Extracto Amarillo F.O.C-1 (TI)



Anexo A.4 Extracto Rojo F.O.D-1 (TI)

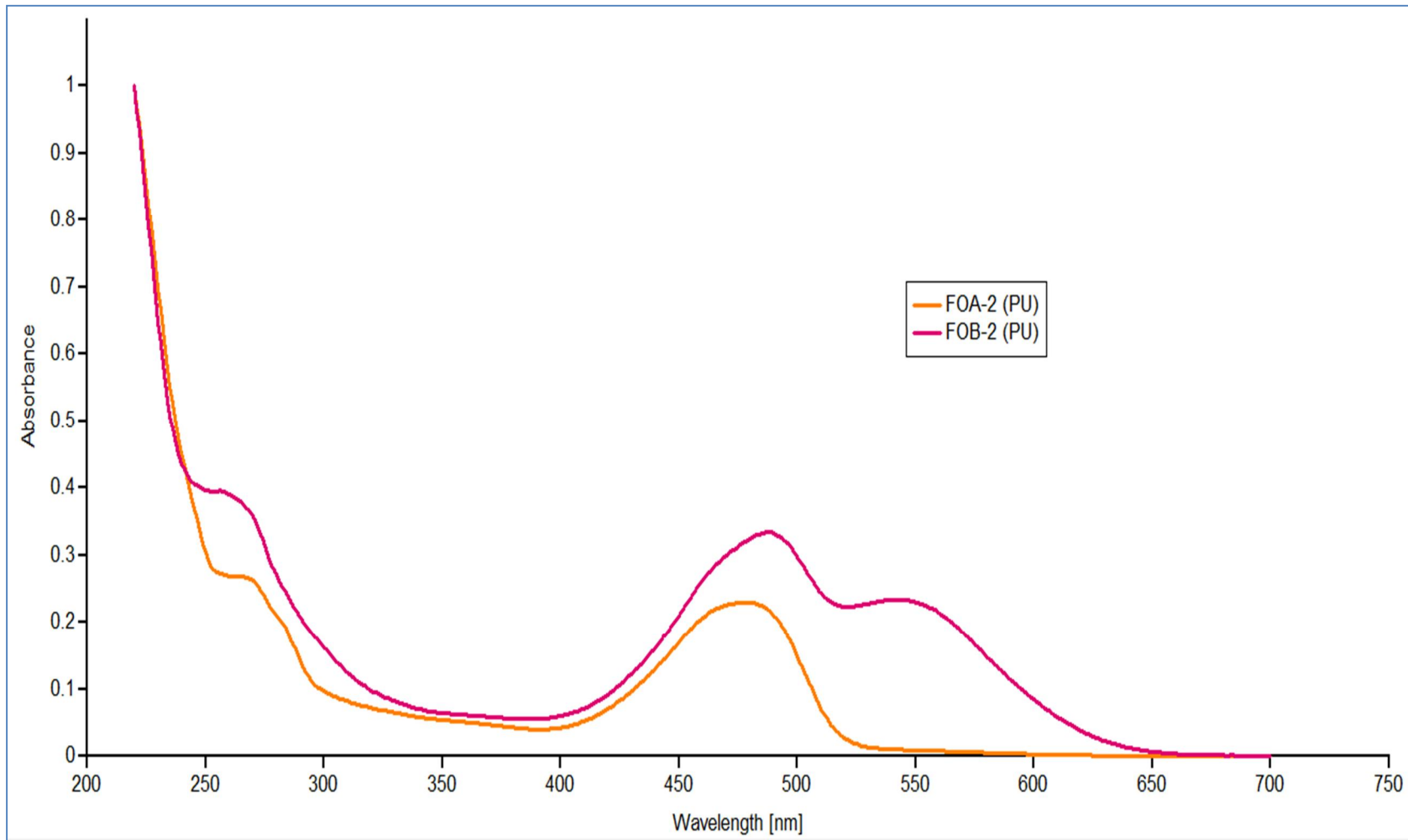


Anexo A.5 Extracto Naranja F.O.E-1 (TI)

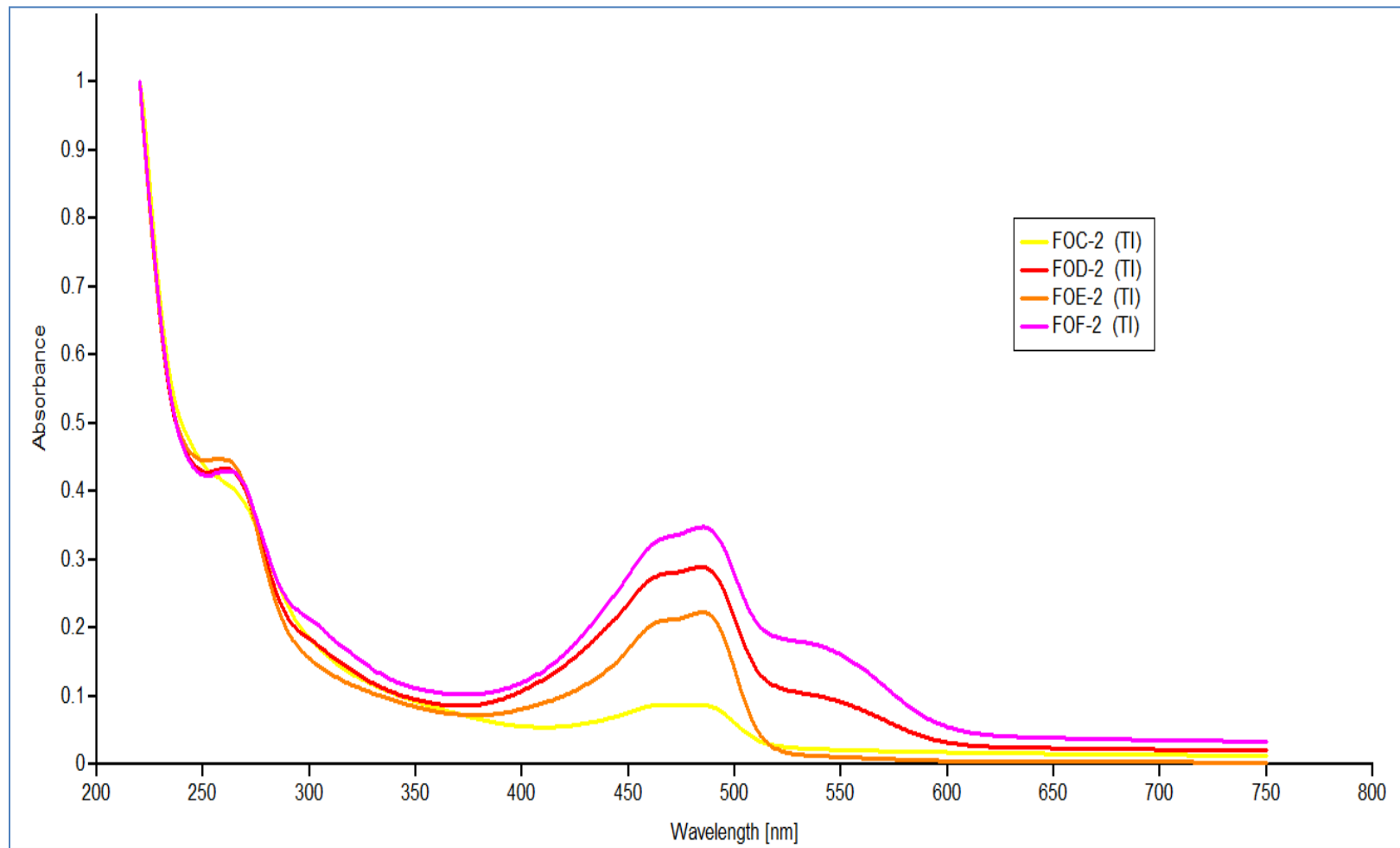


Anexo A.6 Extracto Guinda F.O.F-1 (TI)

ANEXO B. Espectros UV-Vis: Separación con 1-pentanol

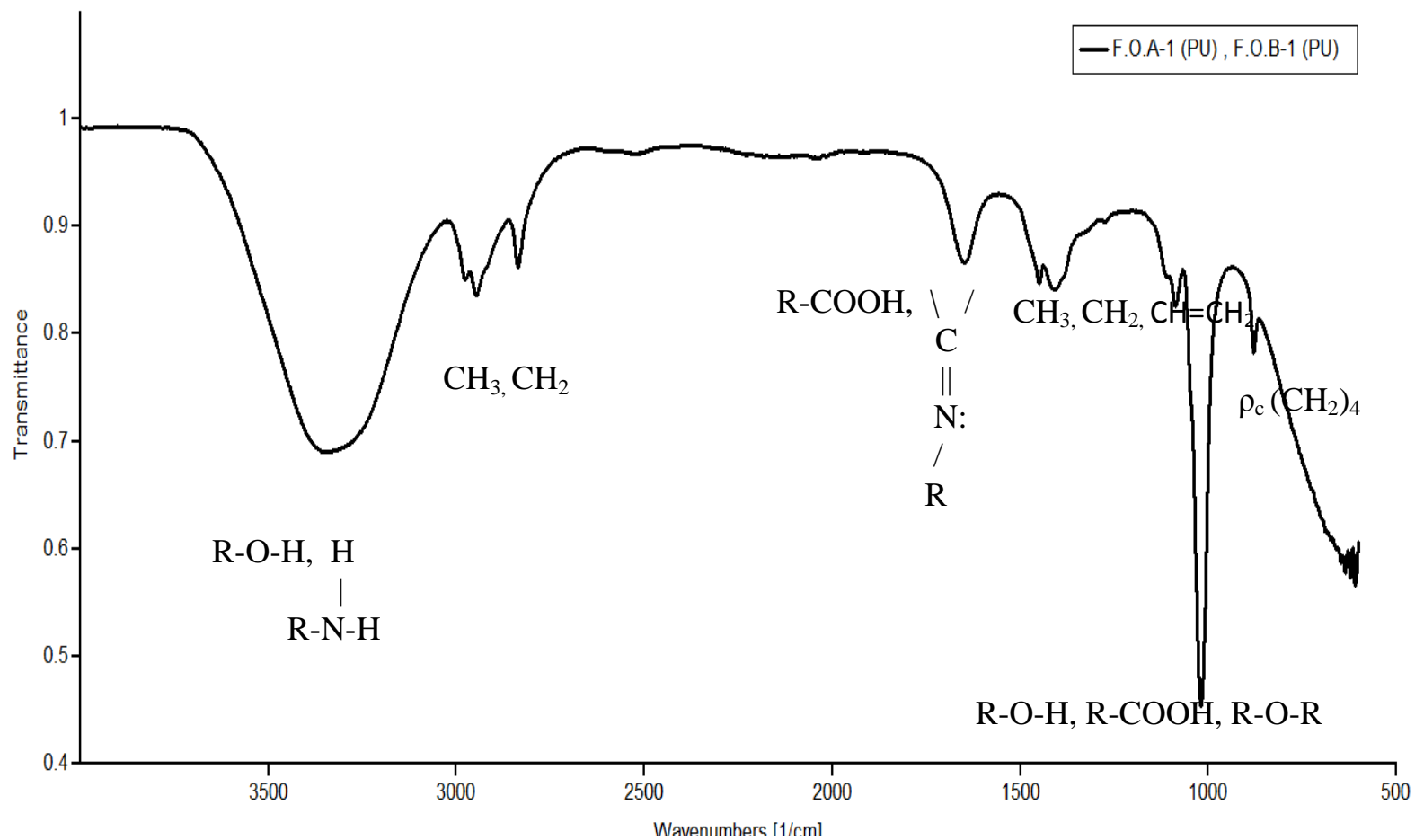


Anexo B.1 Fase de Color: Naranja F.O.A-2 (Pu) y Guinda F.O.B-2 (Pu)

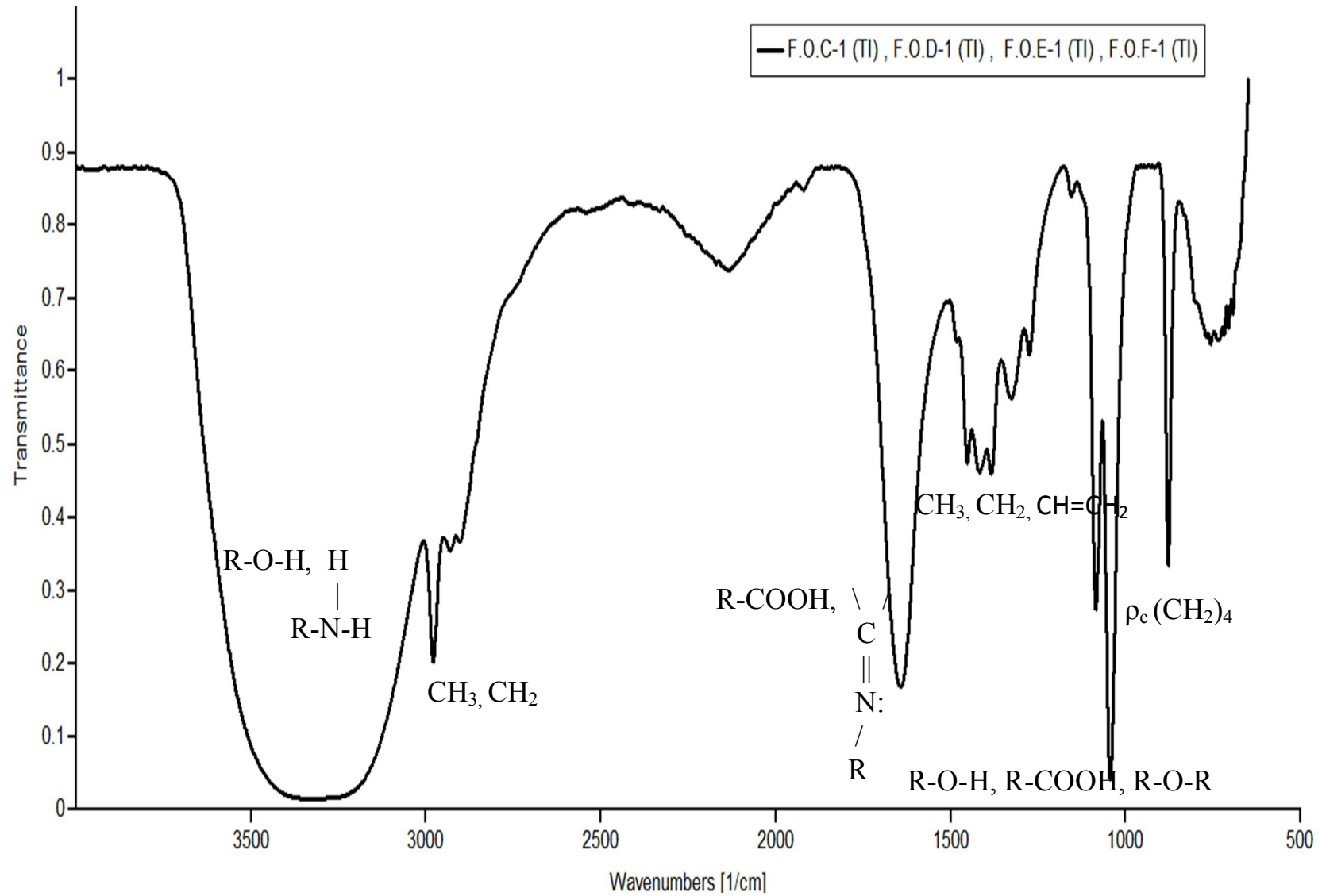


Anexo B.2 Fase de color: Amarillo F.O.C-2 (TI), Rojo F.O.D-2 (TI), Naranja F.O.E-2 (TI) y Guinda F.O.F-2 (TI)

ANEXO C: ESPECTROS IR-FT- Extractos Orgánicos Totales (EOT)

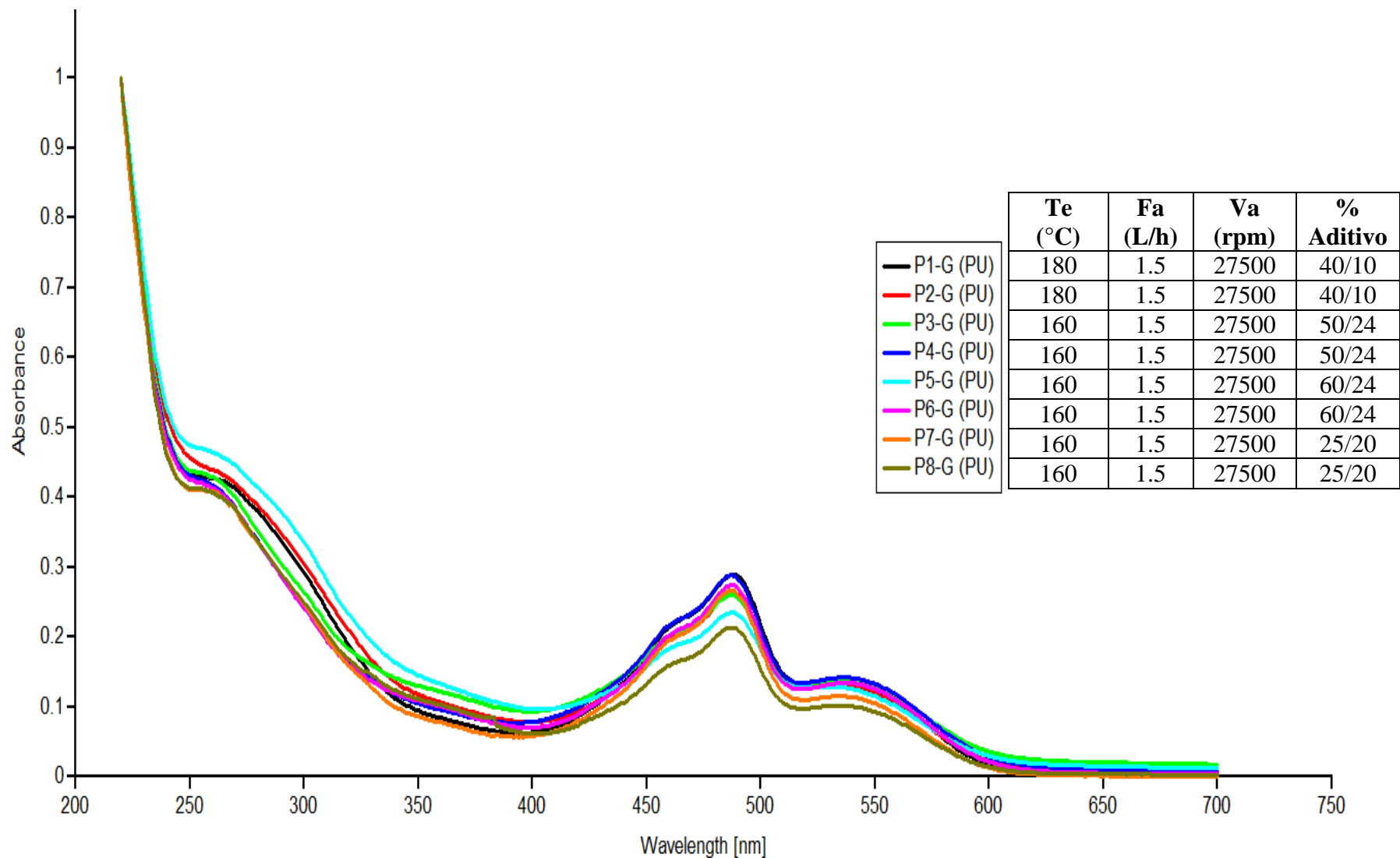


Anexo C.1 Extracto: Naranja F.O.A-1 (Pu) y Guinda F.O.B-1 (Pu)

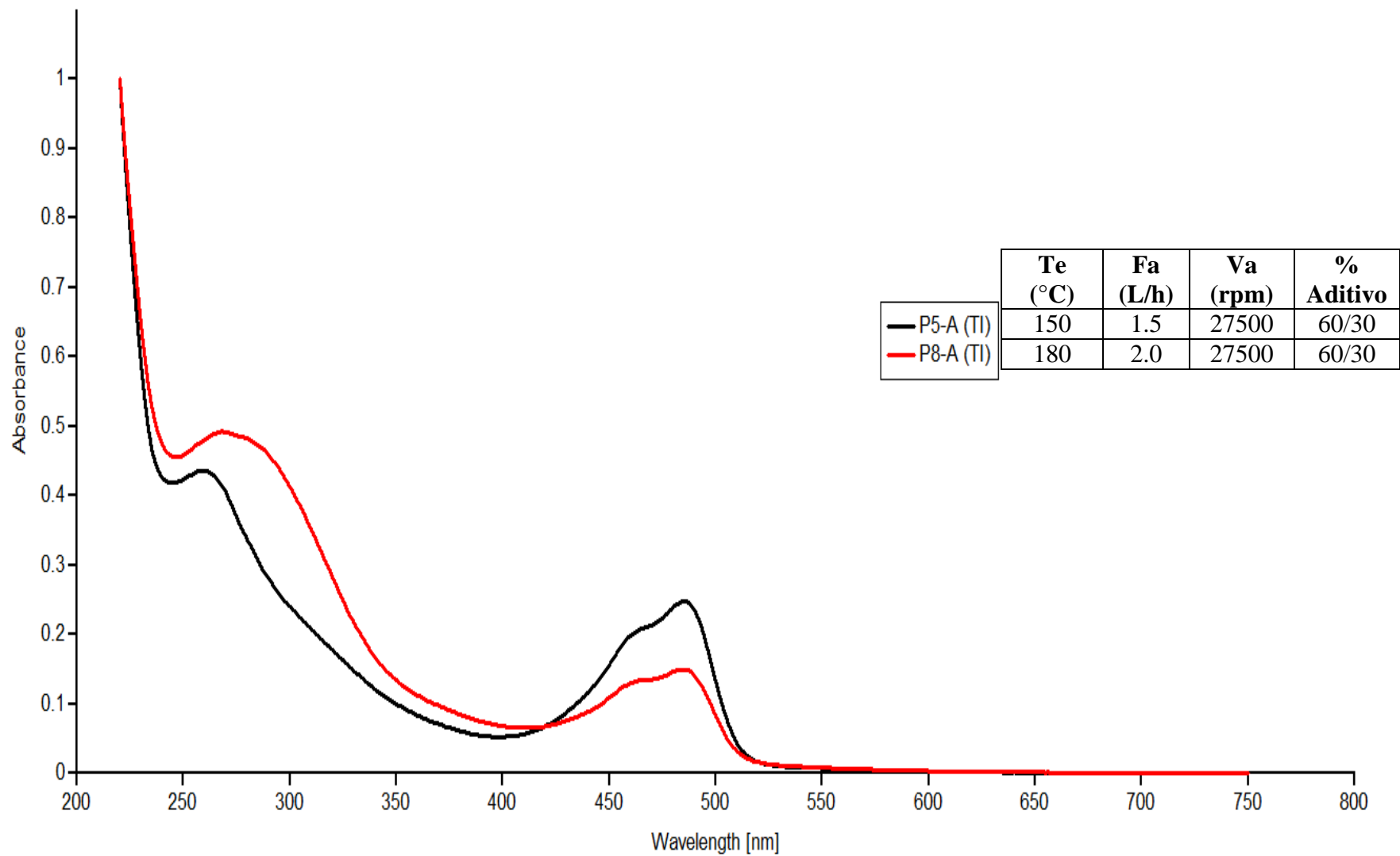


Anexo C.2. Extracto: Amarillo F.O.C-1 (TI), Rojo F.O.D-1 (TI), Naranja F.O.E.-1 (TI) y Guinda F.O.F-1 (TI)

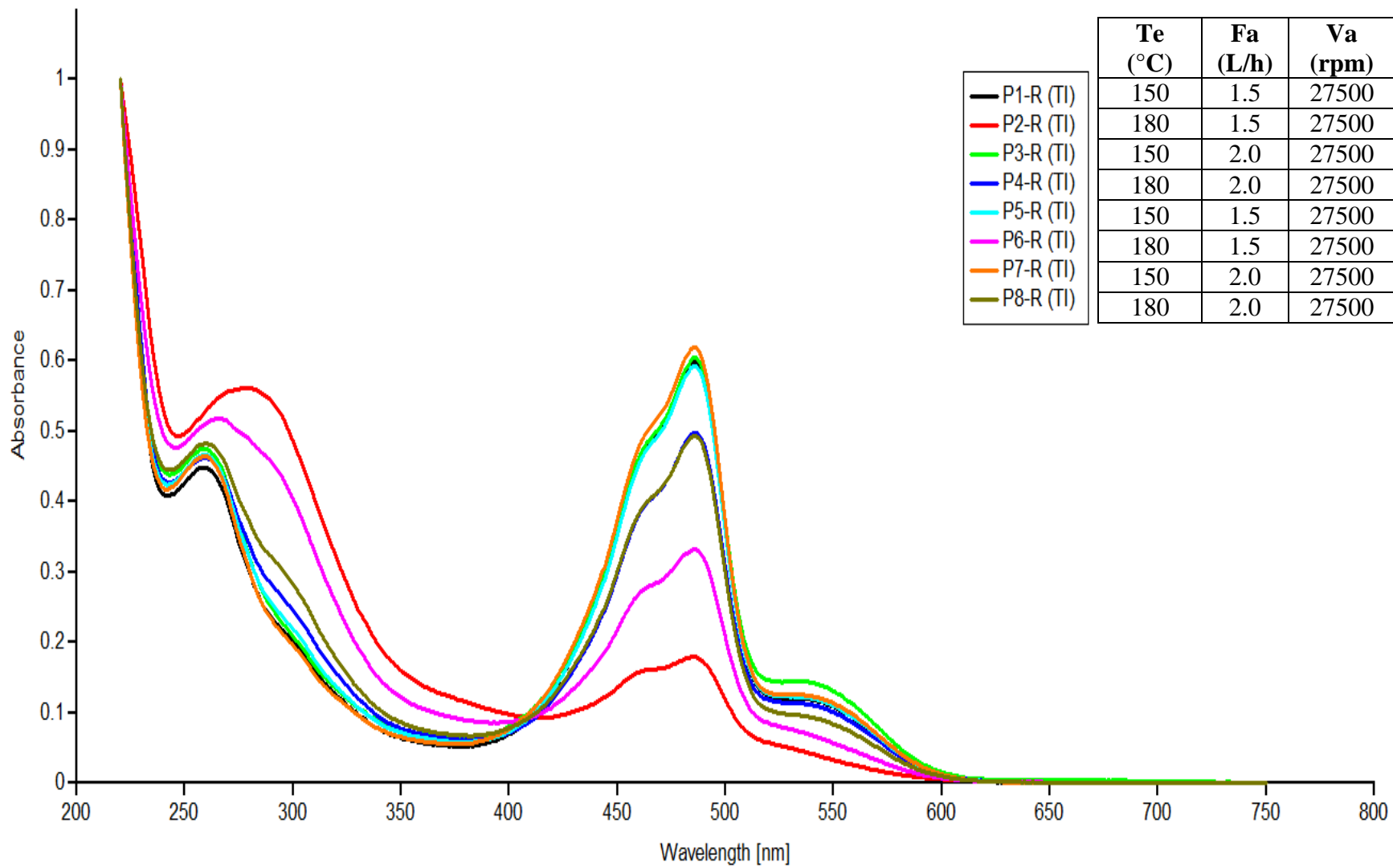
ANEXO D. ESPECTROS UV-Vis: POLVOS DE PITAYA



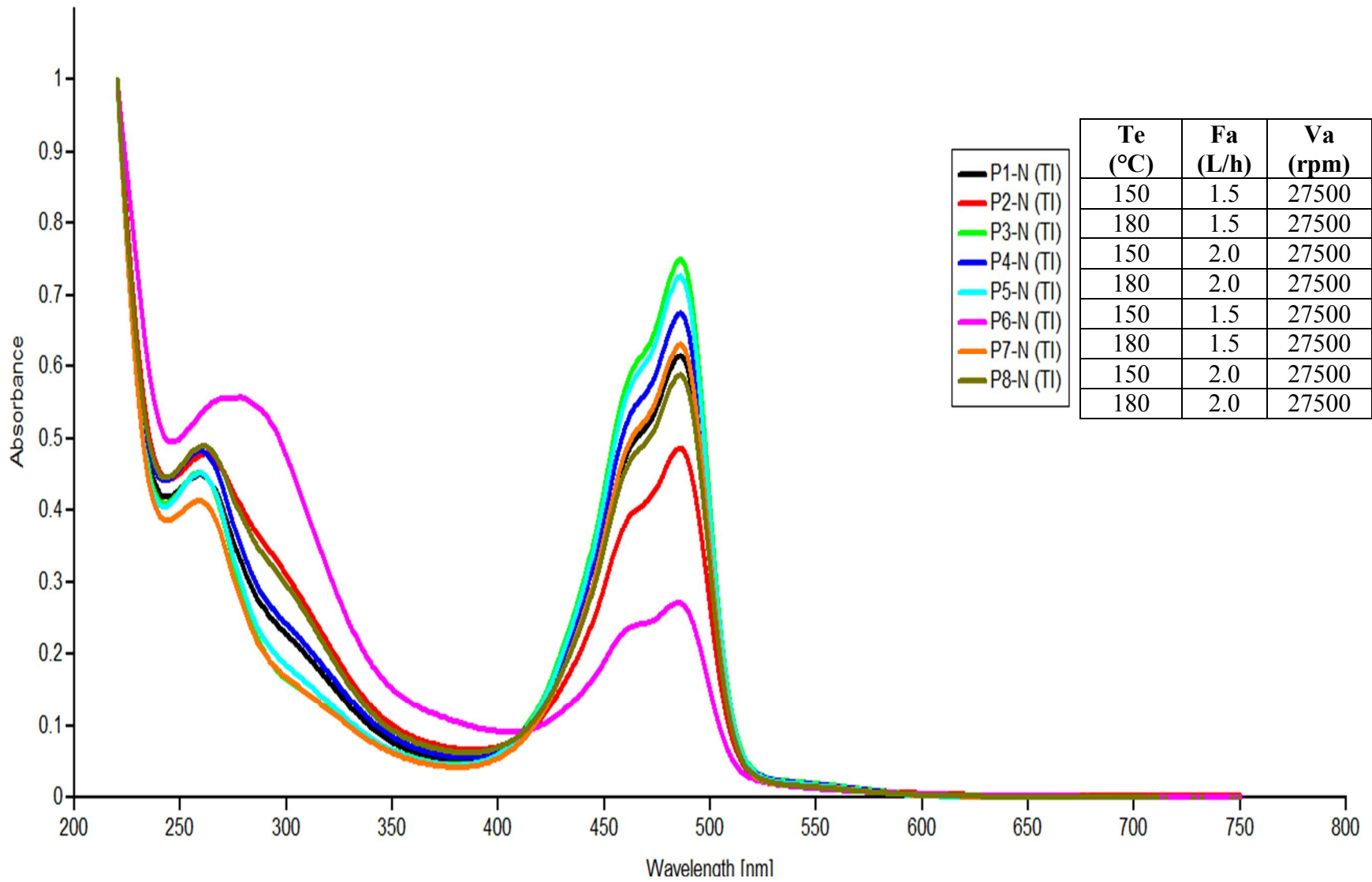
Anexo D.1 Polvo Guinda: P1-G al P8-G (Pu)



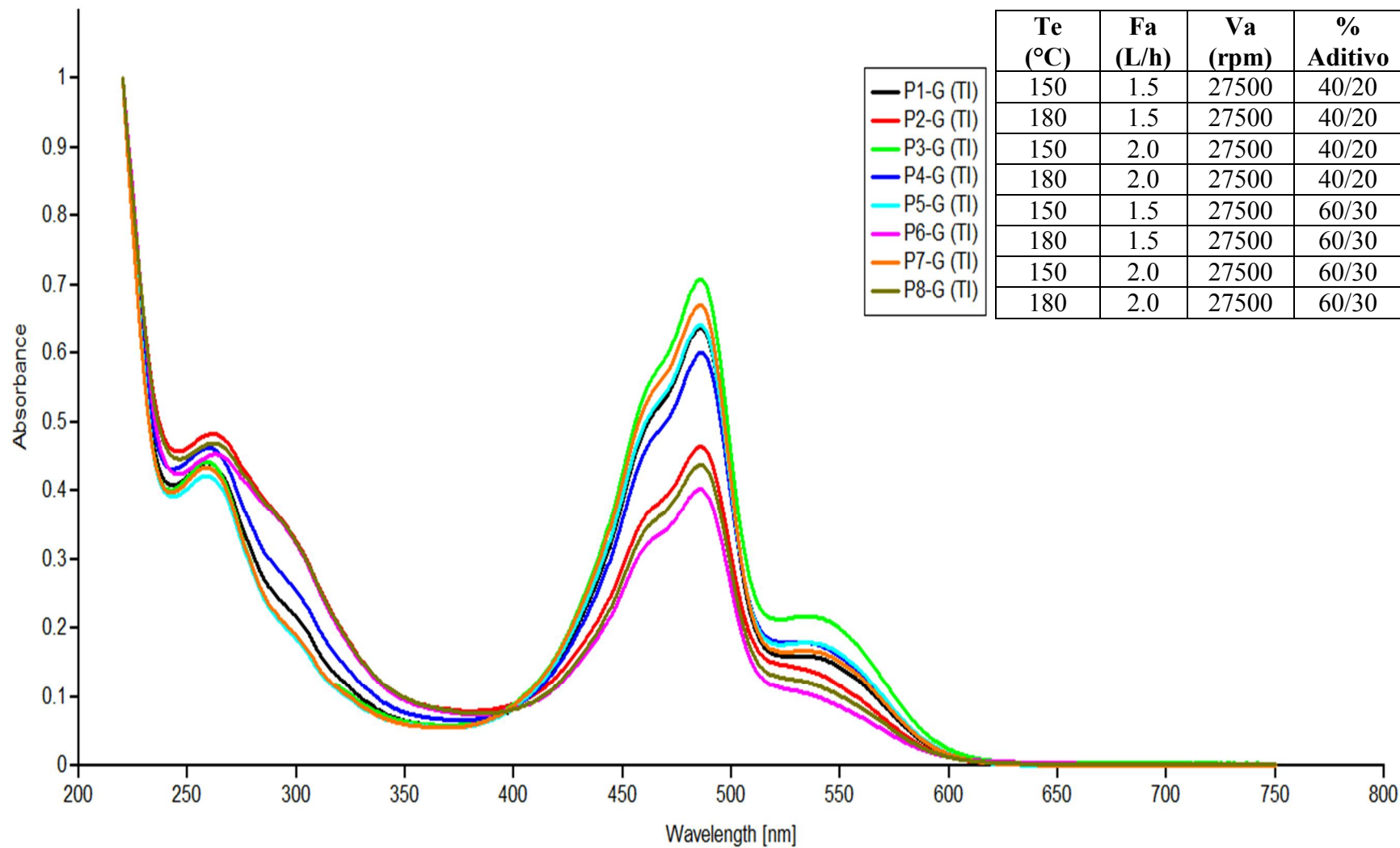
Anexo D.2. Polvo Amarillo: P5-A y P8-A (TI)



Anexo D.3 Polvo Rojo: P1-R al P8-R (TI)

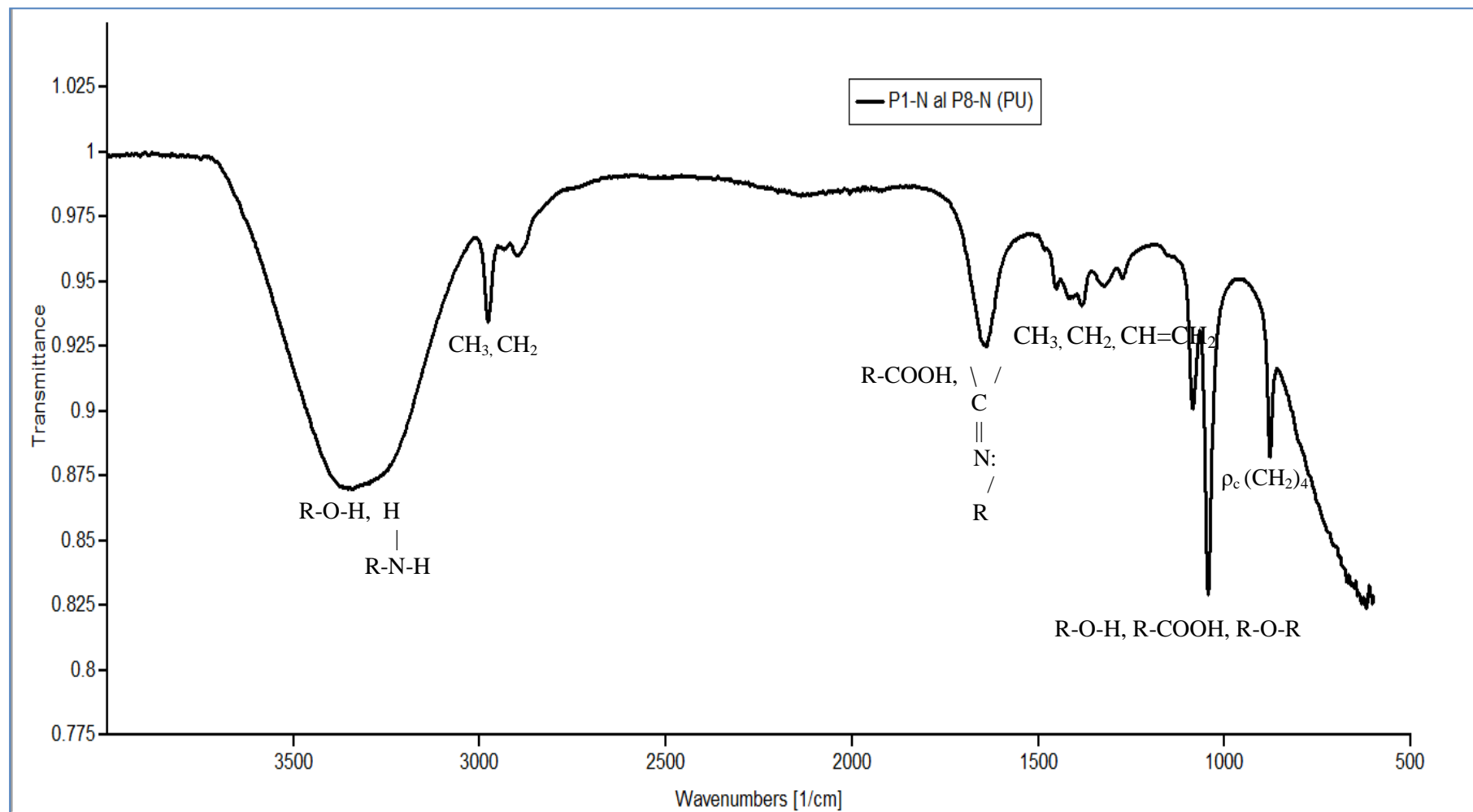


Anexo D.4 Polvo Naranja: P1-N al P8-N (TI)

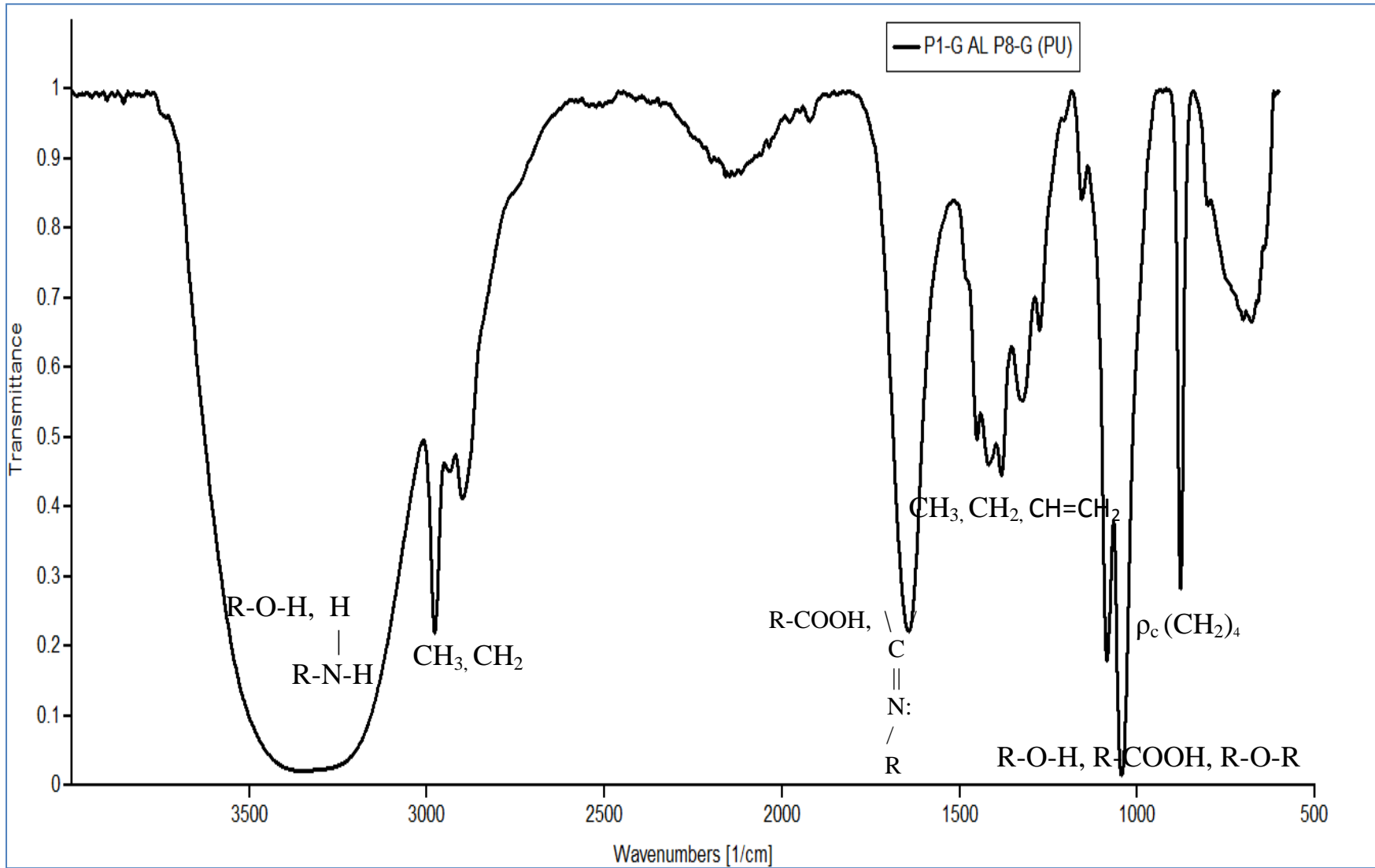


Anexo D.5 Polvo Guinda: P1-G al P8-G (TI)

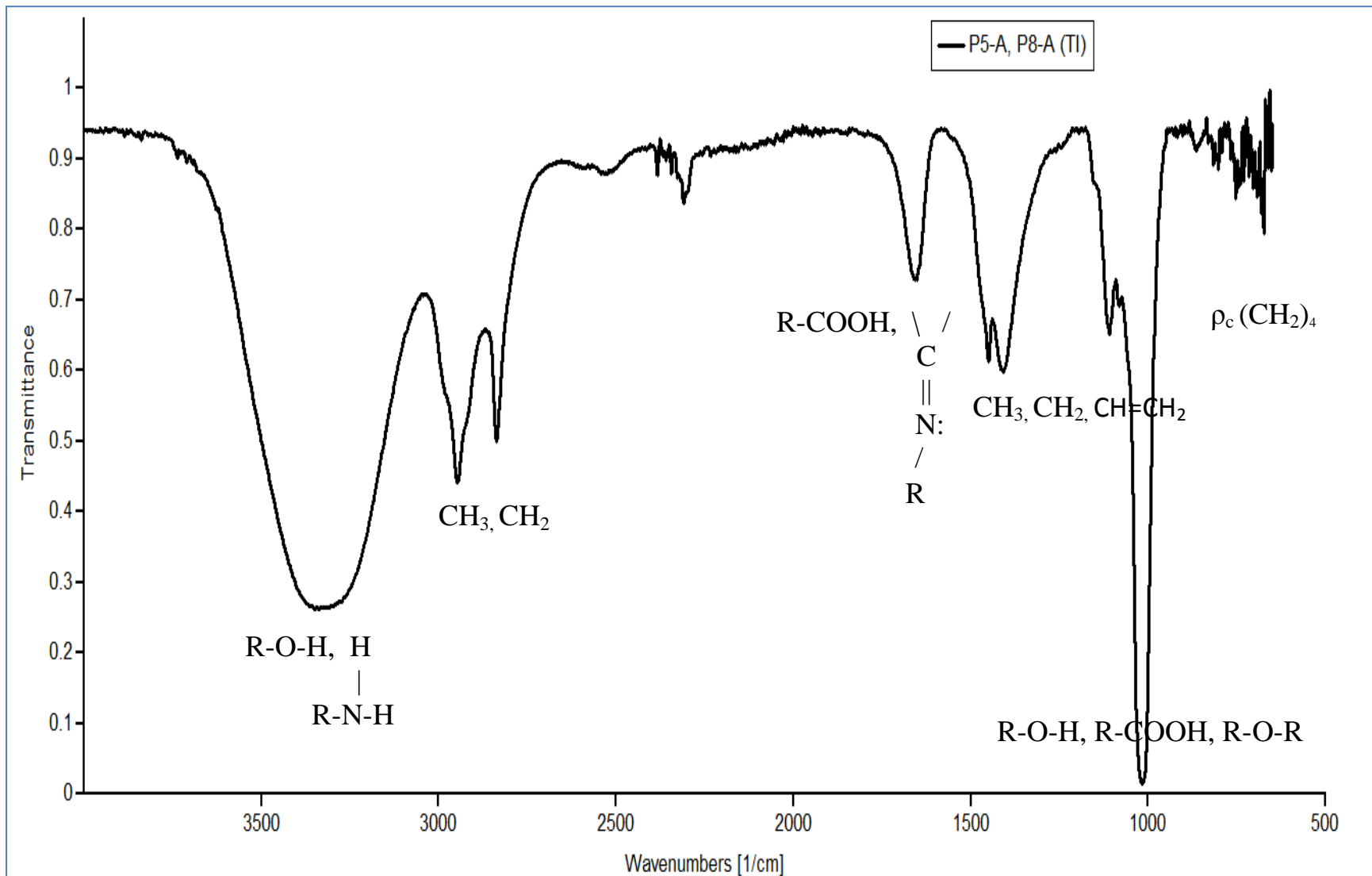
ANEXO E. ESPECTROS IR-FT- POLVOS DE PITAYA



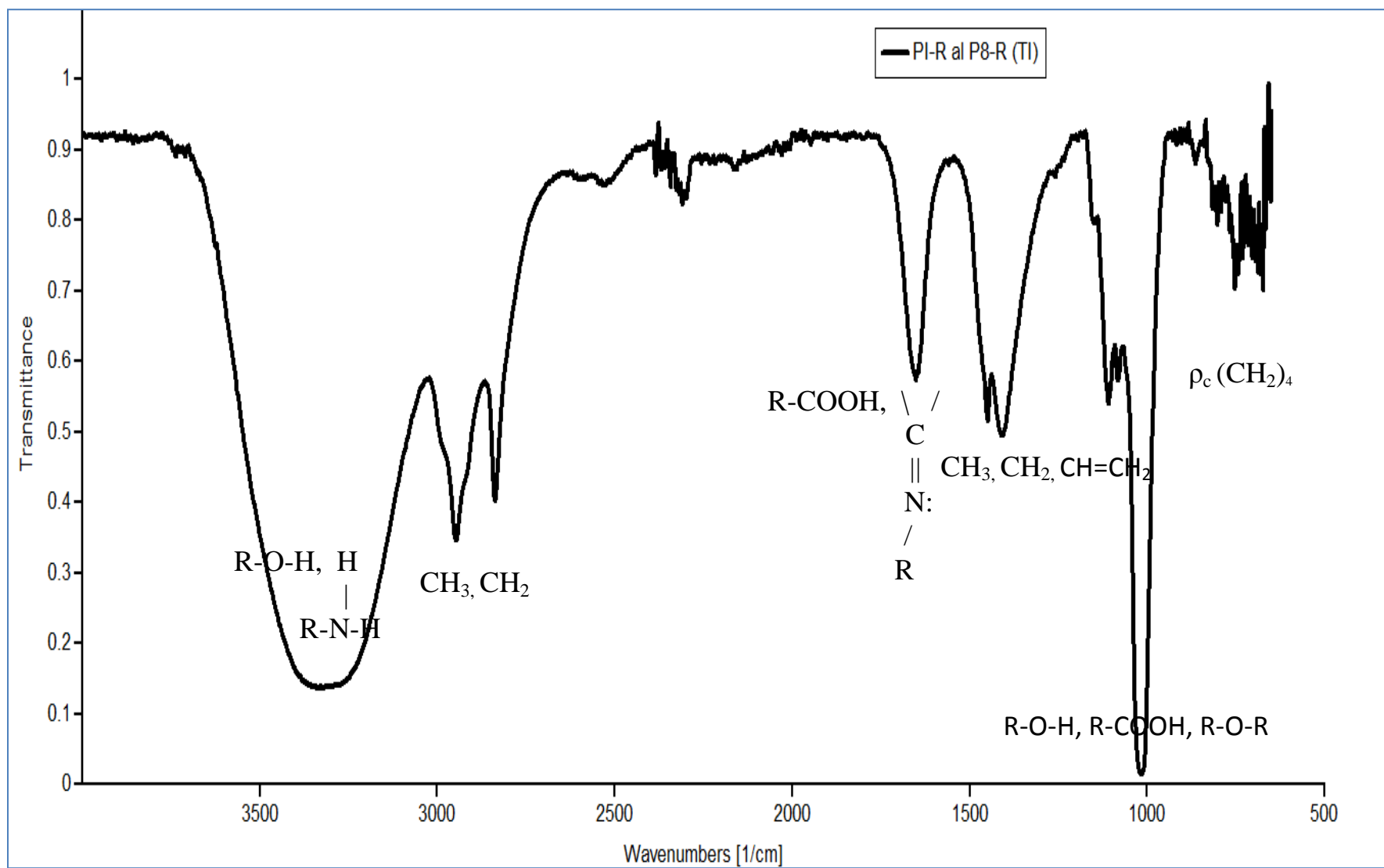
Anexo E.1 Polvo Naranja: P1-N al P8-N (Pu)



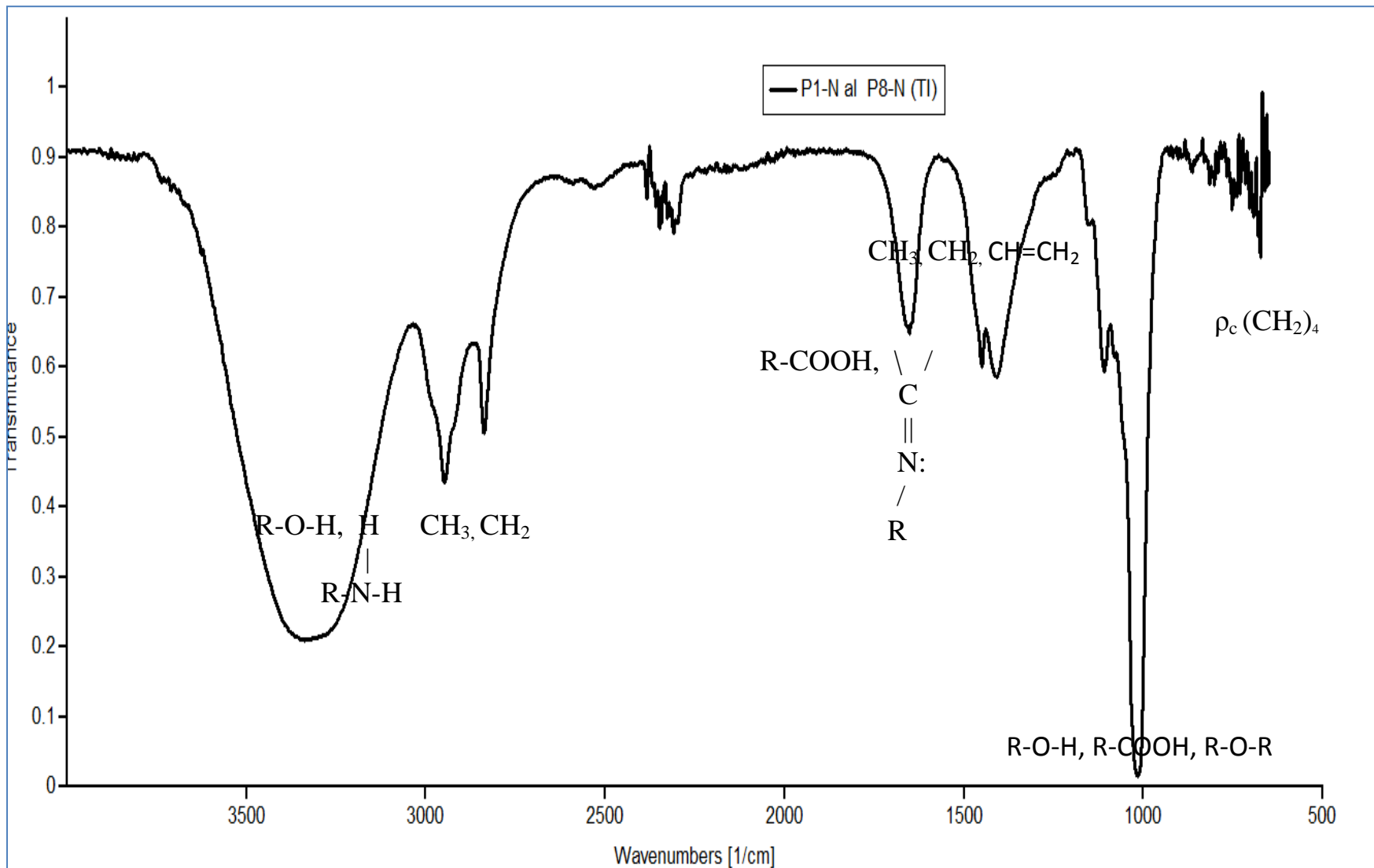
Anexo E.2 Polvo Guinda: P1-G al P8-G (Pu)



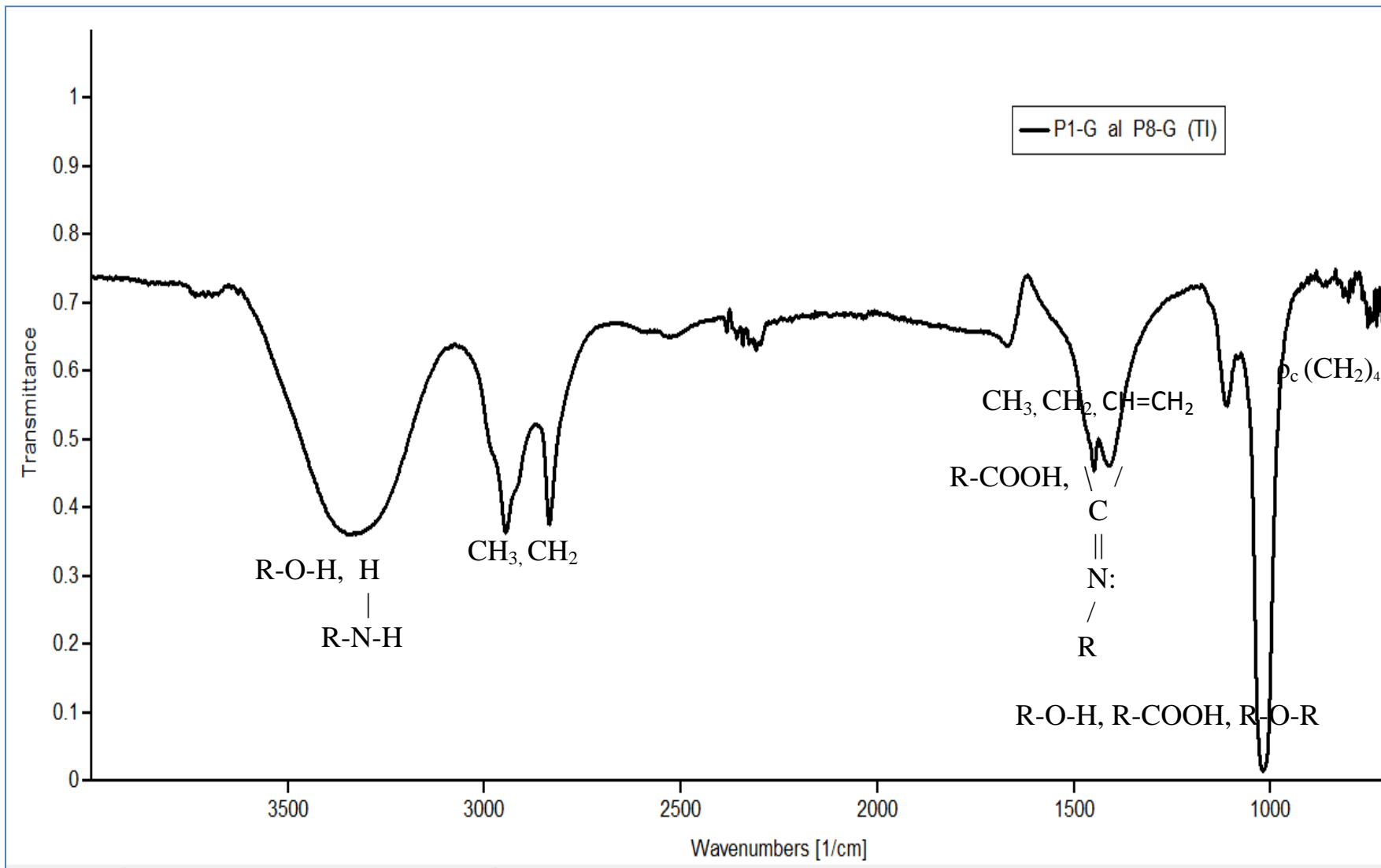
Anexo E.3 Polvo Amarillo: P5-A, P8-A (TI)



Anexo E.4 Polvo Rojo: P1-R al P8-R (TI)

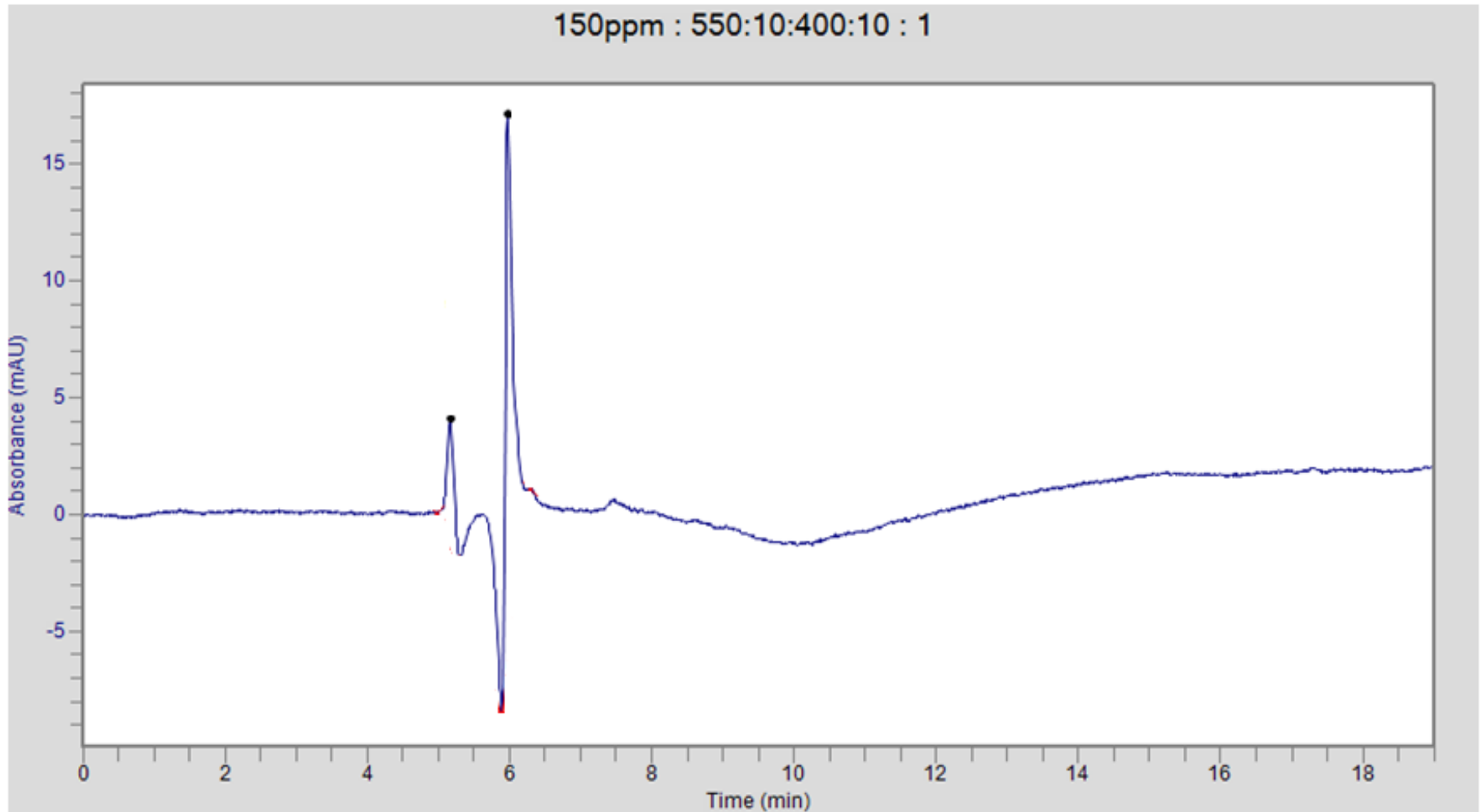


Anexo E.5 Polvo Naranja: P1-N al P8-N (TI)

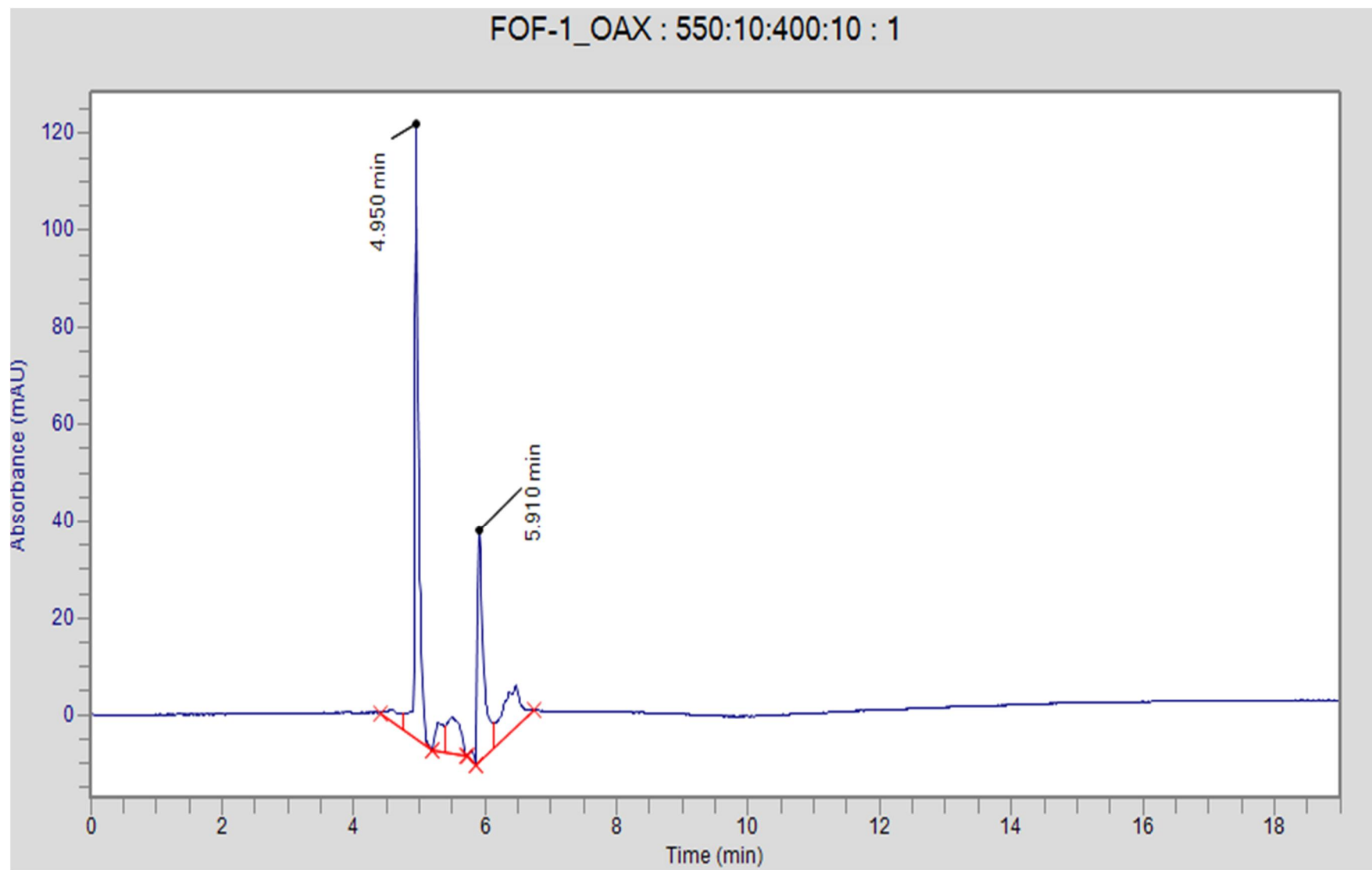


Anexo E.6 Polvo Guinda: P1-G al P8-G (TI)

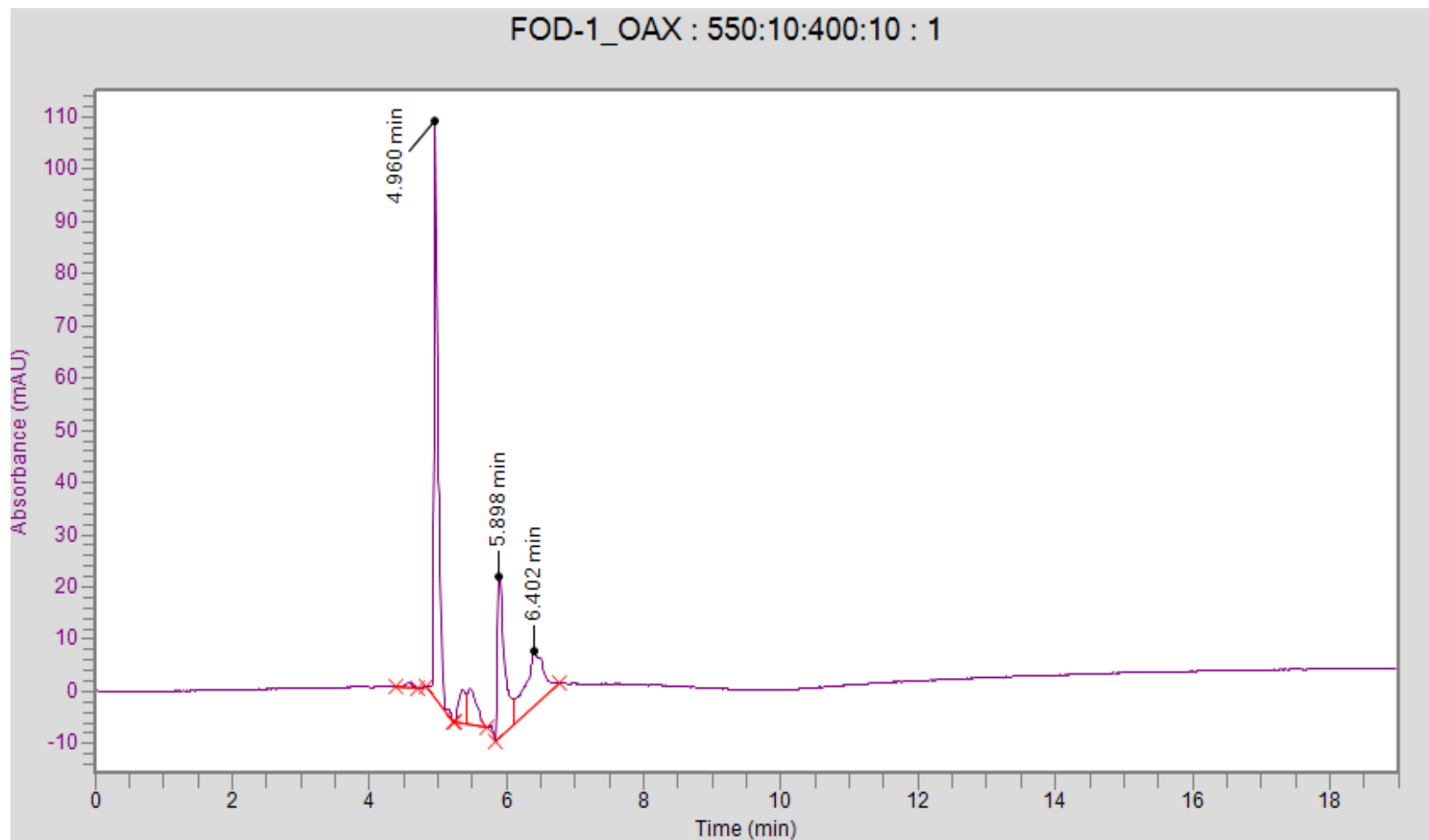
ANEXO F. CROMATOGRAMAS DE HPLC



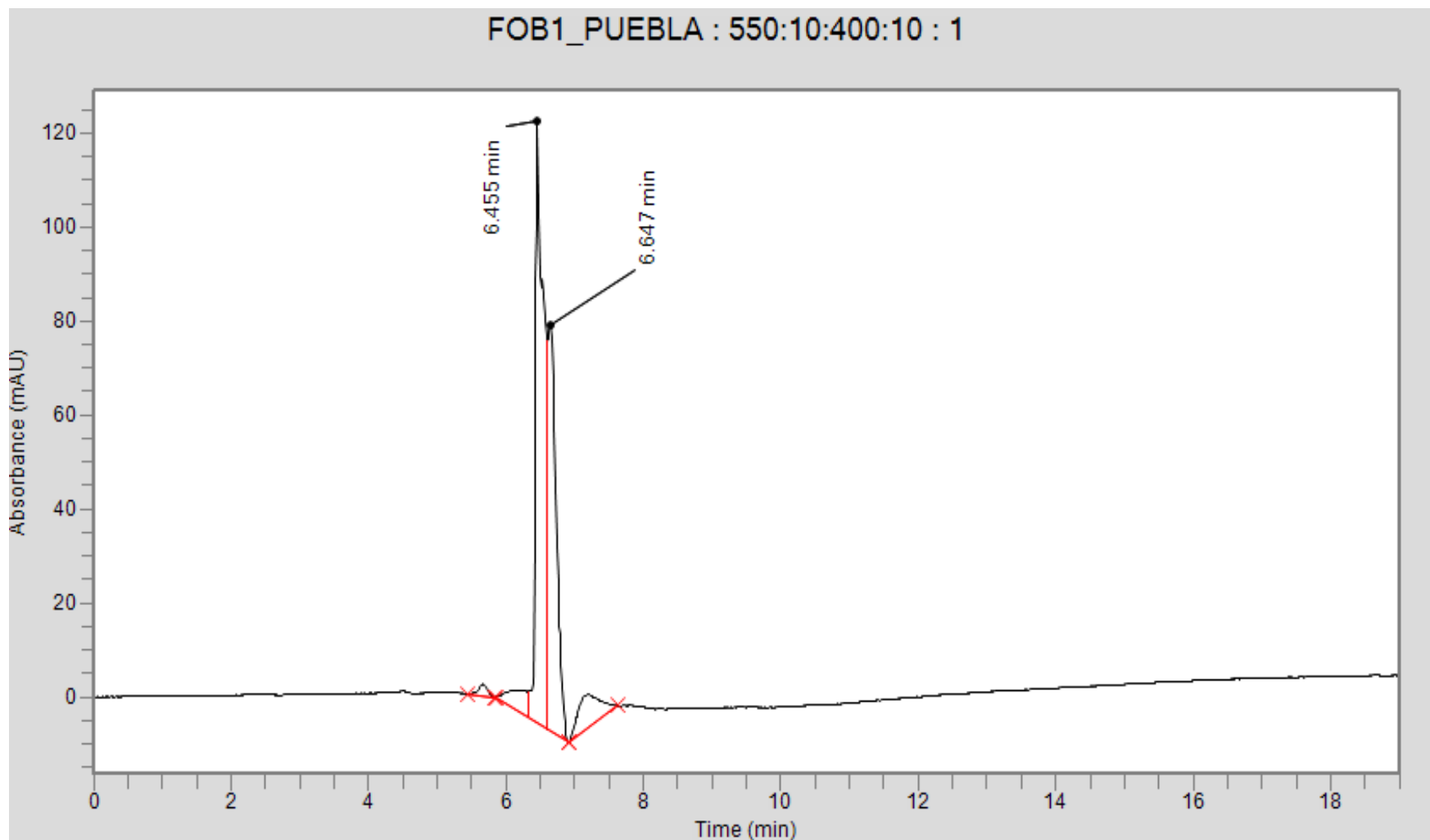
Anexo F.1 Cromatograma de HPLC, pico y T_R del estándar betanina a los 6.0 min



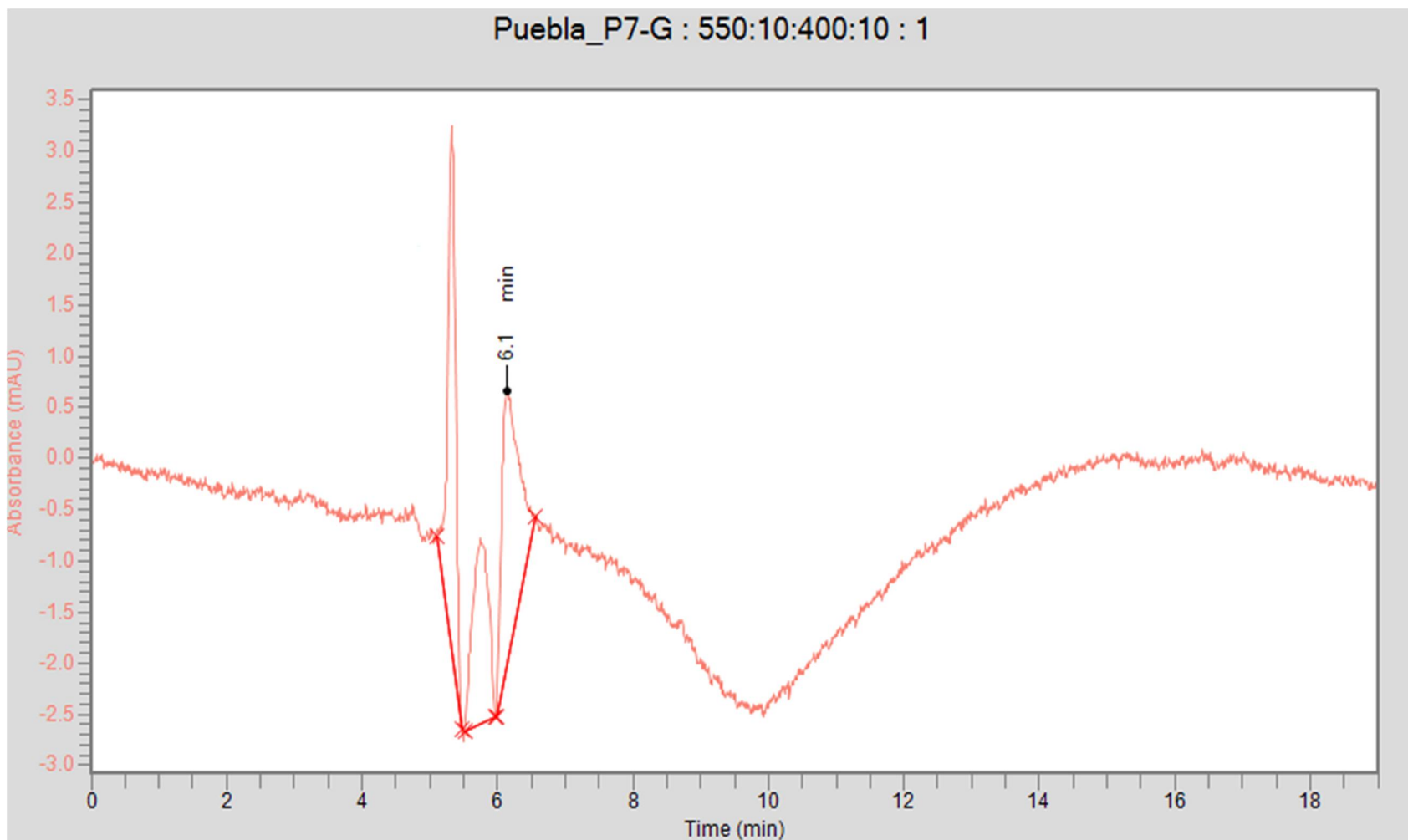
Anexo F.2 Cromatograma de HPLC, pico y T_R del extracto guinda FOF-1(TI) a los 5.9min



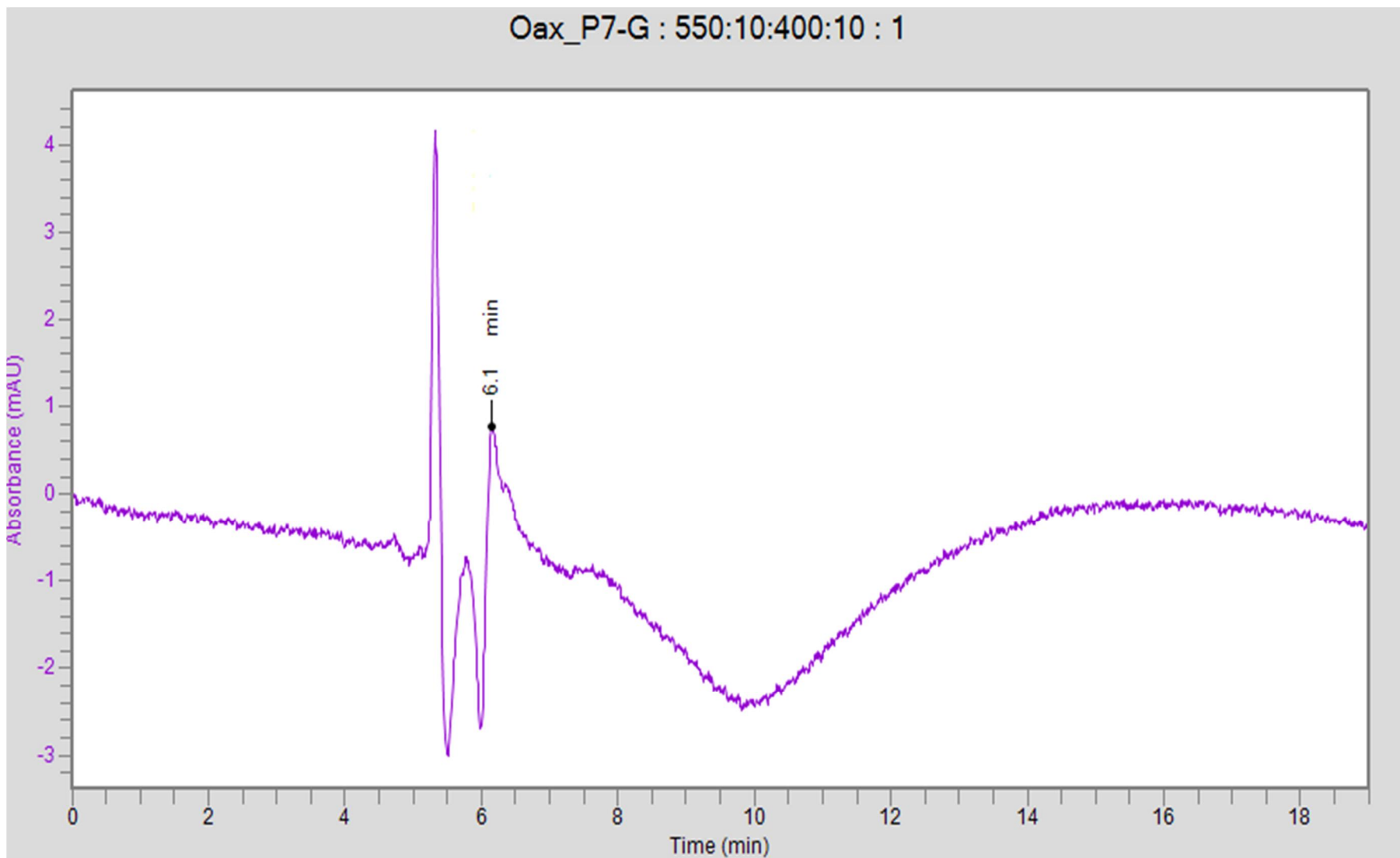
Anexo F.3 Cromatograma de HPLC, pico y T_R de extracto rojo F.O.D-1(TI) a los 5.9min



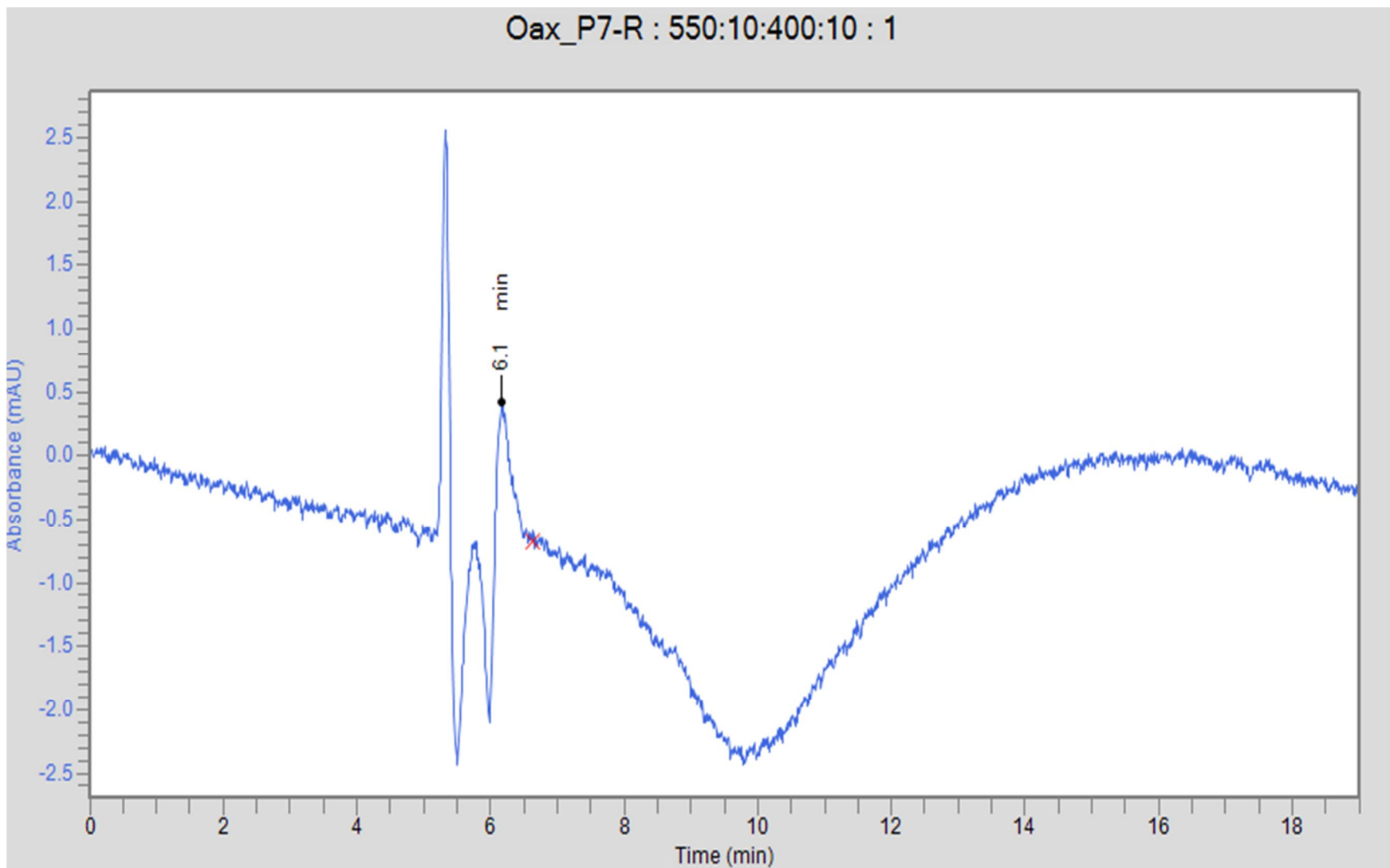
Anexo F.4 Cromatograma de HPLC pico y T_R del extracto guinda F.O.B-1 (PU) a los 6.5min



Anexo F.5 Cromatograma de HPLC pico y T_R de los polvos de color guinda (Pu) a los 6.1 min.



Anexo F.6 Cromatograma de HPLC pico y T_R de los polvos de color guinda (TI) a los 6.1 min.



Anexo F.7 Cromatograma de HPLC pico y T_R de los polvos rojos (TI) a los 6.1 min.

ANEXO G: TABLAS DE CONCENTRACIÓN DE BETANINA EN POLVOS

Polvo	Te (°C)	Fa (L/h)	Va (rpm)	% Aditivo	Betanina (ppm _{betanina} /g pulpa seca)
P1-G (Pu)	180	1.5	27500	40/10	2350.0
P2-G (Pu)	180	1.5	27500	40/10	1939.0
P3-G (Pu)	160	1.5	27500	50/24	3136.8
P4-G (Pu)	160	1.5	27500	50/24	2741.8
P5-G (Pu)	160	1.5	27500	60/24	3142.7
P6-G (Pu)	160	1.5	27500	60/24	3241.7
P7-G (Pu)	160	1.5	27500	25/20	855.9
P8-G (Pu)	160	1.5	27500	25/20	1641.3

ANEXO G.1 Concentración de betanina en polvos guinda (Pu)

Polvo	Te (°C)	Fa (L/h)	Va (rpm)	% Aditivo	Betanina (ppm _{betanina} /g pulpa seca)
P1-G (TI)	150	1.5	27500	40/20	2302.4
P2-G (TI)	180	1.5	27500	40/20	1904.6
P3-G (TI)	150	2	27500	40/20	2812.9
P4-G (TI)	180	2	27500	40/20	2508.3
P5-G (TI)	150	1.5	27500	60/30	3400.0
P6-G (TI)	180	1.5	27500	60/30	2795.6
P7-G (TI)	150	2	27500	60/30	3365.3
P8-G (TI)	180	2	27500	60/30	2962.4

ANEXO G.2 Concentración de betanina en polvos guinda (TI)

Polvo	Te (°C)	Fa (L/h)	Va (rpm)	% Aditivo	Betanina (ppm _{betanina} /g pulpa seca)
P1-R (TI)	150	1.5	27500	40/20	2565.5
P2-R (TI)	180	1.5	27500	40/20	2075.5
P3-R (TI)	150	2	27500	40/20	2208.7
P4-R (TI)	180	2	27500	40/20	2353.2
P5-R (TI)	150	1.5	27500	60/30	2932.8
P6-R (TI)	180	1.5	27500	60/30	2482.4
P7-R (TI)	150	2	27500	60/30	2731.1
P8-R (TI)	180	2	27500	60/30	2507.4

Anexo G.3 Concentración de betanina en polvos rojos (TI)