



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA

“ESTUDIO PRELIMINAR DE LOS PIGMENTOS PRESENTES EN CÁSCARA DE PITAYA (*Stenocereus stellatus*) DE LA REGIÓN MIXTECA”

TESIS:

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

REYNOLDS RICARDO MANDUJANO RUIZ

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. PAULA CECILIA GUADARRAMA MENDOZA

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. FEBRERO DE 2006.

RESUMEN.

Actualmente la tendencia hacia el consumo de productos naturales y las restricciones impuestas por organismos como la FDA (Food and drug administration) en E.U. y la comunidad europea hacia los aditivos alimentarios ha provocado retomar el uso de aditivos naturales. Dentro de los aditivos de mayor importancia se encuentran los colorantes. Los colorantes artificiales están restringidos principalmente porque se han detectado propiedades mutagénicas y teratogénicas, dentro de éstos los rojos son los más restringidos. Una de las alternativas para sustituir el rojo # 40 y rojo # 2 es el pigmento proveniente de la cáscara de la pitaya (*Stenocereus stellatus*). El pigmento pertenece a la familia de las betalaínas, las cuales son hidrosolubles. Para la obtención del pigmento se probaron varios disolventes (agua, metanol al 80%, etanol al 96%, éter de petróleo y una mezcla de alcohol potásico al 20% con metanol [4:1] y éter de petróleo [1:2]). El metanol al 80% fue el mejor disolvente para la extracción ya que al mismo tiempo separó a la pectina del extracto, lo que no ocurrió con los otros. Como las betalaínas están compuestas por dos tipos de pigmentos, betacianinas (moradas) y betaxantinas (amarillas), hubo la necesidad de separarlos por cromatografía en columna, donde se observaron tres fracciones: moradas (betalaínas), rojas (mezcla de betalaínas y betaxantinas) y amarillas (betaxantinas). Estas fracciones fueron purificadas tres veces en la columna cromatográfica. Al leer en el espectrofotómetro a 538 nm para betacianinas y 474 nm para betaxantinas y cuantificar por el método de Yizhong (1998 y 2001) se observó que hay una mayor cantidad de betaxantinas a betalaínas en un porcentaje aproximadamente del 10 a 20%. Se evaluó la estabilidad del pigmento con tres factores: pH (valores de 4, 5 y 6), temperatura (4, 25 y 68 °C) y luz (presencia u oscuridad). La variable de respuesta que se usó fue el porcentaje de retención del pigmento utilizando la medición de la absorbancia (a 538 nm para betacianinas y 474 nm para betaxantinas). Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis factorial 3*3*2 donde se determinó qué factores degradaron el pigmento para un nivel de significancia de 0.95. El extracto fue más estable en las condiciones de 4 °C, un pH de 5 y en oscuridad.

DEDICATORIAS.

A mi madre Vicenta Ruiz Gómez, mi abuela Teodula Gómez Lucho, mi padre Reynolds Mandujano Barrios y a mis tíos porque sin su apoyo no hubiese podido concluir este trabajo ni todas las metas que me he propuesto; sin ustedes no sería el hombre de bien y el profesionalista que soy.

Gracias por todo su apoyo y valores que me han inculcado.

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo de investigación y la satisfacción de ser un profesionista no hubiera sido posible sin el apoyo de muchas personas e instituciones, ya que este trabajo se realizó en las instalaciones de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca (UTM) y en los laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco (CIATEJ).

A mi asesora de tesis la M.C. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza, quien estuvo conmigo en esos momentos en los cuales las cosas no salen como uno deseaba y me aconsejaba de la mejor manera posible, por su apoyo, confianza, dedicación y amistad.

A mi asesora externa de tesis la Dra. Eugenia del Carmen Lugo Cervantes del CIATEJ por orientarme a lo largo del trabajo, por sus consejos, sus críticas, experiencias, conocimientos, por su ayuda y por su valiosa colaboración en este proyecto.

Al personal de la carrera de Ingeniería en Alimentos, técnicos y profesores por brindarme su apoyo en la realización de esta tesis.

A los profesores, Dr. Mario Sánchez Vázquez, M.C. Jesús G. López Luna y al M.C. Vania S. Robles González, por sus críticas y consejos para hacer de este un mejor trabajo.

Gracias a la Universidad Tecnológica de la Mixteca por otorgarme una beca y por darme la oportunidad de desarrollarme profesional y mentalmente.

A mis compañeras Alejandra, Balbina, Eliane, Kena y Jessica quienes siempre han estado conmigo brindándome su ayuda, consejos, amistad y cariño.

A mis padres quienes siempre estuvieron apoyándome en todos los aspectos de mi vida.

A mis familiares y numerosos amigos que me ofrecieron ayuda, orientación y su amistad en todo momento por este largo proceso.

ÍNDICE.

	Página.
Resumen.	iii
Dedicatorias.	iv
Agradecimientos.	v
Índice de Figuras.	ix
Índice de Tablas.	x
Lista de abreviaturas.	xi
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	3
2.1 Familia de las cactáceas.	3
2.2 Descripción de la planta.	4
2.2.1 Taxonomía y características morfológicas.	4
2.3 Distribución geográfica.	5
2.4 Composición química.	7
2.4.1 Pigmentos.	7
2.4.2 Alcaloides.	7
2.4.3 Triterpenos y esteroides.	7
2.4.4 Mucílago y látex.	8
2.4.5 Proteínas de inclusión en elementos tubulares.	8
2.4.6 Cristales.	8
2.5 Utilidad de las cactáceas.	9
2.6 Pitaya.	9
2.6.1 Descripción.	9
2.6.2 Composición del fruto.	10
2.6.3 Producción actual y usos del fruto.	11
2.7 Uso de las cactáceas para la obtención de colorantes.	11
2.8 Definición de colorante.	12
2.9 Clasificación de colorantes.	13
2.9.1 Colorantes naturales.	14
2.9.2 Colorantes artificiales.	14

2.10 Fuentes de colorantes naturales y aplicaciones.	15
2.11 Principales pigmentos de origen vegetal.	16
2.11.1 Carotenoides.	16
2.11.2 Clorofilas.	17
2.11.3 Antocianinas.	18
2.11.4 Flavonoides.	19
2.11.5 Betalaínas.	19
2.11.5.1 Betacianinas.	21
2.11.5.2 Betaxantinas.	22
2.12 Conversión de betacianinas a betaxantinas.	23
2.13 Degradación de betalaínas.	24
2.13.1 Calor y/o acidez.	24
2.13.2 Efecto del oxígeno y del pH.	26
2.13.3 Efecto de cationes metálicos.	27
2.13.4 Efecto de antioxidantes.	27
2.13.5 Efecto de secuestrantes.	28
2.13.6 Efecto de actividad de agua.	28
2.13.7 Efecto de la luz.	29
2.13.8 Efecto de enzimas.	29
2.14 Betalaínas como aditivo alimentario.	29
3. OBJETIVOS.	31
3.1 Objetivo general.	31
3.2 Objetivos específicos.	31
4. METODOLOGÍA.	32
4.1 Material biológico y preparación de la muestra.	32
4.2 Extracción del pigmento.	32
4.3 Separación y purificación parcial del extracto.	34
4.4 Identificación parcial del pigmento de la cáscara de pitaya.	34
4.5 Cuantificación del pigmento de la cáscara de pitaya.	35
4.6 Estudio de estabilidad.	36
4.7 Análisis estadístico.	38

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	39
5.1 Peso y composición promedio de la pitaya.	39
5.2 Extracción del pigmento.	39
5.3 Separación y purificación del extracto.	42
5.4 identificación parcial del pigmento de la cáscara de pitaya.	44
5.5 Cuantificación del pigmento de la cáscara de pitaya.	46
5.6 Estudio de estabilidad.	47
5.6.1 Efecto de la luz, pH y temperatura sobre el pigmento.	48
5.6.1.1 Efecto de la luz.	48
5.6.1.2 Efecto del pH.	51
5.6.1.3 Efecto de la temperatura.	54
6. CONCLUSIONES.	57
7. PERSPECTIVAS.	58
8. BIBLIOGRAFÍA.	59
ANEXOS.	65

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Página
1.	Planta de pitaya (<i>Stenocereus stellatus</i>) de la Región Mixteca.	5
2.	Distribución geográfica del género <i>Stenocereus</i> en México.	6
3.	Características de la pulpa y color de la pitaya.	9
4.	Estructura química del β -caroteno.	16
5.	Estructuras químicas de la luteína.	17
6.	Estructuras químicas de la clorofila a y b .	18
7.	Estructuras químicas de la pelargonidina.	18
8.	Estructura química de la cianidina.	18
9.	Estructura química del flavonol.	19
10.	Estructura química de la flavona.	19
11.	Estructura general de las betalainas.	20
12.	Estructura del ácido betalámico.	20
13.	Estructura química de la betanina.	22
14.	Estructura de la isobetanina.	22
15.	Estructura de la indicaxantina.	23
16.	Estructura de la miraxantina III y IV.	23
17.	Mecanismo de conversión de betacianinas a betaxantinas.	24
18.	Degradación reversible de la betanina.	25
19.	Diagrama de degradación de la betanina.	26
20.	Fracciones colectadas por cromatografía en columna.	43
21.	Espectro de absorción de la Fracción I (posible betacianinas).	44
22.	Espectro de absorción de la fracción III (posible betaxantinas).	45
23.	Efecto de la luz sobre la estabilidad de las betacianinas.	49
24.	Efecto de la luz sobre la estabilidad de las betaxantinas.	49
25.	Efecto del pH sobre la estabilidad de las betacianinas.	52
26.	Efecto del pH sobre la estabilidad de las betaxantinas.	52
27.	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las betacianinas.	55
28.	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las betaxantinas.	55

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA		Página
1.	Características químicas de los frutos de <i>Stenocereus stellatus</i> .	10
2.	Betalainas presentes en las cactáceas.	20
3.	Disolventes usados en las diferentes extracciones.	33
4.	Códigos para pruebas o tratamientos de estabilidad.	37
5.	Composición promedio de las partes de la pitaya roja (<i>Stenocereus stellatus</i>).	39
6.	Comparación de los diferentes disolventes usados en el proceso de extracción.	41
7.	Concentración promedio de las betalainas en las muestras.	47
8.	Porcentaje de pigmento retenido al final del tratamiento respecto a la luz.	48
9.	ANOVA de la estabilidad del pigmento de cáscara de pitaya en relación a la presencia o ausencia de luz.	50
10.	Porcentaje de pigmento retenido al final del tratamiento respecto al pH.	51
11.	ANOVA de la estabilidad del pigmento de cáscara de pitaya en relación al pH.	53
12.	Porcentaje de pigmento retenido al final del tratamiento respecto a la temperatura.	54
13.	ANOVA de la estabilidad del pigmento de cáscara de pitaya en relación a la temperatura.	56
14.	Porcentaje de pigmento retenido de las betacianinas.	65
15.	Porcentaje de pigmento retenido de las betaxantinas.	66

LISTA DE ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
AA	Ácido ascórbico.
BA	Ácido betalámico.
AC	Ácido cítrico.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraácetico.
AIA	Ácido isoascórbico.
ANOVA	Análisis de varianza.
BHA	Butilhidroxianisol.
BHT	Butilhidroxitolueno.
CDG	Ciclodopa-5-0-glucósido.
cm	Centímetros.
E.U.	Estados Unidos.
Fig.	Figura.
FDA	Food and drug administration.
g	Gramos.
h	Horas.
LOG	Logaritmo.
m	Metros.
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
min	Minutos.
nm	Nanómetros.
N	Normalidad.
ppm	Partes por millón.
pH	Potencial de hidrógeno.
rpm	Revoluciones por minuto.
T	Temperatura.
s	Segundos.

1. INTRODUCCIÓN.

Oaxaca es el principal productor de pitaya a nivel nacional, siendo la Región Mixteca una zona idónea para el cultivo de este producto. Sin embargo, no se ha expandido su distribución y comercialización en el mercado debido a que es un fruto perecedero que madura rápidamente después de haberlo cosechado y quitado las espinas, alcanzando en pocos días su descomposición.

Debido a esto, en la Universidad Tecnológica de la Mixteca surgió el proyecto institucional “Aprovechamiento integral de la pitaya (*Stenocereus stellatus*) cultivada en la Región Mixteca”, el cual tiene como objetivo primordial el desarrollar nuevas alternativas de consumo de la pulpa, así como la utilización de los residuos (cáscaras) que se generan durante su procesamiento, fortaleciéndose así la economía de los productores de pitaya de la región. Hasta el momento ya se han desarrollado las formulaciones y procesos tecnológicos para algunos productos como son ciertas conservas (mermelada, ate y jalea) (González y col. 2002) y concentrados (para preparar jugos, bebidas o yogurt). Con respecto a la cáscara y espinas se encontró que representan del 40 al 60% del peso fresco del fruto por lo que, se pueden considerar como materia prima potencial de residuos agroindustriales (Aguilar, 2003).

Por otra parte, actualmente existe una creciente búsqueda de nuevas fuentes para la extracción de colorantes naturales como son betalaínas, clorofilas, carotenoides y flavonoides, entre otros. Además se busca sustituir a los colorantes sintéticos, sobre todo los rojos. Una razón por la cual se prefieren los pigmentos naturales es que son menos tóxicos, mientras que algunos colorantes sintéticos se ha visto que poseen efectos tóxicos para el ser humano (Lugo, 1998).

Aunque existen colorantes rojos naturales como el del betabel, este pigmento tiene un compuesto llamado geosmine que tiene la desventaja de impartir el sabor característico del betabel al producto al que se le incorpora, lo que ha limitado su aplicación. Razón por la cual existe un gran interés por seguir investigando y encontrar un colorante natural rojo que no tenga olor ni sabor, económico y seguro que pueda sustituir a los sintéticos rojos tan restringidos actualmente.

Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer las condiciones de extracción y estudiar la estabilidad del pigmento proveniente de la cáscara de *Stenocereus stellatus* (Xoconostle), y así conocer si este colorante tiene alguna posibilidad de ser aplicado en la industria alimentaria, ya sea en forma de extracto concentrado o como polvo. Además, de esta manera se buscó retomar el uso de aditivos naturales mediante el aprovechamiento de uno de los residuos generados en el consumo de la pitaya (las cáscaras). Finalmente, se pretendió darle un valor agregado a los residuos que se generarían en la producción y procesamiento de este fruto de la región.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Familia de las cactáceas.

Las cactáceas son originarias del continente americano y se encuentran distribuidas en todo lo largo y ancho del mismo. México ha sido un centro de establecimiento y diferenciación muy importante para esta familia de plantas, encontrándose una gran cantidad de endemismos y una variación increíble de formas, adaptaciones y tipos biológicos, acordes con la gran diversidad climática del país.

Granados (1999) cita que la teoría más aceptada sobre el origen de las cactáceas es la de Buxbaum, que establece que las formas ancestrales fueron plantas foliadas que vivieron en territorios emergidos del Caribe y que actualmente están extinguidas. Plantas mesófilas que a finales del terciario habitaban regiones con clima subtropical más o menos cálido húmedo y que gradualmente fueron adquiriendo sus características xerófilas, al ir disminuyendo la humedad y formándose los desiertos.

Los datos arqueológicos obtenidos en excavaciones en el Valle de Tehuacán, Puebla y en Tamaulipas indican que el consumo de cactáceas se realizaba desde los años 6500 A. C. Por medio de los restos semifosilizados de tallos, frutos y semillas se pueden identificar gran parte de aquellas especies de cactáceas. Así mediante el análisis de los estomas y drusas se llegó a identificar gran parte de aquellas especies de cactáceas. Se llegó a identificar al pitayo (*Stenocereus sp.*) y al nopal tunero (*Opuntia sp.*) (Mercado, 1999).

La importancia de estas especies en la vida de diversas civilizaciones y tribus de México quedó manifiesta en sus códices; como alimento, para sus usos medicinales y otros usos, como representaciones simbólicas y en ceremonias religiosas (Granados, 1999).

Para muchas familias de plantas, el tratar de nombrar y clasificar las especies (taxonomía) es difícil, no siendo las cactáceas una excepción. La taxonomía de estas plantas comenzó oficialmente con el primer trabajo de Carlos de Linneo llamado: *species plantarum*, donde nombró solamente 22 especies de cactáceas, a las cuales clasificó en un sólo género, *Cactus*. En este grupo (taxón), él clasificó las arborescentes, columnares y epífitas.

Se reconocen tres subdivisiones mayores de la familia a las cuales se les llama subfamilias, y son *Pereskioideae*, *Opuntioideae* y *Cactoideae*.

Dentro de la subfamilia *Cactoideae* se encuentran las especies columnares, epífitas y muchas especies de pequeño desarrollo. La familia *Cactoideae* fue formalmente conocida como *Cerenoideae*. Las reglas oficiales de la nomenclatura botánica requieren que esta sea llamada *Cactoideae*, porque se incluye en esta subfamilia ese tipo de especies con el homónimo de la familia de una especie de *Cactus de Linnaeus*. En la subfamilia *Cactoideae* se tienen reconocidas nueve tribus (Hernández, 1996).

2.2 Descripción de la planta.

2.2.1 Taxonomía y características morfológicas.

La clasificación taxonómica de *Stenocereus stellatus* es la siguiente:

Reino: Vegetal.

División: Angiospermas.

Familia: *Cactaceae*.

Tribu: *Pachycereae*.

Género: *Stenocereus*.

Especie: *Stellatus*.

Descripción: Nombrado xoconostle o pitayo (Fig. 1) es una planta arborescente, de dos a tres metros de altura con ramas erectas desde la base. Costillas ocho a doce, obtusas y onduladas, de dos centímetros de alto. Espinas radiales nueve a trece, cortas, grisáceas con la punta obscura. Tres espinas centrales; dos divergentes hacia arriba y una dirigida hacia abajo, algo más gruesas y largas que las radiales. Flores dispuestas en el ápice de las ramas o en una corona, diurnas, de color rosa pálido; de cinco a seis centímetros de largo; pericarpelo con podarios prominentes; podarios del tubo receptacular gradualmente más grandes, pared del tubo receptacular gruesa; los estambres primarios se encorvan en la base de manera que cierra la cámara nectarial; óvulos numerosos, con funículos ramificados; segmentos exteriores e interiores de color rosa claro. Filamentos blancos, anteras color crema; nueve lóbulos del estigma, de un centímetro de largo, delgados. Semillas pequeñas, con testa negra, verrugosas.

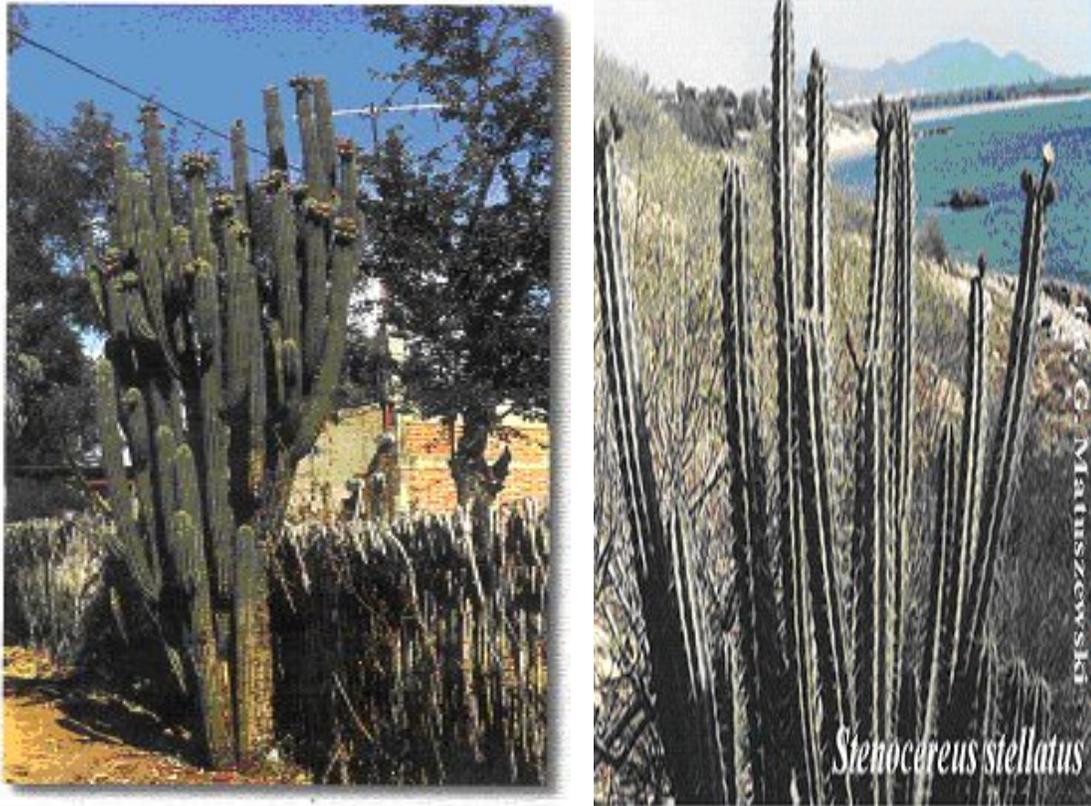


Figura 1. Planta de pitaya (*Stenocereus stellatus*) de la Región Mixteca.
(Granados, 1999; <http://www.columnar-acti.org/stenocereus/>).

2.3 Distribución geográfica.

La planta de género *Stenocereus*, especie *stellatus*, es un matorral xerófilo, se encuentra a 1600 m sobre el nivel del mar y se localiza distribuido en la República Mexicana en la Mixteca baja, el valle de Tehuacán, en los valles centrales de Oaxaca, en el alto Balsas, cerca de Izúcar de Matamoros (Puebla) y en algunas regiones de Jalisco (Fig. 2). Esta planta produce un fruto llamado “pitaya agria” o “xoconostle”, que es recolectado sobre todo para consumo familiar y objeto de comercio en mercados regionales.

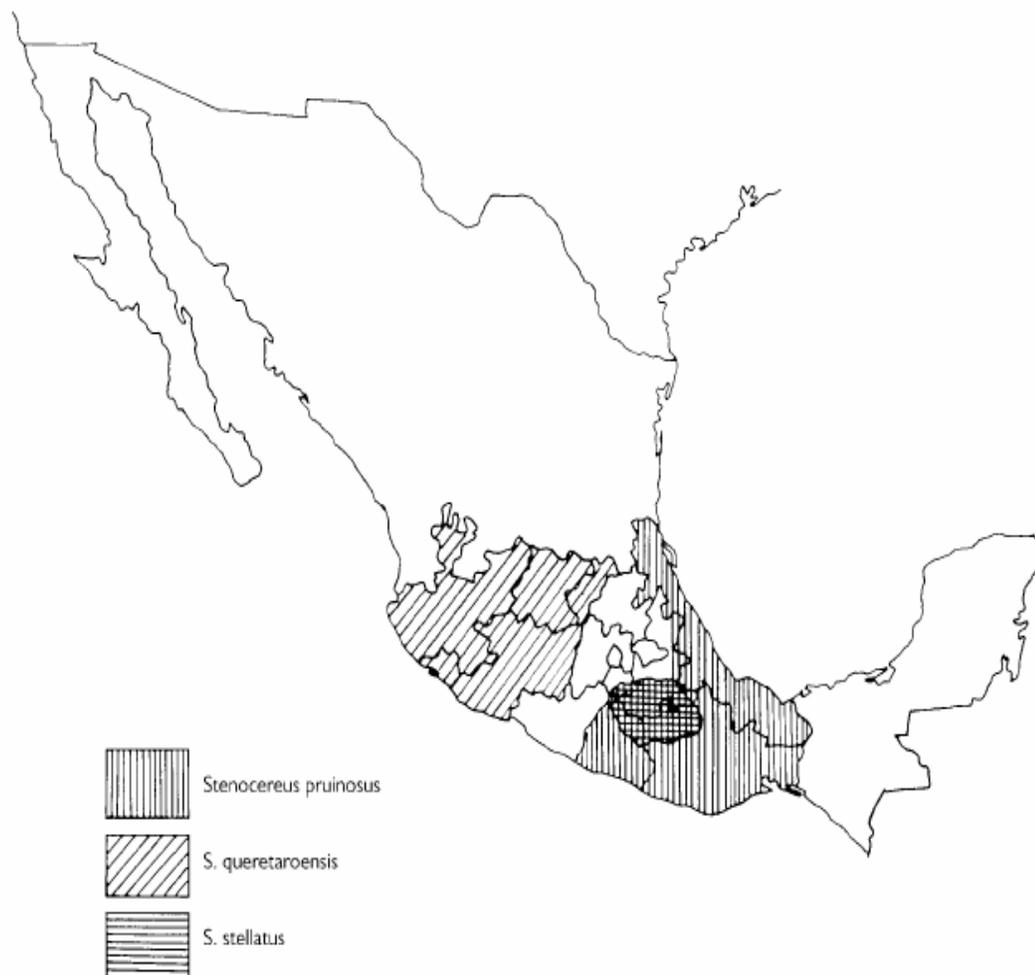


Figura 2. Distribución geográfica del género *Stenocereus* en México.
(Pimienta-Barrios y Nobel, 1994; Luna, 1999).

2.4 Composición química.

Las cactáceas producen una gama muy amplia de metabolitos secundarios, dentro de los metabolitos secundarios que se han observado en esta familia tenemos a los pigmentos, alcaloides, triterpenos, esteroides, mucílago, látex, proteínas de inclusión, cristales, entre otros.

2.4.1 Pigmentos.

Los principales pigmentos en las cactáceas son las clorofilas, los carotenoides y las betalainas. Se ha encontrado que el color de las flores, frutos y en ocasiones el del interior de los tallos de las cactáceas, se debe a la presencia de pigmentos nitrogenados del grupo llamados betalainas, que cuando tienen color rojo violáceo se les nombra betacianinas y si son amarillas betaxantinas (Acosta, 2000).

2.4.2 Alcaloides.

La mezcalina es un potente alcaloide alucinógeno presente en el peyote (*Lophophora williamsii*). Sin embargo, se encuentra en otras especies y géneros de cactáceas, como *Opuntia* y *Pereskia*, *Stenocereus* y *Trichocereus*. En muchas especies, la mezcalina se presenta solamente en cantidades traza, cuando en el peyote, la mezcalina constituye el 1% de su peso fresco. Ninguna de las cactáceas similares a *Lophophora* contiene compuestos alucinógenos (Hernández, 1996). También se han descubierto alcaloides del tipo de las tetrahidroisoquinolinas en las cactáceas columnares de México, específicamente en las especies conocidas de la subtribu *Pachycereeae* (López, 1993).

2.4.3 Triterpenos y esteroides.

Los triterpenos y los esteroides son moléculas complejas que tienen un sistema de anillos en cadenas largas de carbonos. En México ciertas cactáceas tienen compuestos saponínicos (saponinas). La diversidad de triterpenos en las cactáceas es poco conocida,

porque hay muchas especies que aún no han sido examinadas. Algunos triterpenos detectados en las cactáceas son ácido oleanólico y el queretaroico (López, 1993). Los pocos esteroides que se han logrado aislar, especialmente de cactáceas columnares, son los dihidrosteroides que comienzan su nombre con el de las cactáceas de donde provienen como son el peniocerol, stenocerol, thurberol y ciclosterol (*Peniocereus, fosterianus* y *Stenocereus thurberi*) (Hernández, 1996).

2.4.4 Mucílago y látex.

Al hacer un corte a un cactus éste secreta una sustancia de naturaleza mucilaginoso. El mucílago es un polisacárido fibroso y contiene diversos tipos de azúcares. Es una molécula muy larga y muy compleja, por lo que los fitoquímicos muestran poco interés en ella. Látex es el nombre común que se utiliza para denominar al fluido viscoso exudado al cortar la superficie de una planta, es generalmente blanco, puede ser transparente, amarillo, naranja o tal vez rojo (López, 1993).

2.4.5 Proteínas de inclusión en elementos tubulares.

Las células elongadas del floema que transportan los azúcares de los sitios de producción en las células del clorénquima a regiones donde son usados o almacenados, son conocidos como elementos tubulares, dentro de estos aparecen plástidos incoloros que tienen gránulos de almidón y/o depósitos de proteína. Los elementos tubulares de los cactus tienen un conspicuo anillo periférico de proteína que es una fibra de proteína que está presente en forma de glóbulos proteicos centrales (López, 1993).

2.4.6 Cristales.

Los cristales de las cactáceas son similares al de todas las familias de las dicotiledóneas (López, 1993) y estos cristales pueden aparecer en varias partes de un cactus. El oxalato de calcio es relativamente insoluble en agua y se puede encontrar en forma cristalina, usualmente en vacuolas ya sea en forma individual y no en forma de agregados; tienen

forma romboidal o poliédrica también se han encontrado cuerpos de sílice en todas las especies de *Stenocereus*, género del centro de México (Hernández, 1996).

2.5 Utilidad de las cactáceas.

Los principales usos que se le ha dado a las cactáceas además de ser una fuente de alimento son como forraje, planta medicinal, para la protección de suelos, combustible, material de construcción (cerca viva), planta de ornato e incluso para la obtención de colorantes (Granados, 1999; Mercado, 1999).

2.6 Pitaya.

2.6.1 Descripción.

El fruto de las pitayas está constituido por los carpelos del ovario y por el pericarpelo, los cuales se funden formando un solo cuerpo. La zona peduncular se desplaza hacia arriba, y los funículos se desarrollan de manera que acumulan gran cantidad de agua y azúcares, y esto es lo que constituye la pulpa comestible del fruto (Fig. 3) (Granados, 1999).

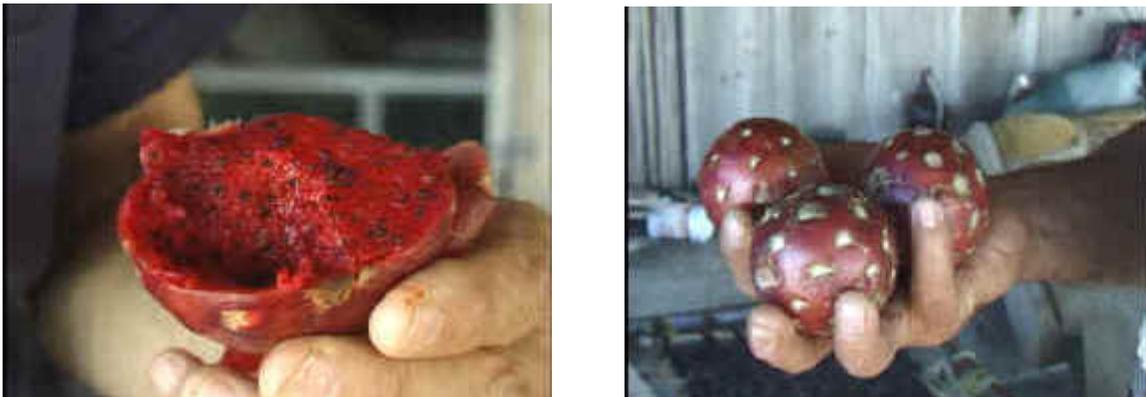


Figura 3. Características de la pulpa y color de la pitaya (<http://www.innerexplorations.org/bajatext/rancho3.htm>)

El género *Stenocereus*, especie *stellatus*, constituye una de las especies de cactáceas productoras de fruta más importantes de México para su comercialización en fresco y la obtención de otros productos procesados, por lo que está considerada por la International Society for Horticultural, entre las cactáceas con mayores potencialidades económicas

para México (www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/stenocereus_stellatus.htm). La pitaya requiere un mínimo de inversión y se puede cultivar en tierras no aptas para la agricultura (Mercado, 1999; CONACULTA, 1998).

Debido a esto y a su valor comestible e importancia agrícola está regulada por las normas oficiales mexicanas NOM-005-RECNAT-1997 y NOM-007-RECNAT-1997.

El principal problema en la comercialización de la pitaya es el carácter perecedero de los frutos, debido a lo delgado de su cáscara y al acelerado proceso de maduración después de la escisión del fruto (Granados, 1999).

2.6.2 Composición del fruto.

Los análisis bromatológicos que se le han practicado a los frutos del pitayo demuestran que son ricos en azúcares y minerales (Tabla 1), además las semillas abundan en proteínas.

Tabla 1. Características químicas de los frutos de *Stenocereus stellatus*.

Variable	Fruto Rojo	F. Blanco	F. Amarillo	F. Solferino
Grados brix	9.23	10.00	9.10	9.05
pH	4.2	4.4	4.46	3.7
Acidez titulable	0.53	0.39	0.50	0.47
% Humedad	86.36	86.37	87.26	87.26
% Glucosa	7.02	6.89	6.93	7.04
% Fructosa	3.10	4.26	3.29	2.52
% Azúcares reducidos	10.13	11.16	10.22	9.56
% Sacarosa	2.44	4.76	3.84	3.12
% Azúcares totales	12.58	15.92	14.07	12.68

(Granados, 1999).

2.6.3 Producción actual y usos del fruto.

Su producción anual es mayor a 2500 toneladas, siendo Oaxaca el principal estado productor de pitaya a nivel nacional, el cual cuenta con zonas idóneas para el cultivo de este producto destacándose la Región Mixteca, la Cañada y el Istmo (Secretaría de Desarrollo Industrial y Comercial, 1999). Las comunidades dan a los frutos de las cactáceas variados usos, pero principalmente el empleo como alimento en fresco (Mercado 1999). Debido a que el fruto es altamente perecedero se han estado desarrollando trabajos para obtener productos procesados con el fin de aprovechar completamente el fruto, entre ellos se encuentra el de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa y campesinos de la Zona Mixte de Oaxaca que han desarrollado métodos para obtener algunas conservas, jugos y aderezos de tres frutos de cactáceas (Investigación y Desarrollo, 2001).

Otros proyectos que se están realizando es la obtención de colorantes naturales a partir de pitaya, que en forma gradual comienzan a valorarse como alternativas ante los productos artificiales, una vez que algunos artificiales han sido detectados como tóxicos, y por ende ya están prohibidos en diversos países, lo que abre puertas a pigmentos de origen natural. Sin embargo el aspecto costo-beneficio es un punto en contra de los pigmentos naturales ya que en la mayoría de los casos los productos sintéticos tienen menor precio; otro punto es que los colorantes naturales son fácilmente degradados por los efectos de la luz, el oxígeno, aire y cambios de temperatura. Sin embargo, los requerimientos de mayor seguridad e inocuidad de los alimentos provocará que en un futuro cercano los colorantes naturales sean más competitivos en el mercado alimentario, como ya se observan las tendencias en los Estados Unidos y Europa (Maldonado, 2002).

2.7 Uso de las cactáceas para la obtención de colorantes.

Las cactáceas, directa o indirectamente, constituyen una fuente importante de colorantes con aplicaciones principalmente en las industrias alimenticia, farmacéutica y cosmética. De los diversos frutos de las cactáceas se extraen algunos pigmentos betacianicos, utilizados como colorantes de alimentos, bebidas refrescantes y productos de tocador.

Indirectamente se obtiene un colorante llamado comúnmente grana o cochinilla del nopal, el cual consiste, en su forma original, de los cuerpos secos de las hembras adultas de varias especies de insectos chupadores (homópteros) pertenecientes al género *Dactylopius*, de la familia *Dactylopiidae*, que viven como parásitos en diversas especies de cactáceas, principalmente de ciertos nopales.

Posteriormente, debido a la competencia y al desarrollo de colorantes artificiales con el descubrimiento de la anilina, a partir de fines del siglo XVIII la producción y comercio de cochinilla en México declinó hasta llegar a desaparecer por completo el cultivo de grana (Bravo Hollis y col. 1991; Mercado, 1999).

En la actualidad la manufactura de colorantes es parte importante de la industria química, y muchos de los compuestos que se usan se derivan de la anilina (Lugo, 1998).

Los nuevos colorantes sintetizados químicamente ofrecían muchas ventajas sobre los colorantes naturales ya que eran mucho más brillantes, más estables, más baratos y presentaban una amplia gama de tonalidades. Sin embargo, con el paso del tiempo comenzaron a ser aparentes las propiedades tóxicas de estos colorantes; reduciéndose el número de colorantes sintéticos autorizados. Por ejemplo, algunos de los colorantes artificiales que han sufrido la cancelación de los certificados provisionales por parte de la Food and Drug Administration (FDA) de los E.U. son los rojos No. 2, 4 y 5 y el amarillo No. 6, debido a los posibles efectos tóxicos que generan en la salud. Estas acciones han motivado que se centre nuevamente la atención en la obtención y empleo de colorantes naturales para su uso industrial (Hernández, 1996).

Actualmente de la pulpa de la pitaya se tiene un protocolo técnico que demuestra su viabilidad como colorante para pigmentar productos lácteos, lo que plantea una alternativa para industrializar la fruta que no se venda en fresco (Lugo, 1998; Maldonado, 2002). Además se pueden obtener tintes naturales para la manufactura de colorantes usados en la industria alimentaria y farmacéutica (Lugo, 1998; Acosta, 2000).

2.8 Definición de colorante.

La vista permite juzgar el aspecto de un alimento en términos de su forma, textura y color. El aspecto de un alimento es la primera clave de su identificación y con frecuencia

predice el grado de satisfacción o placer que se obtendrá al comerlo. Probablemente el color es el más importante de los factores visuales responsables de la aceptación o rechazo de los alimentos. La intensidad del color con frecuencia significa intensidad del sabor. Las variaciones en la intensidad del color pueden sugestionar al consumidor dándole la idea de que el alimento estuvo sujeto a un proceso mal controlado. En los alimentos la variedad de color es atractivo e implica diversidad de sabores y texturas. El ojo humano sólo puede percibir el color cuando su energía corresponde a una longitud de onda entre 380 y 780 nanómetros (nm). Por lo tanto el color es parte de la energía radiante que el hombre puede percibir mediante sensaciones visuales que se generan por estimulación de la retina del ojo, es la percepción por el ojo humano de los productos coloreados (Badui, 1993).

La homogeneidad del color de los productos durante todo el año es fundamental, el público desea encontrar siempre el alimento con los mismos colores, por estas razones existen en el mercado diversos agentes químicos que sirven para colorear, denominados colorantes (Coulate, 1984).

Un colorante es un compuesto químico que imparte color, puede ser definido como la sustancia obtenida de los vegetales, animales o minerales, o por síntesis, empleada para impartir o acentuar el color de los alimentos (Badui, 1993).

2.9 Clasificación de colorantes.

Los colorantes se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios; según su origen:

- Orgánicos o naturales: procedentes de plantas y animales, tales como la clorofila, carotenos, betalaínas, flavonoides y antocianinas entre otros.
- Minerales: tales como lacas, sulfato de cobre y cromato de potasio entre otros; no se usan en alimentos por que llevan iones metálicos.
- Artificiales: Obtenidos por síntesis química (Cenzano, 1994).

De acuerdo a su solubilidad son hidrosolubles y liposolubles.

La FDA creó tres categorías para clasificar a los colorantes (Marmi3n, 1991):

1. Colorantes FD&C: Certificados para uso en alimentos, drogas y cosm3ticos en general.
2. Colorantes D&C: Tintes y pigmentos considerados seguros en drogas y cosm3ticos

ingeridos o usados en contacto directo con membranas mucosas.

3. Colorantes Ext. D&C: Colorantes que, por su toxicidad oral, no se usan en productos para ingestión, pero que son considerados seguros para uso externo.

Las regulaciones de la FDA distinguen dos tipos de aditivos colorantes (Clydesdale, 2000; Dominic, 1989):

I. Colorantes "certificados" (Artificiales).

II. Colorantes "no certificados" (Naturales).

2.9.1 Colorantes naturales.

Son aquellos colorantes exentos de certificación para pureza química por parte de la FDA, que se obtienen de fuentes naturales como vegetales, animales o minerales. Ejemplos de éstos son los carotenoides, clorofilas, antocianinas, flavonoides y betalaínas, entre otros. Aunque estos compuestos están exentos de los requerimientos de certificación formal de la FDA para asegurar que su pureza está de acuerdo con las especificaciones y que se usan en consonancia con la legislación; requieren permiso de la FDA para ser incluidos en la lista de colorantes no certificados. Los colorantes exentos de certificación en Estados Unidos son, oleoresina pprika, β -caroteno, extracto de cochinilla, jugos de frutas y vegetales, extracto de piel de uva, color caramelo y dióxido de titanio, entre otros (Wissgott, 1996).

La mayoría de los pigmentos vegetales se localizan en el protoplasma de la célula dentro de los plástidos, en algunos casos cuando los pigmentos son hidrosolubles, se localizan disueltos en las vacuolas de las células (Badui, 1993; Fennema, 1993).

2.9.2 Colorantes Artificiales.

Son aquellos colorantes obtenidos mediante un proceso químico industrial y existen una gran cantidad de ellos; sin embargo solo algunos están aprobados para su uso en alimentos en relación con la toxicidad o inocuidad de cada uno de ellos; ejemplos de estos compuestos son la tartracina, el amarillo-anaranjado S, amarillo de quinoleína, azul

patentado V, índigotina o índigo carmín, azul número 1, rojo cítrico número 2, el rojo número 40 y el amarillo número 6 por mencionar algunos (Badui, 1993).

2.10 Fuentes de colorantes naturales y aplicaciones.

Como fuente de colorantes naturales podemos tener a las plantas (hojas, flores y frutos), insectos (grana cochinilla) y algunas algas marinas. Se pueden obtener en forma de:

- Zumo de frutas. Se usan en su forma concentrada como agentes colorantes y típicamente contienen carotenoides y antocianinas.
- Extractos de gardenia. Producida por el jugo de la planta que contiene una variedad de pigmentos, incluye un carotenoide soluble y flavonoides.
- Extracto de la piel de la uva. Obtenido por extracción del residuo producido del prensado de la uva durante la producción de vino.
- Extractos de color verde que se obtienen de la espinaca y alfalfa (Wissgott, 1996).

Se han investigado más plantas, como los residuos o cáscaras de bananas (*Musa X paradisiaca*), frutos como el del pigmento rojo de jiotilla (*Escontria chiotilla*) y el betabel como fuente potencial de colorantes (Pazmiño, 2001; Soriano y col. 2004).

Además de impartir color, los colorante naturales han demostrado tener beneficios a la salud, como por ejemplo el licopeno, un caroteno que se usa como colorante y que es un factor en la reducción de la morbilidad de ciertos cánceres, lo que alienta aún más la producción de colorantes naturales (Fernández, 2001).

Otras investigaciones han descubierto que las antocianinas y betalaínas poseen una actividad antioxidante elevada, por lo que se busca incluirlos en alimentos (Espín, 2000 y Camire, 2002).

Las colorantes naturales, aún con sus limitaciones, tienen gran importancia industrial y son usados en la fabricación de embutidos y productos cárnicos, gelatinas, helados, postres, productos lácteos, textiles, cosméticos y farmacéuticos entre otros (Hernández, 1996).

2.11 Principales pigmentos de origen vegetal.

2.11.1 Carotenoides.

Los carotenoides se localizan en los plástidos llamados cromoplastos, no son solubles en agua y se extraen con disolventes orgánicos como cloroformo o éter. Algunos ejemplos de carotenoides son los pigmentos rojos del tomate (*Lycopersicon esculentum*) y los del chile (*Capsicum spp.*), los pigmentos naranjas de las zanahorias (*Daucus carota*) y los pigmentos amarillos de la calabaza (*Cucurbita pepo*) y de las bananas (*Musa spp.*).

Las cactáceas también tienen carotenoides, pero estos no se han evidenciado en los pocos estudios que se han realizado, porque los pigmentos de tipo betalaína dominan. La estructura química básica de la mayoría de los compuestos es poliénica de 40 átomos formadas por ocho unidades de isopreno. Su nombre genérico deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue de ésta donde se aislaron por primera vez. Su color varía de amarillo-anaranjado-rojo, una gran proporción de ellos se encuentra en las hojas verdes y sólo hacen su aparición en el invierno cuando la clorofila, que es más abundante, desaparece. Se encuentran básicamente en tejidos que llevan a cabo la fotosíntesis. Se dividen de acuerdo a su estructura química en carotenos y xantofilas, en términos generales. De los primeros destacan los α , β , y γ -carotenos (Fig. 4), por los segundos, ejemplos de estos son la fucoxantina, la luteína y la criptoxantina (Fig. 5). En la naturaleza la cantidad de xantofilas sobrepasa la de carotenos, pero el β -caroteno es el carotenoide de mayor importancia en tecnología de alimentos. Las diferentes concentraciones de carotenoides varían con la madurez del producto y la pérdida de clorofila. Sirven como precursores de vitamina A y protectores contra la formación y acción de radicales libres. Su estabilidad se ve afectada por altas temperaturas, radiaciones electromagnéticas y oxígeno (Badui, 1993).

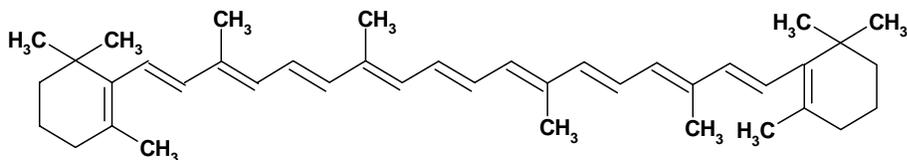


Figura 4. Estructura química del β -caroteno (Badui, 1993).

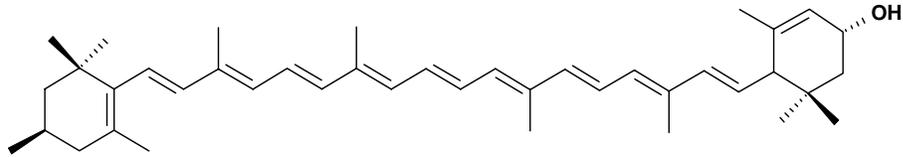


Figura 5. Estructura química de la luteína (Clydesdale, 2000).

2.11.2 Clorofilas.

Este es tal vez el pigmento vegetal más abundante en la naturaleza, se encuentra en la mayoría de las plantas siendo responsable de la fotosíntesis. Los tipos más importantes son la **a** y la **b** (Fig. 6), la **a** se encuentra en mayor proporción (3:1). De menor importancia son las clorofilas **c**, **d** y algunas de origen microbiano. Las hojas de la mayoría de las plantas deben su color verde a ésta, que va desapareciendo al acercarse la senectud (para dejar paso a otros pigmentos como carotenoides) y en frutos inmaduros. Se encuentran en los cloroplastos. Las clorofilas son insolubles en agua; sólo es soluble en diversos disolventes orgánicos, tales como benceno, éter y acetona. Las clorofilas tienen típicamente dos picos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm), y otro en la zona roja del espectro (600-700 nm); sin embargo reflejan la parte media del espectro, la correspondiente al color verde (500-600 nm). Esta es la razón por la que las clorofilas tienen color verde y se lo confieren a los organismos, o a aquellos tejidos que tienen cloroplastos activos en sus células. Su estructura química compleja, al igual que los carotenos, es fácilmente alterable por oxidantes (oxígeno, peróxidos), altas temperaturas, pH, luz y algunas enzimas (Badui, 1993).

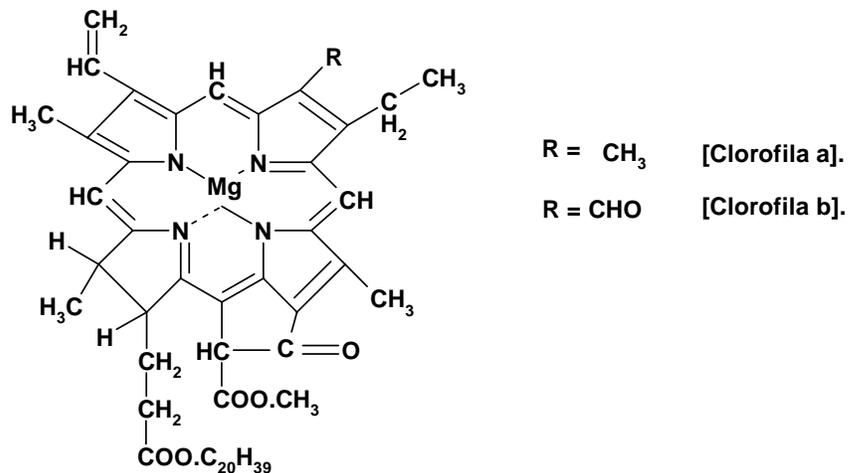


Figura 6. Estructura química de la clorofila a y b (Badui, 1993).

2.11.3 Antocianinas.

Compuestos hidrosolubles con características de glucósidos constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar. La estructura química básica de la aglicona es el ión flavilio. Ejemplo de antocianinas son la pelargonidina (Fig. 7) y la cianidina (Fig. 8); la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera alrededor de 150 antocianinas que abundan en la naturaleza. Son responsables del color rojo-naranja, azul y púrpura de uvas, manzanas, rosas, fresas, etc. Generalmente se encuentran en la cáscara o piel, no existen en estado libre en alimentos. Su estabilidad se ve afectada por los mismos factores que degradan la mayorías de los pigmentos vegetales (Badui, 1993).

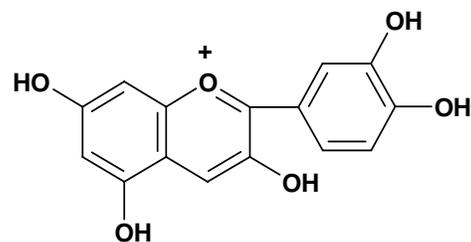
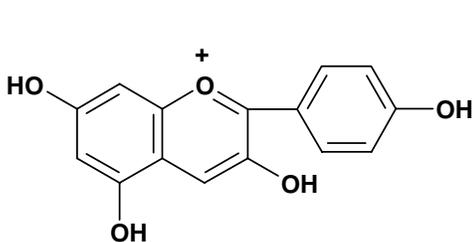
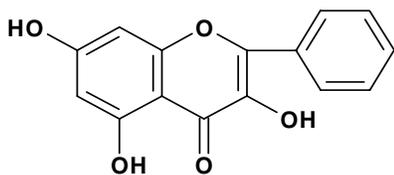


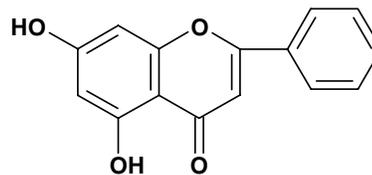
Figura 7. Estructura química de la pelargonidina. Figura 8. Estructura química de la cianidina.
(Badui, 1993).

2.11.4 Flavonoides.

Son compuestos fenólicos abundantes en la naturaleza, de estructura química parecida a las antocianinas, normalmente se encuentran en frutos junto a ellas, ya que ambos grupos de pigmentos siguen un proceso biosintético común. Son glucósidos formados por una aglicona, como flavonol (Fig. 9) y flavona (Fig. 10). Generalmente son amarillos, no contribuyen de manera importante al color del alimento, se encuentran en frutas como peras, fresas, manzanas, cerezas, duraznos, naranjas y limones. Destacan por su importancia los flavonoles, estos se encuentran en cebollas (quercetina), fresas (kaempferina) y uvas (miricetina). Su actividad antioxidante es muy alta. Inhiben la oxidación de la vitamina C en algunos alimentos. Normalmente más estables al calor y reacciones de oxidación que las antocianinas. Resisten la mayoría de los tratamientos térmicos en la manufactura de alimentos enlatados (Badui, 1993).



Flavonol



Flavona

Figura 9. Estructura química del flavonol.

Figura 10. Estructura química de la flavona.

(Badui, 1993).

2.11.5 Betaláinas.

Son un grupo de alrededor de 70 pigmentos hidrosolubles, se encuentran compartimentalizadas dentro de las células en las vacuolas con estructura de glucósidos (Marby, 1980). Se dividen en betacianinas (violáceas) y betaxantinas (amarillas). Se encuentran en varios géneros de las cactáceas (Tabla 2). Pierden coloración bajo influencia de pH, luz, altas temperaturas, oxígeno y actividad de agua (Badui, 1993). La fórmula general de las betaláinas (Fig. 11) representa la condensación de una amina primaria o secundaria con ácido betalámico (Fig. 12).

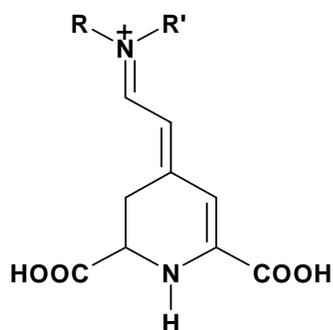


Figura 11. Estructura general de las betalainas.

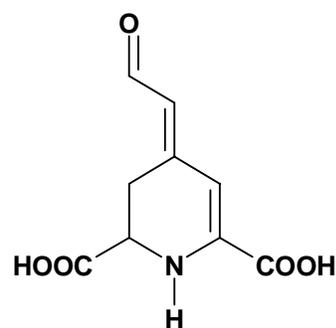


Figura 12. Estructura del ácido betalámico.

Tabla 2. Betalainas presentes en las cactáceas.

Familia	Género	Betalainas Reportadas	
		Betacianinas	Betaxantinas
Cactaceae	<i>Myrtillocactus</i>	Betanina y Filocactina	Indicaxantina
	<i>Opuntia</i>	Betanina, Betanidina, Isobetanidina, Isobetanina, Filocactina e Isofilocactina	Indicaxantina
	<i>Schlumbergera</i>	Betanina y Filocactina	Vulgaxantina I
	<i>Stenocereus</i>	Betanina, Isobetanina y Filocactina	Vulgaxantina e Indicaxantina

(Piatelli, 1969; Colomas, 1978; Valadez, 1979; Adachi, 1983; Berlin, 1986; Reznik, 1988; Boehm, 1991; Trezzini, 1991; Glassgen, 1993; Stuppner, 1996; Hempel, 1997; Zakharova, 1997; Lugo, 1998; Kobayashi, 2000).

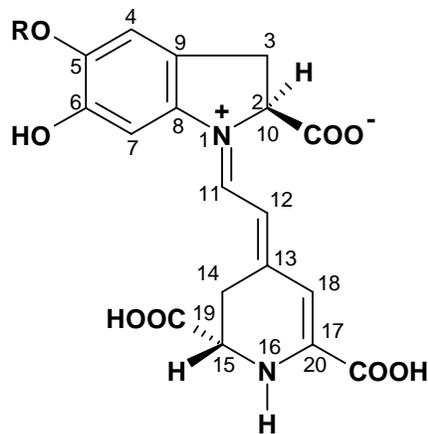
Estos pigmentos son estables en el intervalo de pH 3 – 7 y se ven afectados al igual que la mayoría de los pigmentos naturales por los metales, la temperatura, la presencia de aire y por las radiaciones ultravioletas (Acosta, 2000).

2.11.5.1 Betacianinas.

Son pigmentos de color púrpura, se consideran glucósidos, su principal componente es la betanina (hasta un 95% del total de las betacianinas del betabel). Todas las betacianinas pueden ser derivadas de dos núcleos básicos, la betanidina (Fig. 13) y la isobetanidina (Fig. 14), por glicosidación de uno de los grupos hidroxilos localizados en la posición cinco o seis. La hidrólisis de betacianinas da dirección a betanidina o al epímero (C-15) de isobetanidina, o una mezcla de los dos aglicones isoméricos. Las betacianinas son ópticamente activas por los dos carbonos quirales C-2 y C-15. Su naturaleza es altamente iónica por contener tres grupos carboxilos (dos con un pKa de 3.4 y el otro con un pKa de 2), además de un grupo fenólico (pKa de 8.5), características que hacen a las betacianinas difícilmente separables de las betaxantinas. Absorben a una longitud de onda máxima de entre los 534 y 555 nm. Son más estables que las betaxantinas. Generalmente representan del 75 al 95 % de las betalainas.

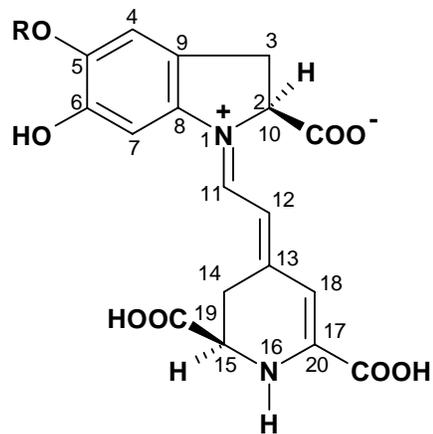
La betanina es un pigmento que no se ve afectado por ácidos monocarboxílicos como el ácido láctico y el ácido acético a concentraciones de 100 ppm y 5.9%, respectivamente, pero varios cationes metálicos, principalmente el cobre, aceleran su degradación. Los antioxidantes como el α -tocoferol y el ácido ascórbico no tienen efecto protector sobre la betanina a concentraciones de 100 ppm; sin embargo, cuando las concentraciones se elevan a 1000 ppm se reduce la estabilidad del pigmento debido a que el tocoferol y la vitamina C funcionan como prooxidantes a estas concentraciones. Algunos secuestrantes de metales como los ácidos etilendiaminotetraacético (EDTA) y el cítrico aumentan 50% la estabilidad de la betanina (Havlikova y col. 1985; Acosta 2000).

La mitad de los aminoácidos en estos compuestos son glutamina y ácido glutámico (Coultate, 1984; Dominic, 1989; Marmi3n, 1991; Badui, 1993; Fennema, 1993).



Betanina R = Glucosa

Betanidina R = H



Isobetanina R = Glucosa

Isobetanidina R = H

Figura 13. Estructura química de la betanina.

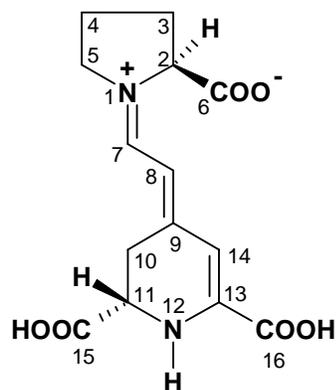
Figura 14. Estructura de la isobetanina.

(Clydesdale, 2000).

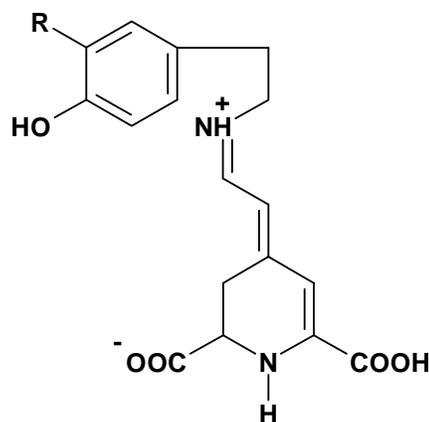
2.11.5.2 Betaxantinas.

Son pigmentos amarillos relacionados estructuralmente con las betacianinas, absorben a una longitud de onda máxima de 480 nm. El compuesto prototipo que representa la presencia natural de betaxantinas es la indicaxantina, aislada del fruto del cactus *Opuntia ficus-indica*, su aislamiento y análisis estructural confirmó la sospecha de una relación estructural entre las dos clases de pigmentos de las cactáceas. Son mucho más lábiles que las betacianinas en relación 1:10 (Coultate, 1984; Dominic, 1989 Badui, 1993; Fennema, 1993; Rivera, 1994).

Algunas betaxantinas identificadas son la Indicaxantina (Fig. 15), Miraxantina III y IV (Fig. 16) entre otras.



Indicaxantina



Miraxantina III R = H

Miraxantina IV R = OH

Figura 15. Estructura de la indicaxantina.

Figura 16. Estructura de la miraxantina III y IV.

(Clydesdale, 2000).

2.12 Conversión de betacianinas a betaxantinas.

Las propiedades electroforéticas y la distribución en la naturaleza de las betaxantinas es similar a la de las betacianinas. La información de la estabilidad de betaxantinas conocidas es limitada a vulgaxantina I, el mayor pigmento amarillo del betabel. Similarmente a betacianinas se encontró que la estabilidad de vulgaxantina I es pH dependiente. La estabilidad es más grande a pH entre 5 y 6, y más pobre a pH bajos (Hempel, 1997). En 1965 fue reportado que la indicaxantina puede ser formada por una combinación de betanidina y un exceso de S-prolina en presencia de hidróxido de amonio 0.6 N bajo alto vacío. Esta fue la primera evidencia publicada de la relación estructural entre betaxantinas y betacianinas. Posteriormente varios estudios demostraron que las betaxantinas, incluyendo las encontradas en el betabel, pueden ser formadas de betanina. La formación de betaxantinas se logra por la condensación de ácido betalámico y aminoácidos. El mecanismo sugiere que un exceso de la amina apropiada cambia el equilibrio hacia la formación de la betaxantina correspondiente y reduce la cantidad de ácido betalámico libre en solución. Esto incrementa la estabilidad de la betaxantina formada por reducción de la cantidad de ácido betalámico (BA) libre disponible para degradación (Fig. 17).

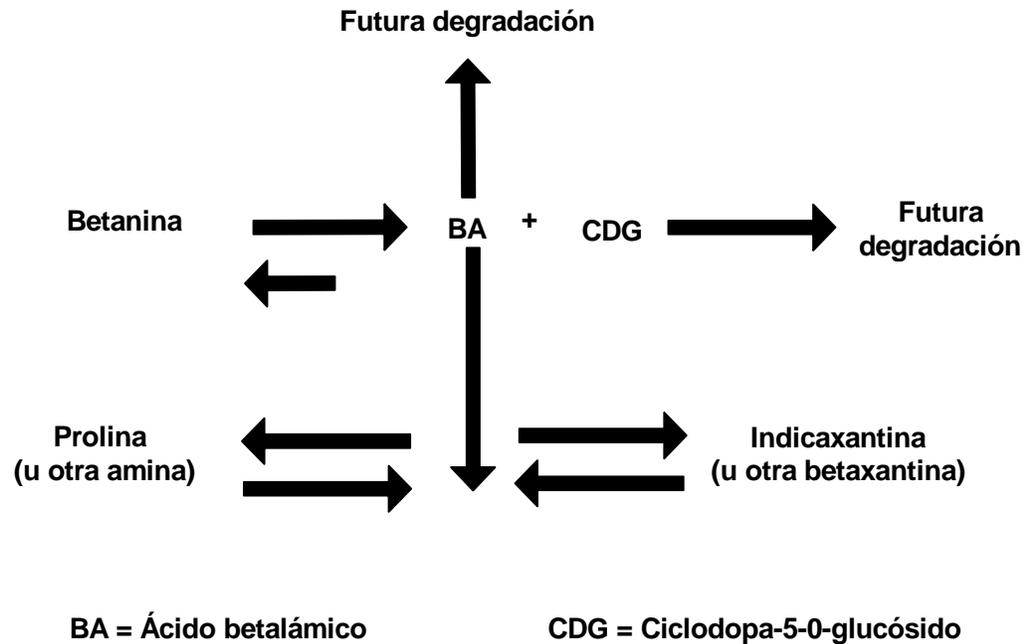


Figura 17. Mecanismo de conversión de betacianinas a betaxantinas (Lugo, 1998).

2.13 Degradación de betalainas.

2.13.1 Calor y/o acidez.

Bajo condiciones alcalinas suaves la betanina se degrada a BA y CDG. Si se calienta fuertemente se acelera la hidrólisis de la betanina en solución y se produce BA y CDG, pero ésta reacción es parcialmente reversible de acuerdo con el pH. Ambos productos de degradación son sensibles al oxígeno y el BA es afectado a condiciones ácidas o alcalinas fuertes (Badui, 1993). En vista de que ambas betalainas, poseen la misma estructura general, el mecanismo de degradación de betacianinas debería emplearse para las betaxantinas. La degradación de betanina a BA y CDG muestra ser reversible y por lo tanto la regeneración parcial del pigmento ocurre siguiendo la termodegradación del pigmento. El mecanismo propuesto para la regeneración de betanina requiere una condensación de la base de Schiff del grupo aldehído del BA y del amino nucleofílico de CDG. Un modelo cinético de la degradación de betanina, el cual describe la reversibilidad de la reacción de degradación, predice la cantidad de betanina que puede degradarse y regenerarse bajo varias condiciones experimentales. El BA muestra ser más estable a pH neutro y el CDG muestra serlo en condiciones ácidas; por lo tanto la

regeneración de betanina es maximizada en un rango de pH entre 4 y 5 (Lugo, 1998).

El centro quiral C-15 es responsable de la formación de los dos epímeros, isobetanina y betanina, y son formados por tratamiento ácido o calórico. Un estudio realizado por Von Elbe y colaboradores reportó que la proporción de isobetanina y betanina para betabeles frescos, escaldados y esterilizados difiere con el aumento de la severidad del tratamiento calórico. Esto es que cuando la betanina en solución es calentada, puede ocurrir descarboxilación. Esto puede ser determinado por presencia de dióxido de carbono y pérdida del centro quiral C-15. La acumulación de betanina descarboxilada se incrementa conforme la acidez aumenta. La degradación de betanina es resumida en la Figura 18 y 19.

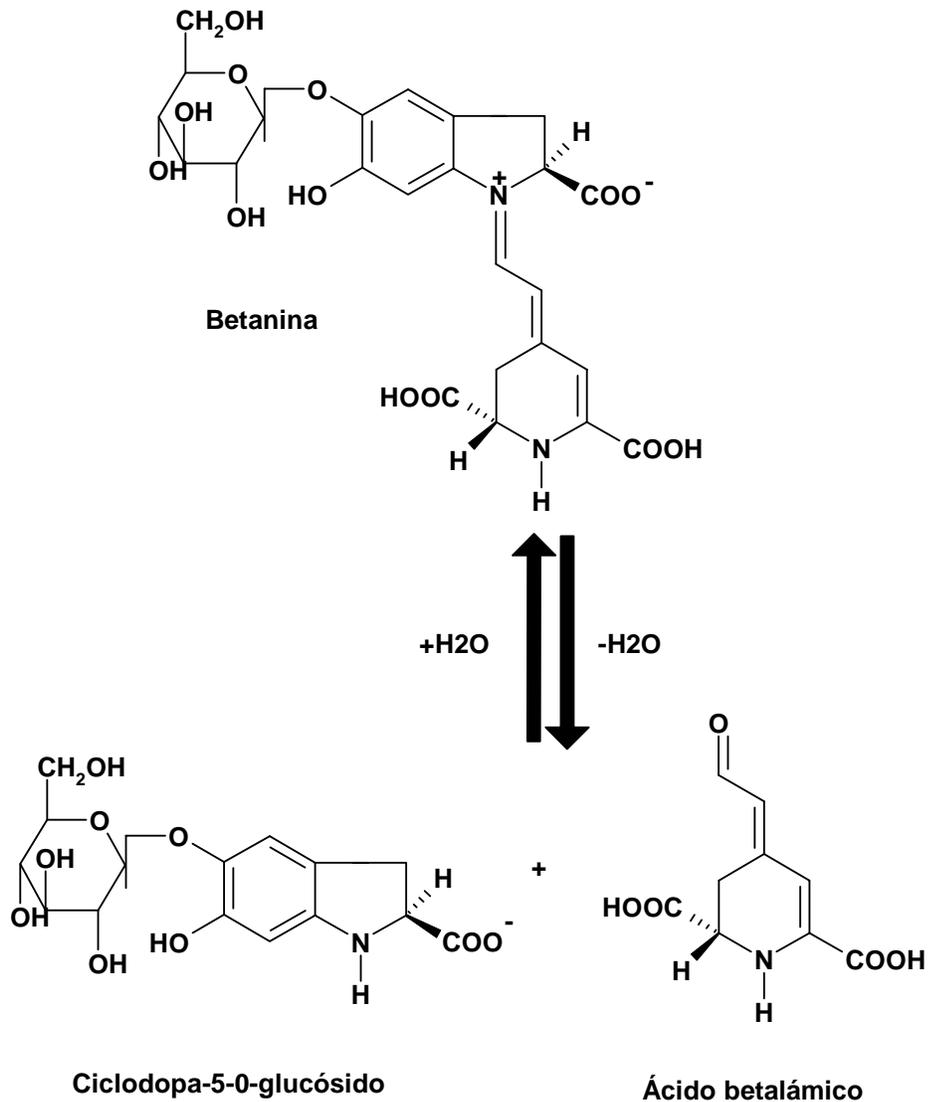


Figura 18. Degradación reversible de la betanina (Lugo, 1998; Clydesdale 2000).

molécula de betanina. Esto puede ser explicado por el hecho de que fuera del rango de pH de 4 a 6, la betanina es más fácilmente degradada a CDG y BA y ambas especies son susceptibles a degradación oxidativa. Esto también sostiene que la degradación de betanina en presencia de oxígeno es más pH dependiente que en ausencia de oxígeno. La cantidad de betanina degradada a 65 °C, cuando la regeneración del pigmento es permitida, en ausencia de oxígeno a valores de pH de 3 y 5, es igual; en presencia de oxígeno la cantidad de betanina degradada fue mayor a pH 3 y menor a pH 5 (Lugo, 1998).

2.13.3 Efecto de cationes metálicos.

Varios estudios han mostrado que los iones ferroso, férrico y cúprico promueven la decoloración del pigmento en productos de betabel. La adición de iones cúpricos a betanina en solución resulta en una inmediata pérdida de color. Se sugirió que la pérdida de color fue por la posible formación de complejos de betanina con iones Cu. En una investigación de formación de complejos de betanina y betanidina, solo los iones cúprico, cuproso y mercuríco causaron inmediato cambio de color; estos cambios de color son más notables con betanidina. Todas las reacciones de degradación se aceleran por acción catalítica de algunos metales, principalmente cobre (Badui, 1993; Lugo, 1998).

2.13.4 Efecto de antioxidantes.

La inestabilidad de betalaínas al oxígeno es una de las limitantes de su uso como colorante alimenticio. La adición de antioxidantes debe por lo tanto resultar en mejoramiento de la estabilidad. La adición de ácido ascórbico a jugo de betabel concentrado o polvo de extracto de betabel resulta en mejoramiento de la estabilidad del color, el ácido ascórbico protege el color rojo aún cuando es expuesto a tratamientos drásticos como esterilización. El ácido ascórbico ha sido reportado como el mejor estabilizante para garambullo [*Myrtillocactus geometrizans*] (García y col. 1998). Resultados en la literatura reportan marcadas diferencias entre ácido ascórbico e isoascórbico como estabilizadores del pigmento de betabel. El ácido isoascórbico ha sido

reportado como el agente estabilizante y antioxidante más efectivo, en presencia de trazas de cationes metálicos. Los cationes de Cu^{++} y Fe^{++} actúan como catalizadores en la oxidación de ácido ascórbico por oxígeno molecular. En presencia de un quelante metálico (EDTA o ácido cítrico) la cantidad de oxígeno se reduce (Reynoso, 1997). Los antioxidantes fenólicos (como BHA, BHT y α -tocoferol), que inhiben la oxidación en cadena por radicales libres, el sulfito, metabisulfito y tiosulfito de sodio, el ácido tiopropiónico y la cisteína no son efectivos para mantener la estabilización de la betanina. Estos resultados confirman que la betanina no se degrada por mecanismos de oxidación por radicales libres (Lugo, 1998).

2.13.5 Efecto de secuestrantes.

La presencia de EDTA, en niveles bajos (1 ppm), en solución incrementa la estabilidad de betanina. El efecto es pH dependiente siendo más efectivo entre pH 2 y 5. El mecanismo por el cual el EDTA reduce la oxidación de betanina puede ser explicado en parte por su habilidad para quelar cationes metálicos polivalentes. También es propuesto que protege a la betanina por directa interacción con su centro electrofílico (Lugo, 1998).

2.13.6 Efecto de actividad de agua.

La betanina se vuelve más inestable a medida que aumenta la actividad de agua y el contenido de humedad del alimento. La degradación de betanina requiere la hidrólisis de la molécula de betanina a CDG y BA. Esta reacción es altamente dependiente de la disponibilidad de agua, por consiguiente, un decremento en la actividad de agua corresponde a una menor degradación de betanina. Fue especulado que junto con el decremento de agua disponible, se reduce la movilidad de reactantes y la solubilidad de oxígeno molecular (Badui, 1993).

2.13.7 Efecto de la luz.

La exposición a la luz visible reduce la estabilidad de betalaínas. Generalmente es reconocido que bajo luz fluorescente, y en presencia de oxígeno, las betaxantinas son más lábiles que las betacianinas (Badui, 1993).

2.13.8 Efecto de enzimas.

Los colorantes naturales pueden ser degradados por varias enzimas encontradas en los tejidos vegetales. Los pigmentos son fácilmente destruidos por enzimas durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Estas enzimas pueden ser inactivadas mediante calor; la pérdida del pigmento puede ser minimizada mediante un escaldado durante 45 a 60 s, antes de congelar o pasteurizar (Huang y col. 1992; Zakharova, 1997). Las betalaínas se pueden decolorar por acción enzimática, el sistema enzimático betalainasa (en betabel y amaranto) muestra actividad óptima a 40 °C y pH de 3.4, observándose efectos menos drásticos al aumentar el pH. Las condiciones de anaerobiosis reducen la actividad enzimática, lo cual hace pensar en una betalainasa oxidasa (Badui, 1993; Rivera, 1994).

2.14 Betalaínas como aditivo alimentario.

Dado que existen restricciones de tipo legal en el uso de colorantes rojos sintéticos, se ha sugerido emplear las betalaínas en diversos alimentos. Estudios de toxicidad y seguridad (Reynoso, 1997) indican que las betalaínas pueden ser alternativas viables para colorantes sintéticos. Sin embargo, por las limitaciones de su estabilidad, su uso se restringe a ciertos productos en los que el pigmento se conserva más fácilmente. Las betalaínas se obtienen en forma de concentrado o de deshidratado a partir de una extracción acuosa a pH ácido; la purificación de los pigmentos se logra por medio de ultrafiltración y ósmosis inversa. Debido a su potencial se ha ensayado el cultivo de tejidos para producir betabeles con mayor cantidad de betaninas (Badui, 1993). Se ha sugerido aplicar las betalaínas en la elaboración de productos cárnicos embutidos, debido a que los nitritos

causan controversia por su implicación en la síntesis de nitrosaminas, se considera que la mezcla de betalaínas y sorbato de potasio puede sustituirlos. En embutidos con carne de pollo, el color producido por las betalaínas es más estable que el que producen los nitritos, y el sabor y la textura no se alteran (Vereltzis y col. 1984, Badui, 1993). Hasta ahora las betalaínas más estudiadas son las provenientes del betabel (*Beta vulgaris*), la concentración del pigmento es aproximadamente del 1% (Fennema, 1993). El jugo del betabel es fermentado por levaduras, con la finalidad de eliminar su alto contenido de azúcar, posteriormente el extracto de betabel es usado como preparado concentrado por evaporación del jugo de betabel bajo vacío, a un contenido total de sólidos de 40 a 60%; o como polvo que contiene de un 6 a un 7% de betacianinas, hecho por secado por pulverizador (aspersión) del concentrado. Ambos productos usualmente contienen ácido ascórbico o cítrico como estabilizante y como conservador propionato de sodio (Coulter, 1984; Marmión, 1991). Los sólidos de betabel o betanina en forma aislada que se usan como colorantes se conservan añadiendo antioxidantes y agentes secuestradores. El colorante es fácilmente soluble en agua; es razonablemente estable cuando es usado a pH entre 4 y 7 y es adecuadamente estable a la luz. Sin embargo es degradado fácilmente a temperaturas superiores a 50 °C, particularmente cuando es expuesto a aire o luz; es más estable al calor a pH entre 4 y 5. Por estas propiedades, las betalaínas son usadas en alimentos que reciban mínimo tratamiento térmico durante el procesado (cuando el tratamiento es necesario la degradación del colorante es minimizada por la adición de éste después o cerca del final del tratamiento), tengan baja actividad de agua y sean empacados minimizando la exposición a luz, oxígeno y humedad. Por todo lo anterior las betalaínas tienen aplicación en productos cárnicos, dulces, yogurts, helados, confiterías, mayonesas, substitutos de carne, bebidas en polvo, mezclas para pasteles, jugos de carne, malvaviscos, gelatinas y productos secos. Es adicionado en niveles de 0.1 a 1% basado en el peso del producto final (Marmión, 1991).

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

- ❖ Extraer, purificar e identificar parcialmente los pigmentos presentes en la cáscara de pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) provenientes de la Región Mixteca, así como, el evaluar su estabilidad frente a diferentes factores (pH, temperatura y luz).

3.2 Objetivos específicos.

- ❖ Extracción de los pigmentos presentes en la cáscara de pitaya (*Stenocereus stellatus*).
- ❖ Purificación e identificación parcial de los pigmentos presentes en el extracto crudo proveniente de cáscara de pitaya mediante técnicas cromatográficas y espectrofotométricas.
- ❖ Evaluar la estabilidad del extracto obtenido de la cáscara de pitaya bajo diferentes factores como: pH, temperatura y luz; utilizando técnicas espectrofotométricas para cuantificar la degradación del pigmento.

4. METODOLOGÍA.

4.1 Material biológico y preparación de la muestra.

Se trabajó con cáscaras de pitaya del género *Stenocereus stellatus* de la variedad roja provenientes de la región de Acaquizapan, Oaxaca y recolectadas en los meses de julio a noviembre del 2004. Se hizo la separación de las espinas con ayuda de pinzas y se procedió a la congelación del fruto (- 2 °C/48 horas). La separación de la cáscara se hizo de forma manual retirando los restos de pulpa que quedaban adheridos a la cáscara. Se determinó el porcentaje en peso de las fracciones de parte comestible del fruto (pulpa y semillas) y del residuo (cáscaras), usando una balanza granataria (CENT-0-GRAM. Balance. ®OHAUS) reportando su valor promedio. Una vez separadas las cáscaras se probaron dos tipos de tratamientos previos a la extracción que fueron: 1) cáscara que se deshidrató a 60 ± 2 °C hasta alcanzar una humedad final del 11% (aproximadamente 48 horas de secado), y 2) cáscara que se congeló de -2 a 4 °C (Lugo, 1998; Espín, 2000; Florian, 2002). Tanto las cáscaras deshidratadas como las congeladas se almacenaron en bolsas de plástico color negro cubiertas con papel aluminio para protegerlas de la luz. Antes de hacer la extracción de los pigmentos, las cáscaras deshidratadas y congeladas se molieron en una picadora PLUS Moulinex por un tiempo de 10 s. Para el caso de la cáscara congelada se descongeló a temperatura ambiente antes de realizar la extracción.

4.2 Extracción del pigmento.

El método que se usó para la extracción de los pigmentos fue un sistema de extracción sólido-líquido, para lo cual se probaron los diferentes disolventes que se han utilizado para la obtención de los principales pigmentos presentes en otros frutos de cactáceas como son betalainas, clorofilas y carotenoides (Lugo, 1998; Yizhong, 2001; <http://www.encolombia.com/ciencias/arteyciencia91398-clorofila.htm>) [Tabla 3].

Tabla 3. Disolventes usados en las diferentes extracciones.

Disolvente	Para la extracción de:
Agua destilada	Betalainas
Metanol 80%	Betalainas
Etanol 96%	Clorofila y carotenoides
Mezcla de alcohol potásico al 20% con metanol al 85% (4:1) y éter de petróleo (1:2)	Clorofila y carotenoides
Éter de petróleo	Clorofila y carotenoides

(Lugo, 1998; Yizhong, 2001; <http://www.encolombia.com/ciencias/arteyciencia91398-clorofila.htm>).

La técnica general para la extracción de los pigmentos se describe a continuación:

1. La cáscara molida (seca o congelada) se mezcló con el disolvente en una relación [1:3] peso / volumen.
2. Se mantuvo en agitación magnética durante un tiempo de 2 h a temperatura ambiente manteniendo el matraz cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz.
3. Se separó el extracto colorido del material sólido haciendo una filtración por gravedad con papel Whatman # 1.
4. Al sólido separado se le extrajo el remanente de pigmentos con una porción del 10% del disolvente con respecto a la relación inicial.
5. Se centrifugó a 5000 rpm (Centrifuga IEC HN-SII. Internacional Equipment Company) con potencia para 9000 rpm) [2795 gravedades] durante 10 minutos para eliminar las partículas que pudieron pasar a través del papel filtro.
6. El sobrenadante se separó por medio de una decantación eliminando los sólidos sedimentados.
7. El extracto se almacenó a temperaturas de refrigeración (0 ± 4 °C) [Refrigerador ACROS Automatic] en recipientes cerrados y protegidos de la luz (cubiertos de papel aluminio y en bolsas negras) hasta que se utilizó para su estudio.

Los criterios que se utilizaron para escoger al mejor disolvente de extracción fueron la facilidad y menor tiempo requerido para la filtración del extracto y la presencia de picos característicos de absorción de los principales grupos de pigmentos presentes en las cactáceas (Clorofila **a** 663 nm, clorofila **b** 645 nm, β -caroteno 450 nm, licopeno 502 nm, betacianinas 540, 538, 535 nm y betaxantinas 470, 474 y 478 nm) [Hernández y col. 1977; Lugo, 1998, Yizhong, 1998; Clydesdale 2000; Yizhong, 2001].

4.3 Separación y purificación parcial del extracto.

Una vez seleccionado el mejor proceso de extracción se realizó una cromatografía en papel para observar si se tenían manchas coloridas usando como eluyentes dos disolventes una mezcla de acetato de etilo-ácido fórmico-agua (35:7:10) y agua destilada (Lugo, 1998). Como agente revelador se usaron yodo y luz UV. Posteriormente el extracto seleccionado se purificó parcialmente por medio de una cromatografía en columna, usando como matriz (fase estacionaria) Sílica gel 60 Sigma-Aldrich (0.063-0.200 mm para cromatografía en columna) y como eluyente agua destilada. El pigmento fue pasado a través de la columna cromatográfica tres veces con el fin de tenerlo de manera más pura para su identificación parcial.

4.4 Identificación parcial del pigmento de la cáscara de pitaya.

Las fracciones coloridas colectadas se identificaron parcialmente por medio de espectrofotometría al comparar sus picos de absorción máxima con los de referencias (Yizhong, 1998 y 2001). Para hacer la lectura de las muestras se hizo una dilución de un mL de la fracción con diez mL de agua destilada. El barrido espectrofotométrico se hizo utilizando un Espectrofotómetro Perkin Elmer. Lambda 35 UV/VIS, con celdas de cuarzo de un centímetro.

4.5 Cuantificación del pigmento de la cáscara de pitaya.

La cuantificación de las betalainas se realizó usando el método de espectrofotometría de Yizhong (1998 y 2001). Con este método se determinaron las betacianinas y las betaxantinas sin necesidad de separarlas ya que la estabilidad de las betacianinas y betaxantinas disminuyen cuando son separadas.

Los valores de extinción (ϵ) usados para determinar la cantidad de pigmento fueron de 6.16×10^4 para betacianinas y 4.80×10^4 para betaxantinas a sus respectivas absorbancias máximas (538 nm para betacianinas y 474 nm para betaxantinas) [Yizhong, 2001]. Las lecturas fueron realizadas en celdas de cuarzo de un centímetro usando el Espectrofotómetro Perkin Elmer. Lambda 35 UV/VIS.

La cantidad de pigmento presente en la cáscara fue calculado con base a la siguiente ecuación (Lugo, 1998; Yizhong, 1998 y 2001):

$$(Z) \text{ Betalainas (mg / mL extracto)} = (A_{\lambda_{\text{máx}}} / \epsilon) * FD$$

$$\text{Betalainas (mg / g cáscara)} = (Z) * (\text{Vol. Extracto [mL]} / \text{peso de la cáscara [g]})$$

Donde:

(Z) = Betalainas (mg / mL extracto).

$A_{\lambda_{\text{máx}}}$ = Absorbancia máxima a longitud de onda (538 nm o 474 nm).

ϵ = Coeficiente de extinción.

FD = Factor de dilución.

El porcentaje de pigmento retenido (%P.R.) fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Lugo, 1998; Yizhong, 1998; Arena 2000):

$$\%P.R. = (C.P.T_x / C.P.T_0) \times 100$$

Donde:

%P.R.: Porcentaje de pigmento retenido.

C.P.T_x = Contenido de pigmento en el tiempo “x” (mg / g cáscara).

C.P.T₀ = Contenido de pigmento en el tiempo cero (mg / g cáscara).

4.6 Estudio de estabilidad.

El estudio de estabilidad se llevó a cabo durante cuatro semanas haciendo el monitoreo cada semana. El extracto obtenido con el mejor solvente fue sometido a la combinación de diferentes factores fisicoquímicos como fueron:

- Temperatura: se probaron tres diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C y 68 °C). Estas temperaturas fueron escogidas debido a que la mayoría de los alimentos se almacenan a estas temperaturas o en caso de tener algún tratamiento térmico se pueden alcanzar temperaturas altas como los 68 °C. Para mantener la temperatura de 4 °C se utilizó un Refrigerador [ACROS Automatic], los 25 °C correspondieron a las muestras mantenidas a temperatura ambiente y para la de 68 °C se usó una estufa (CECSA. Técnica Científica, S.A. Modelo 10HD+33).
- pH: se probaron tres valores de pH (4, 5 y 6) ya que la mayoría de los alimentos consumidos mantienen estos valores de pH. Para ajustar el pH del extracto a los valores requeridos se utilizó hidróxido de sodio 0.1 N y ácido clorhídrico 0.1 N [Reactivo Baker®]).
- Luz: se mantuvieron las muestras en oscuridad (protegidos con papel aluminio) y en presencia de luz (sin protección).

En la Tabla 4 se puede observar cómo se codificaron las muestras para los diferentes tratamientos (estudio de estabilidad).

Para observar la degradación del pigmento con respecto al tiempo se utilizó como variable de respuesta el porcentaje de pigmento retenido (Lugo, 1998; Yizhong, 1998; Arena 2000).

Tabla 4. Códigos para pruebas o tratamientos de estabilidad.

Prueba	Código
1	A1B1C1
2	A2B1C1
3	A1B1C2
4	A2B1C2
5	A1B1C3
6	A2B1C3
7	A1B2C1
8	A2B2C1
9	A1B2C2
10	A2B2C2
11	A1B2C3
12	A2B2C3
13	A1B3C1
14	A2B3C1
15	A1B3C2
16	A2B3C2
17	A1B3C3
18	A2B3C3

Donde:

A = Luz.	A1 = Luz	A2 = Oscuridad	
B = Temperatura.	B1 = 4 °C	B2 = 25 °C	B3 = 68 °C
C = pH	C1 = 4	C2 = 5	C3 = 6

4.7 Análisis estadístico.

En cada experimento se realizaron dos réplicas, cada una con tres repeticiones. En el caso del proceso de extracción se hicieron tres repeticiones utilizando muestras aleatorias combinadas.

Para evaluar la estabilidad del extracto se planteó un diseño experimental factorial $3 \times 3 \times 2$, donde los factores fueron temperatura, pH y luz y como variable de respuesta el porcentaje de pigmento retenido. Para el análisis de varianza (ANOVA) de los factores probados se utilizó un diseño por bloques (Montgomery, 1991) y el programa de computadora Microsoft Excel del paquete Microsoft Office Versión Xp para el sistema operativo Windows Xp (los datos numéricos usados se incluyen en el apartado de Anexos [para betacianinas y betaxantinas]) Las interacciones entre los factores se analizaron con el programa Design-Expert 6.0.11.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Peso y composición promedio de la pitaya.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos con respecto a las fracciones encontradas en el fruto tanto para la parte comestible (pulpa y semillas) como para el residuo (cáscara).

Tabla 5. Composición promedio de las partes de la pitaya roja (*Stenocereus stellatus*).

	Peso promedio obtenido de las partes de la pitaya		Referencia (Luna-Morales y col. 2001)	
	Peso Promedio (g)	Porcentaje (%)	Peso Promedio (g)	Porcentaje (%)
Fruto Entero	105.44 ± 17.0	100	106.80	100
Cáscara	22.49 ± 3.0	21.33	22.54	21.10
Parte comestible (pulpa y semilla)	82.95 ± 14.0	78.67	83.79	78.45

Como puede observarse, el porcentaje de residuo de cáscara de la pitaya roja fue de alrededor del 20 % lo que concuerda con los datos reportados por Pimienta (1999), Luna-Morales y col. (2001).

5.2 Extracción del pigmento.

La extracción del pigmento se hizo tanto para la cáscara seca como para la cáscara congelada probando los cinco diferentes disolventes: agua, metanol al 80 %, etanol al 96%, éter de petróleo y una mezcla de disolventes (alcohol potásico 20%, metanol 85% y éter de petróleo). Al utilizar la cáscara seca para la extracción de los pigmentos se presentó el problema de la tendencia de ésta a formar conglomerados al momento de hidratarse con los disolventes, lo que provocó volúmenes de extracción bajos (menores de 60 mL) y tiempos largos de filtración, lo que favoreció la degradación de los pigmentos por haberse expuesto durante más tiempo a la luz y al aire. Esta

descomposición se debió principalmente a las reacciones de oxidación que se presentan en los pigmentos naturales cuando son expuestos a factores externos como la luz y el aire (Badui, 1993; Lugo, 1998; Clydesdale, 2000). Además aunque los extractos obtenidos con la cáscara seca presentaban una coloración roja tenue, al realizar el barrido espectrofotométrico desde los 200 nm hasta los 700 nm, no se registraron los picos característicos de absorción de los pigmentos (para ninguno de los disolventes), lo que corroboró que éstos se encontraban degradados. Posiblemente, la descomposición acentuada de los pigmentos también se incrementó por haberle aplicado una temperatura elevada a las cáscaras al deshidratarlas (60 ° C), ya que la temperatura también es otro factor importante en la estabilidad de los pigmentos naturales (Badui, 1993; Lugo, 1998; Clydesdale, 2000). Por todas estas razones, se tomó la decisión de no continuar el estudio con las cáscaras deshidratadas y sólo se siguió con la cáscara congelada.

Con respecto a la cáscara congelada, independientemente del tipo de disolvente utilizado, se obtuvo un extracto colorido de tonalidad roja (Tabla 6). Los volúmenes de extracción para los diferentes disolventes oscilaron desde 60 mL hasta 89 mL por cada 100 g de muestra, teniendo una mayor afinidad por los disolventes polares como el agua destilada, el metanol al 80% y el etanol al 96%. Una de las diferencias importantes entre los diferentes disolventes probados fue el tiempo de filtrado, favoreciéndose éste al usar metanol al 80% y etanol al 96%. La razón por la cual se tuvieron con estos dos disolventes menores tiempos de filtrado fue porque ayudaron a precipitar a las pectinas presentes en la cáscara, lo que facilitó la operación de filtrado, cosa que no sucedió con los demás disolventes. Sin embargo, la desventaja que presentó el etanol al 96% con respecto al metanol al 80% fue que el extracto colorido del etanol se decoloraba rápidamente. Por lo tanto, con base en los resultados anteriores se seleccionó al metanol al 80% como el disolvente más adecuado para la extracción de los pigmentos de cáscara congelada de pitaya, ya que fue el disolvente que permitió obtener el mayor volumen de extracción (cerca de 90 mL), requirió de menos tiempo de filtrado (ya que el extracto no arrastraba las pectinas de la cáscara debido a que este disolvente las precipitó durante la extracción) y sí se observaron picos de absorción cuando se le hizo el barrido espectrofotométrico.

Tabla 6. Comparación de los diferentes disolventes usados en el proceso de extracción de cáscara congelada

Solvente	Pigmentos que extrae	Características
Agua destilada	Betalainas	Extracto de color rojo intenso. Tendía a hidratar a la cáscara congelada lo que repercutió en un mayor tiempo de filtrado y por ende mayor contacto con luz y aire (oxidación).
Metanol 80%	Betalainas	Extracto de color rojo intenso. No presentó el fenómeno de hidratar a la cáscara, por lo tanto, el tiempo de filtrado fue menor (menor oxidación). Además, ayudó a precipitar las pectinas y el pigmento remanente en la fibra se extrae con metanol al 80% en un volumen relativamente bajo.
Etanol 96%	Clorofila y carotenoides	Extracto de color rojo no tan intenso como los dos anteriores. Aunque este alcohol también precipita pectinas, el pigmento se decolora rápidamente, de rojo a un color amarilla. Eleva los costos por el precio del disolvente.
Mezcla de disolventes	Clorofila y carotenoides	Extracto de color rojo, mayor tiempo de filtración. Poco extracto recuperado por la naturaleza de los disolventes
Éter de petróleo	Clorofila y carotenoides	Extracto color rojo, poco extracto recuperado y eleva los costos de extracción por el precio del disolvente y su eliminación no es fácil.

Con la finalidad de identificar parcialmente el tipo de pigmento que estaba presente en el extracto metanólico de la cáscara congelada, se hizo un barrido espectrofotométrico de 200 a 700 nm, ya que los principales pigmentos que se han reportado en cactáceas absorben en este intervalo. Por ejemplo, dentro de las betalainas se encuentran las betacianinas, las cuales absorben a 535, 538 y 540 nm; para el caso de las betaxantinas, éstas absorben a longitudes de onda de 470, 474 y 478 nm (Lugo, 1998, Yizhong, 1998; Clydesdale 2000; Yizhong, 2001). Las clorofilas absorben a 663 nm para la clorofila **a** y a 645 nm para la clorofila **b**; otros pigmentos que se han reportado en cactáceas son los carotenoides (el β -caroteno absorbe a 450 nm y el licopeno a 502 nm) [Hernández y col. 1977]. Como los extractos que se obtuvieron eran de color rojo y solubles predominantemente en disolventes polares, indicaba la posibilidad de tener pigmentos del

tipo betaciánicos, ya que estos pigmentos son moléculas hidrosolubles de color violáceo o amarillas dependiendo del tipo de pigmento presente (betacianina o betaxantina), que al mezclarse forman el color rojo (Badui, 1993; Lugo, 1998). De hecho, al realizar el barrido espectrofotométrico para el extracto metanólico se observaron solamente dos picos que correspondían a las longitudes de onda del grupo de las betalainas (480 nm y 540 nm). Estos resultados, concuerdan con lo reportado por Lugo (1998) y García (2000) en donde el pigmento mayoritario presente en extracto de pulpa de pitaya del género *Stenocereus*, especie *queretaroensis* pertenece a este grupo de pigmentos. No se presentaron los picos de absorción característicos para clorofilas o carotenoides.

5.3 Separación y purificación parcial del extracto.

Después de haber hecho la identificación espectrofotométrica de los pigmentos presentes en el extracto de metanol al 80% y que correspondieron al grupo de las betalainas, se hizo su purificación parcial por medio de cromatografía en columna usando como matriz silicagel y como eluyente agua destilada. El eluyente se escogió después de haber realizado un estudio preliminar de cromatografía en papel usando como eluyentes dos solventes una mezcla de acetato de etilo-ácido fórmico-agua [35:7:10] y agua destilada; según las recomendaciones que hace Lugo (1998) para el caso de betalainas presentes en pulpa de pitaya. En esta ocasión el agua destilada resultó ser mejor eluyente en la cromatografía en papel, debido a que las betalainas son estructuras polares e hidrosolubles. Al revelar el cromatograma (con yodo y luz U.V.) se observaron dos manchas pegadas pero que se podían diferenciar perfectamente una de color amarilla y otra mancha de color morado. Aunque no se corrieron estándares en la cromatografía de papel de pigmentos tipo betalainas, dadas las coloraciones de las manchas y por los picos de absorción que se registraron en el espectro de absorción del extracto metanólico, se dedujo que posiblemente la mancha amarilla correspondía a pigmentos del grupo de las betaxantinas (las cuales absorbieron a 480 nm) y la mancha morada correspondía a las betacianinas (las cuales absorbieron a 540 nm).

Para la purificación parcial del extracto metanólico fue necesario pasarlo tres veces a través de la columna. Después de pasarla por la columna el extracto se separó en tres fracciones denominadas I, II y III cada una de 5 mL aproximadamente (Fig. 20).

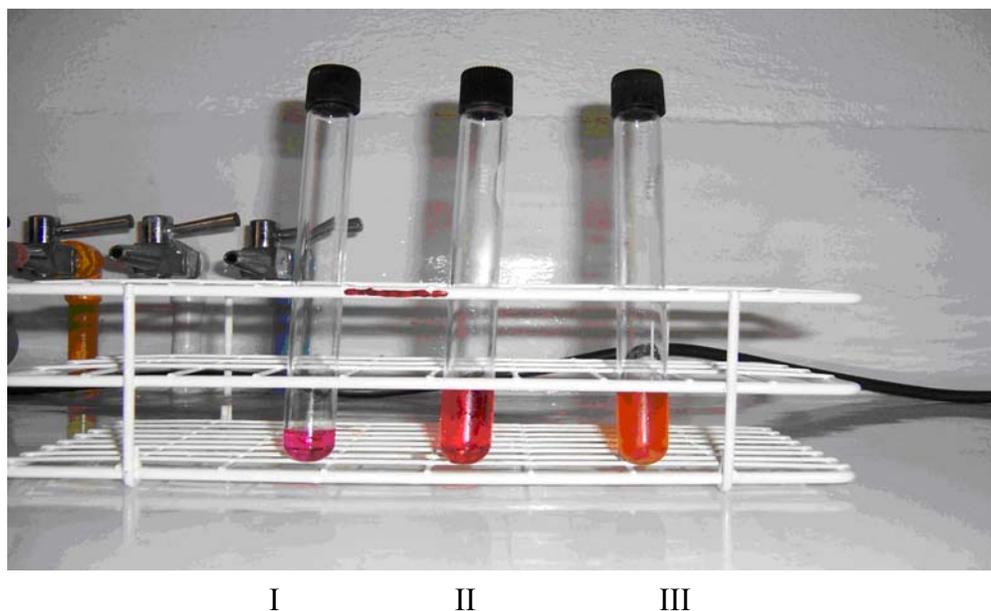


Figura 20. Fracciones colectadas por cromatografía en columna (Fracción I de color morado, Fracción II color rojo y Fracción III color amarillo).

La fracción I fue la primera que salió de la columna cromatográfica y que dado su color morado (violeta o púrpura) posiblemente se trataba del grupo de las betacianinas (Badui, 1998; Lugo, 1998; Clydesdale, 2000). La fracción II fue la segunda en salir de la columna y presentaba un color rojo que posiblemente correspondía a la mezcla de los dos tipos de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) según lo reportado por Lugo (1998) y Clydesdale (2000). Esta mezcla se presentó porque seguramente a pesar de haber pasado tres veces las fracciones en la columna las condiciones de separación no fueron las adecuadas para poder hacer la disociación total de ambos grupos de pigmentos. Además, se sabe que no es fácil el separar a las betacianinas de las betaxantinas debido a la relación estructural química que presentan (Lugo, 1998 y García, 2000). Por último, se colectó a la fracción III que presentó un color amarillo-anaranjado, que debido a esta característica indicaba que posiblemente se trataba del grupo de las betaxantinas (Badui, 1993; Clydesdale, 2000).

5.4 Identificación parcial de los pigmentos presentes en el extracto

Las fracciones coloridas colectadas (I, II y III) se identificaron parcialmente por medio de espectrofotometría al comparar sus picos de absorción máxima con los de referencias.

En la Fig. 21 se observa el espectro de absorción de la Fracción I. Como se puede apreciar se registraron dos picos uno a 480 nm que es característico de las betaxantinas (Lugo, 1998; García, 2000; Yizhong, 2001) y otro a 540 nm que es característico de las betacianinas (Lugo, 1998; García, 2000; Yizhong, 2001). De hecho, se logra apreciar de forma más definida el pico de 480 nm. Esto indica que aunque se observa visualmente el color característico de las betacianinas (morado), en esta fracción aún quedó una parte de betaxantinas que no se lograron separar. Posiblemente, la separación de ambos pigmentos se puede lograr si se usa una matriz de columna con más afinidad por las betacianinas o betaxantinas, o cambiando la polaridad del eluyente.

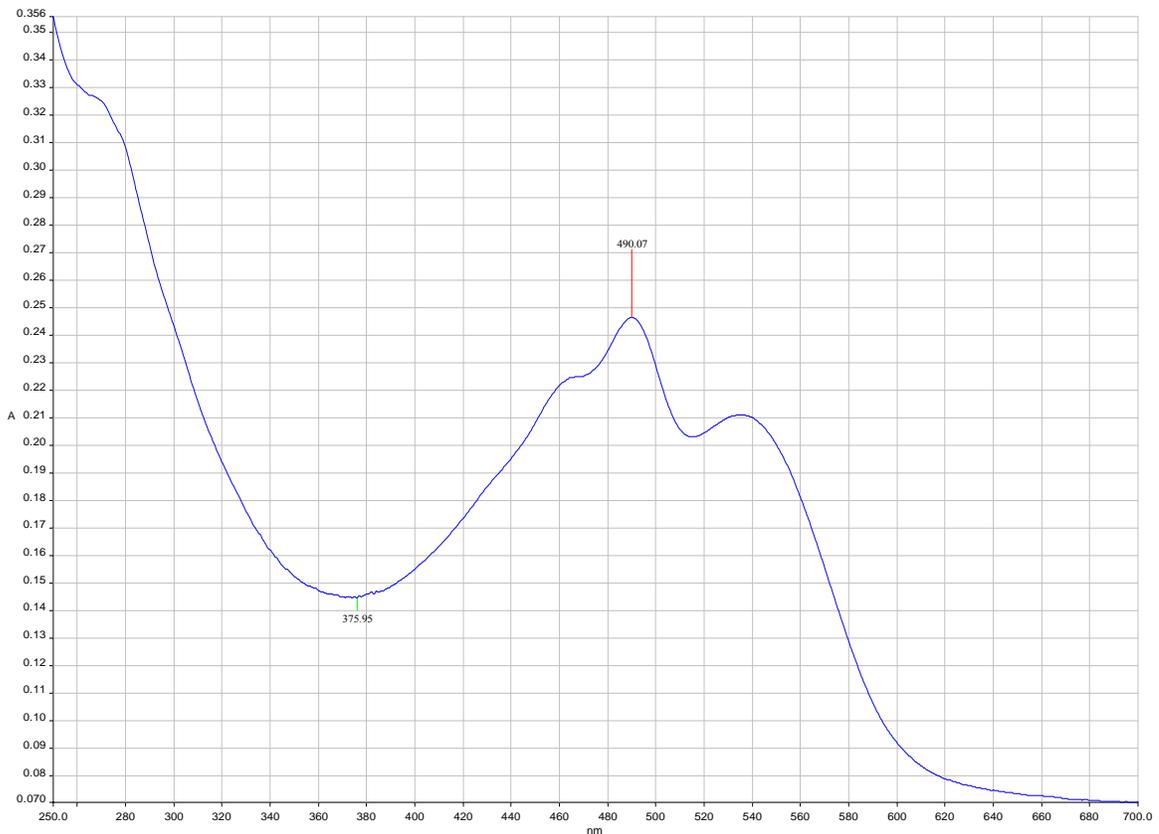


Figura 21. Espectro de absorción de la Fracción I (posible betacianinas).

Con respecto al espectro de absorción de la fracción II, se obtuvieron dos picos de magnitudes similares uno a 480 nm y otro a 540 nm. Estos resultados demuestran lo reportado por Lugo (1998) en donde el color rojo que se observa visualmente corresponde a una mezcla de ambos grupos de pigmentos tanto de betalaínas como de betaxantinas.

En la Fig. 22 se observa el espectro de absorción de la fracción III. Se puede apreciar que a diferencia de la fracción I sólo se registró un pico de absorción a 480 nm. Al comparar este pico con el reportado en referencia (García, 2000) se encontró que los picos coincidieron, por lo que el color amarillo de esta fracción se debió a la presencia de betaxantinas, pudiéndose separar del otro grupo de betalaínas que son las betacianinas.

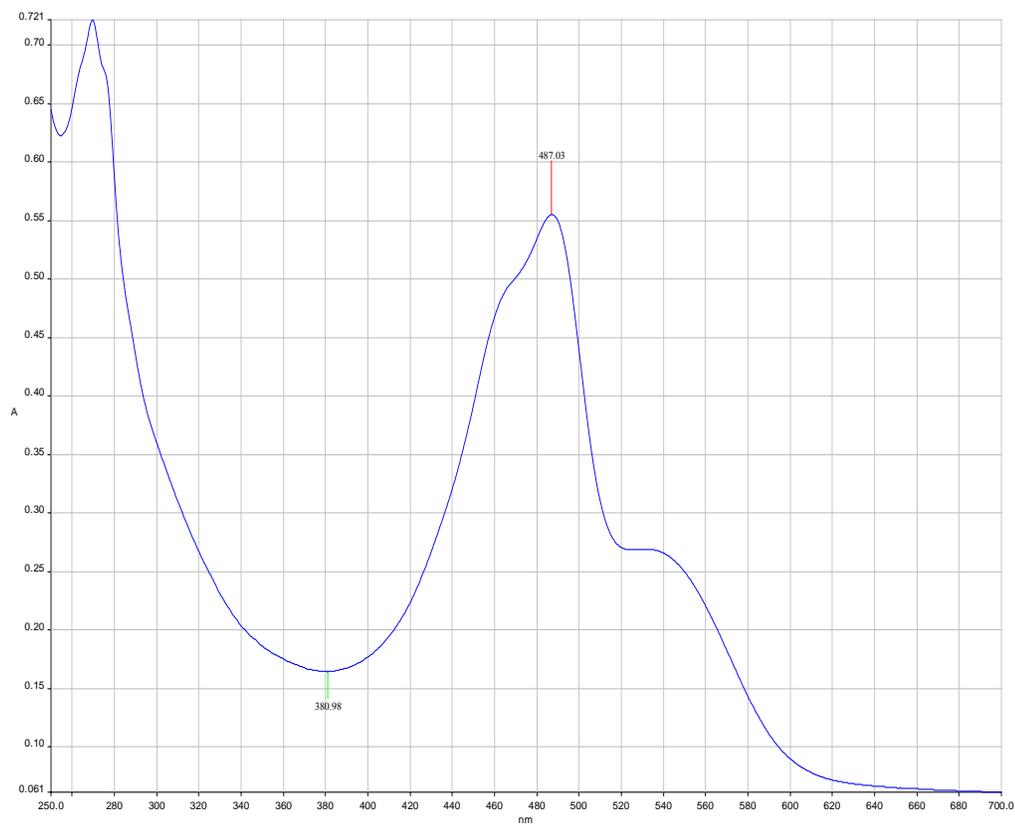


Figura 22. Espectro de absorción de la fracción III (posible betaxantinas).

Por lo tanto, después de observar los espectros de absorción de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto de pitaya roja, se puede decir que la cáscara de la pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) posee pigmentos del tipo betalaínas tanto betacianinas (absorción entre 535 y 540 nm) como betaxantinas (absorción a 480 nm).

Además, la mezcla de estos pigmentos le da el color rojo característico al extracto de la pitaya. Todos estos resultados concuerdan con lo reportado por Lugo (1998), García (2000) y Soriano y col. (2004), en donde, este tipo de pigmentos ya han sido reportados dentro de otras cactáceas como son la jiotilla, la tuna y otras especies de pitaya, por lo que, era de esperarse que también los pigmentos presentes en *Stenocereus stellatus* fueran betalainas. Incluso ya se han identificado los tipos de betalainas presentes en la familia de las cactáceas del género *Stenocereus*. Por ejemplo, está la betanina que representa hasta un 95% del total de las betacianinas, la isobetanina y filocactina aisladas también del cactus *Opuntia ficus-indica* (Lugo, 1998, García, 2000 y Florian, 2002). Dentro de las betaxantinas se encuentran la vulgaxantina I y la indicaxantina (García, 2000).

5.5 Cuantificación del pigmento de la cáscara de pitaya.

La concentración promedio de betalainas presentes en el extracto metanólico de cáscara de pitaya roja fue de 0.0032 mg / 100 g de cáscara. Si se compara esta cantidad de pigmento obtenido con respecto al rendimiento que se tiene con la pulpa de pitaya (*Stenocereus queretaroensis*), se encontró que la cáscara tuvo un rendimiento bajo ya que sólo se logró obtener una cantidad que representa cerca de un 5 a un 10% de la concentración promedio de betalainas extraídas con pulpa (Lugo, 1998 y García, 2000). Esto era de esperarse ya que la mayor parte de los pigmentos se encuentran localizados en la pulpa y no tanto en las cáscaras. Sin embargo, al menos sí se pudo extraer una parte de este componente en el residuo.

Por otra parte, se encontró que la concentración de betacianinas representaron de un 40 a un 45% del total de las betalainas y la concentración de betaxantinas fue de un 60 a un 55% del total de las betalainas de la cáscara de pitaya de *Stenocereus stellatus* (Tabla 7). Estos porcentajes concuerdan con los reportados en estudios relacionados con pigmentos extraídos de la pulpa de la familia de las cactáceas del género *Stenocereus* pero especie *queretaroensis* (Lugo, 1998 y García, 2000), donde se menciona que el porcentaje de betacianinas presentes en el extracto de pulpa de pitaya roja es de 23 a 40% y el de betaxantinas es de 60 y 77% del total de las betalainas.

Tabla 7. Concentración promedio de las betalaínas en las muestras.

Número de muestra	Betacianinas (mg / g cáscara)	Betaxantinas (mg / g cáscara)
1	$1.2792 * 10^{-3}$	$1.5954 * 10^{-3}$
2	$1.2718 * 10^{-3}$	$1.5933 * 10^{-3}$
3	$1.4585 * 10^{-3}$	$1.8699 * 10^{-3}$
4	$1.4586 * 10^{-3}$	$1.8705 * 10^{-3}$
5	$1.4607 * 10^{-3}$	$1.8733 * 10^{-3}$
6	$1.4608 * 10^{-3}$	$1.8735 * 10^{-3}$
7	$1.2705 * 10^{-3}$	$1.5774 * 10^{-3}$
8	$1.2742 * 10^{-3}$	$1.5799 * 10^{-3}$
9	$1.4577 * 10^{-3}$	$1.8682 * 10^{-3}$
10	$1.4576 * 10^{-3}$	$1.8690 * 10^{-3}$
11	$1.4604 * 10^{-3}$	$1.8722 * 10^{-3}$
12	$1.4604 * 10^{-3}$	$1.8724 * 10^{-3}$
13	$1.2948 * 10^{-3}$	$1.5690 * 10^{-3}$
14	$1.1785 * 10^{-3}$	$1.5648 * 10^{-3}$
15	$1.4578 * 10^{-3}$	$1.8684 * 10^{-3}$
16	$1.4570 * 10^{-3}$	$1.8676 * 10^{-3}$
17	$1.4603 * 10^{-3}$	$1.8718 * 10^{-3}$
18	$1.4605 * 10^{-3}$	$1.8720 * 10^{-3}$
Promedio	$1.3933 * 10^{-3}$	$1.7738 * 10^{-3}$

5.6 Estudio de estabilidad.

El monitoreo del estudio de estabilidad del extracto metanólico se realizó por un período de cuatro semanas, realizando el monitoreo cada semana para hacer las lecturas espectrofotométricas y poder calcular el porcentaje de pigmento retenido en el transcurso del tiempo para cada uno de los factores probados (pH, temperatura y luz) [Lugo, 1998; Yizhong, 1998; Arena 2000].

5.6.1 Efecto de la luz, pH y temperatura sobre el pigmento.

5.6.1.1 Efecto de la luz.

En la Figura 23 y 24 se muestra el comportamiento del porcentaje de pigmento retenido (ya sea betacianinas o betaxantinas) en función del tiempo, para las muestras que se mantuvieron en un pH constante de 5, una temperatura constante de 4 ° C y como factor variable la presencia o no de luz. Como era de esperarse, independientemente del tipo de pigmento analizado las muestras que se mantuvieron en oscuridad retuvieron más pigmento con respecto a las muestras en presencia de luz, lo que concuerda con lo reportado por Cano (1987), Rivera (1994) y Yizhong (1998) para los pigmentos de betalaínas. Por ejemplo, en el caso de las betacianinas, en oscuridad se retuvo un 7% más de pigmento y para las betaxantinas un 4% (Tabla 8).

Tabla. 8. Porcentaje de pigmento retenido al final del tratamiento respecto a la luz.

Pigmento	Luz	Oscuridad
Betacianinas	48.5 ± 0.20%	55.7 ± 0.15 %
Betaxantinas	58.2 ± 0.17%	62.2 ± 0.13 %

También, se puede apreciar que al comparar ambos grupos de pigmentos las betacianinas fueron más sensibles a la luz ya que se degradaron en un 52% en presencia de luz o un 45% en oscuridad mientras que las betaxantinas bajo las mismas condiciones sólo se degradaron un 42% en presencia de luz y un 37% en oscuridad. La pérdida de pigmento por el efecto de la luz se debe a que tanto la radiación electromagnética como el oxígeno aceleran las reacciones para que se rompa la estructura de resonancia de los pigmentos, los cuales son las responsables de impartir el color amarillo y rojo que exhiben las betaxantinas y betacianinas respectivamente (Badui, 1993).

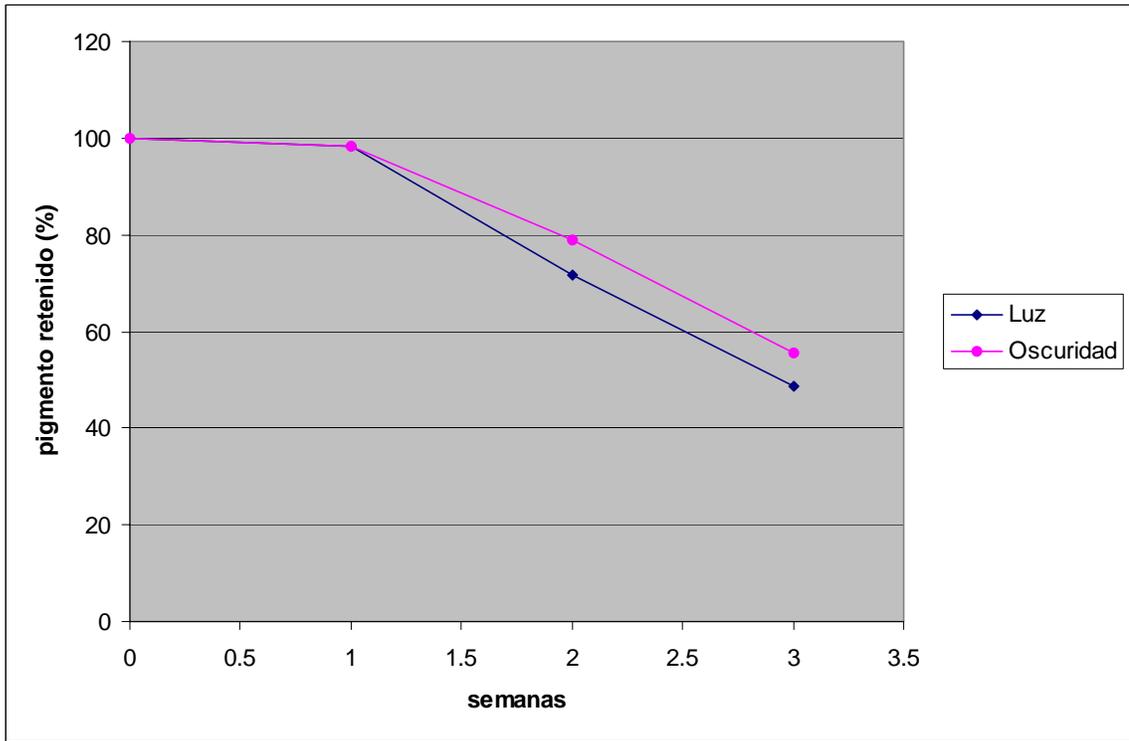


Figura 23. Efecto de la luz sobre la estabilidad de las betacianinas.

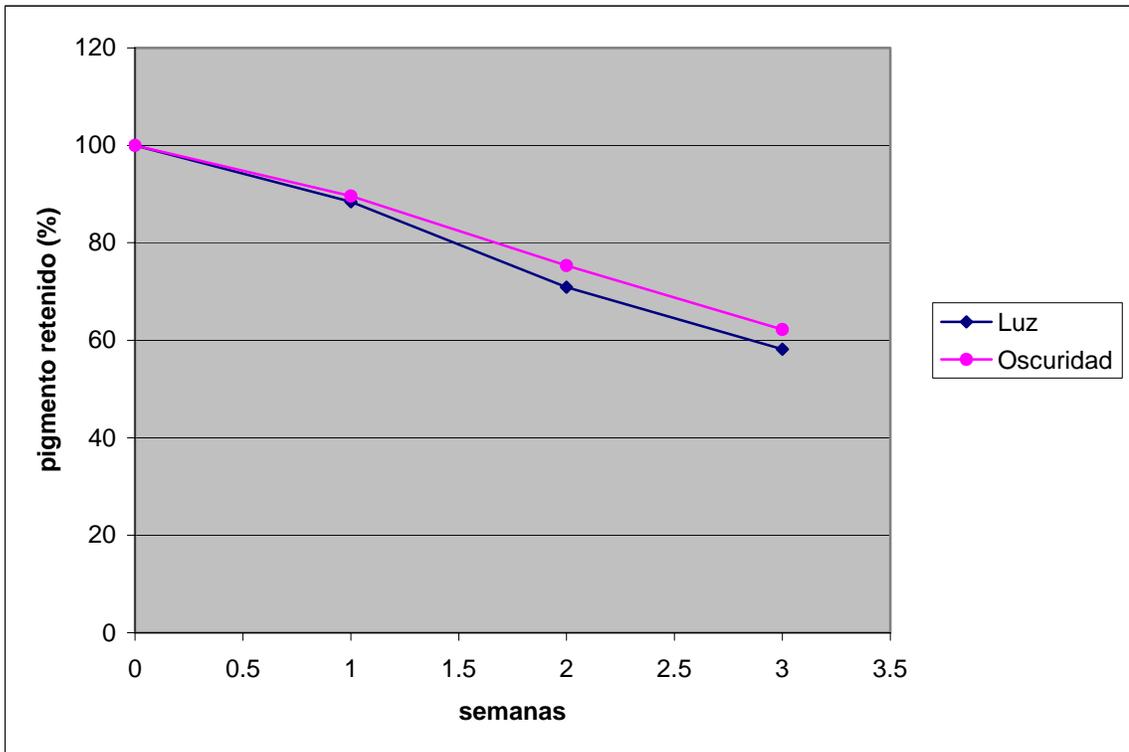


Figura 24. Efecto de la luz sobre la estabilidad de las betaxantinas.

Aunque se aprecian diferencias en cuanto al comportamiento de los gráficos para los pigmentos en función de la luz, al analizar estadísticamente los resultados obtenidos se encontró que las muestras expuestas a la luz y las muestras que estuvieron en condiciones de oscuridad no tuvieron una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de pigmento retenido (α de 0.05) [Tabla 9].

Tabla 9. ANOVA de la estabilidad del pigmento de cáscara de pitaya en relación a la presencia o ausencia de luz.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo de Tablas
Tratamientos	7308.1874	3	2436.06	1.13	3.86
Bloques	22730.6671	3	7576.89		
Error	19326.8482	9	2147.43		
Total	49365.7028	15			

5.6.1.2 Efecto del pH.

En la Figura 25 y 26 se observa el comportamiento del porcentaje de pigmento retenido (ya sea betacianinas o betaxantinas) en función del tiempo, para las muestras que se mantuvieron a una temperatura constante de 4 °C, en ausencia de luz y como factor variable el pH (4, 5 y 6). Se encontró que tanto para las betacianinas como para las betaxantinas el pH donde se obtuvo una mayor estabilidad fue el de 5 seguido por el de 6 y al último el de 4. Para las betacianinas a un pH de 5 se perdió un 45 % mientras que a pH de 4 la pérdida fue de un 67% y para las betaxantinas a un pH de 5 se perdió un 38% y en el pH de 4 un 53% (Tabla 10). Esto concuerda con estudios hechos anteriormente por Sapers (1979), Reynoso (1997) y García (1998), donde mencionan que las betalaínas son más estables a pH de 5 o en un intervalo de 4.8 a 5.2. La razón por la cual se retuvo una mayor cantidad de pigmento en el valor de pH de 5, se puede explicar a que en este pH existe una menor cantidad de oxígeno lo que disminuyó la degradación oxidativa. Sin embargo, fuera de este valor de pH (4 y 6), el número de moles de oxígeno posiblemente excedió el número de moles de betanina en solución, por lo que, más de una molécula de oxígeno pudo interactuar con cada molécula de betanina siendo más fácilmente degradada a CDG y BA, las cuales son especies altamente susceptibles a degradación oxidativa (Lugo, 1998).

Tabla 10. Porcentaje de pigmento retenido al final del tratamiento respecto al pH.

Pigmento	pH 4	pH 5	pH 6
Betacianinas	33 % ± 0.22%	55 % ± 0.15%	49 ± 0.19%
Betaxantinas	47 % ± 0.20%	62 % ± 0.15%	52 ± 0.17%

Al comparar los comportamientos de los dos grupos de betalaínas, se encontró que las betaxantinas retuvieron mayor pigmento en los tres valores de pH en comparación con las betacianinas (14% mayor en pH de 4, 7% mayor en pH de 5 y 3% más en pH 6). También se observó que a partir de la tercera semana de tratamiento la degradación fue más notoria (Fig. 25) independientemente del pH del extracto. Incluso, se encontró que el pH afectó más al pigmento que el factor anterior de la presencia o no de luz, teniendo mayores pérdidas al final de las cuatro semanas.

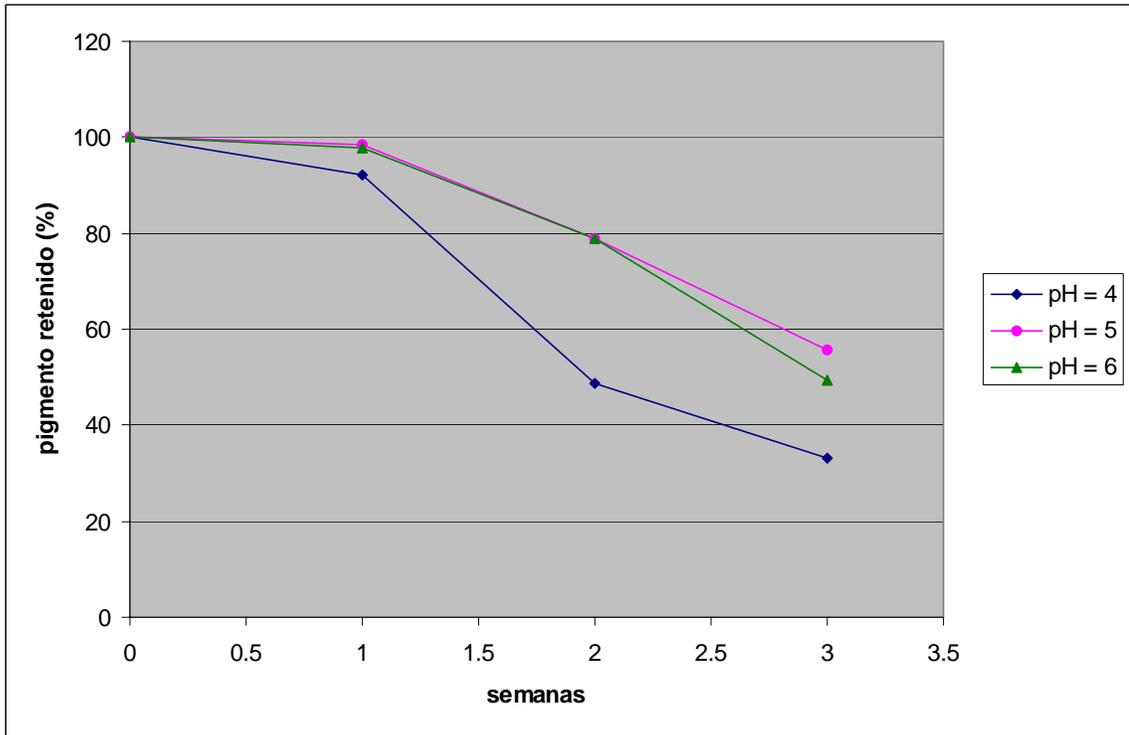


Figura 25. Efecto del pH sobre la estabilidad de las betacianinas.

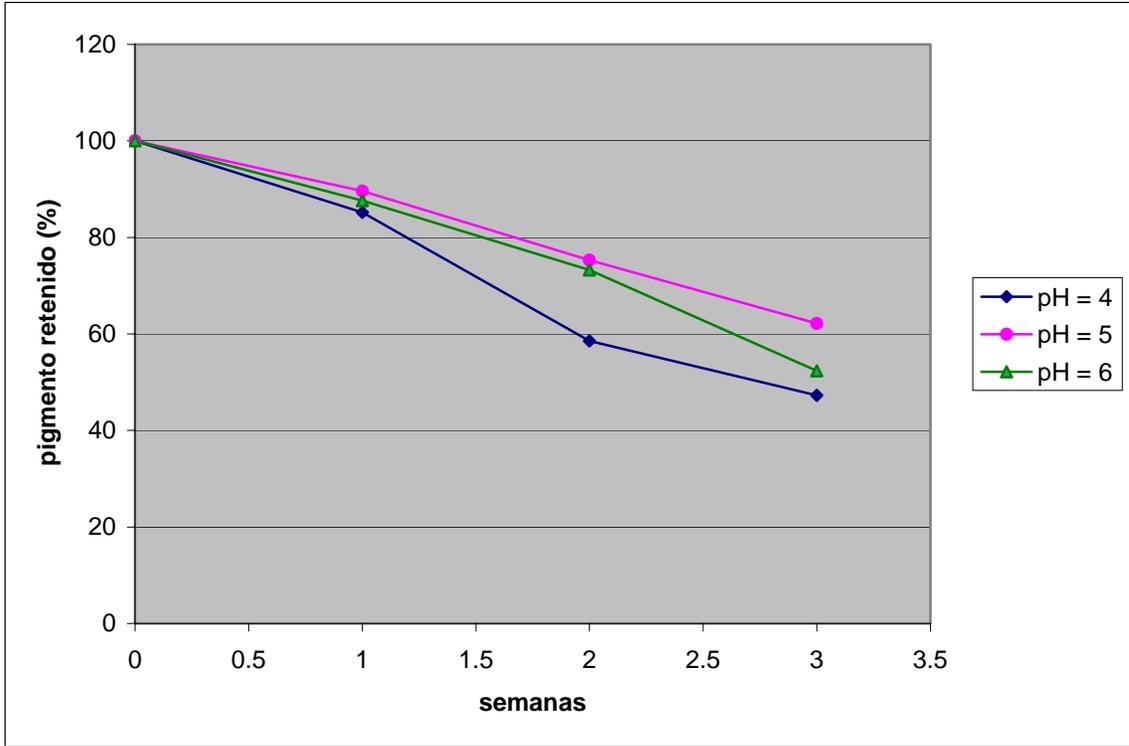


Figura 26. Efecto del pH sobre la estabilidad de las betaxantinas.

Al analizar estadísticamente los resultados obtenidos se encontró que efectivamente las muestras tuvieron una diferencia significativa con respecto al porcentaje de pigmento retenido en función del pH (α de 0.05), por lo que es mejor mantener un valor de 5 para mantener su estabilidad (Tabla 11).

Tabla 11. ANOVA de la estabilidad del pigmento de cáscara de pitaya en relación al pH.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo de Tablas
Tratamientos	3699.7483	3	1233.5	58.58	4.76
Bloques	165.9410	2	82.97		
Error	126.3239	6	21.05		
Total	3992.0133	11			

5.6.1.3 Efecto de la temperatura.

En la Figura 27 y 28 se muestra el comportamiento del porcentaje de pigmento retenido (ya sea betacianinas o betaxantinas) en función del tiempo, para las muestras que se mantuvieron a un pH constante de 5, en ausencia de luz y como factor variable la temperatura (4, 25 y 68 °C). En primera instancia, se encontró que la temperatura fue el factor más determinante en el porcentaje de pigmento retenido en comparación con los otros dos factores probados (pH y luz), tanto para las betacianinas como para las betaxantinas, siendo la temperatura de 4 °C la que permitió mantener la estabilidad de los pigmentos. Incluso se puede apreciar que en las temperaturas de 25 y 68°C desde la primera semana se empezaron a degradar rápidamente los pigmentos hasta alcanzar valores tan bajos como un 8% de pigmento retenido para las betacianinas y del 17% para las betaxantinas, al someterse a una temperatura de 68 °C (Tabla 12). Incluso las muestras de 25 y 68°C al final del tratamiento perdieron la coloración roja, degradándose a un color amarillo. Esto concuerda con estudios realizados sobre estabilidad de betalainas donde mencionan que tiene su máxima estabilidad a bajas temperaturas como son las temperaturas de refrigeración o congelación (García, 1998 y Reynoso, 1997). Las betaxantinas retuvieron mayor pigmento en comparación con las betacianinas para los tres valores de temperatura (7% más en la temperatura de 4 °C, 8% mayor en la de 25 °C y 9% más en la de 68 °C).

Tabla 12. Porcentaje de pigmento retenido al final del tratamiento respecto a la temperatura.

Pigmento	4 °C	25 °C	68 °C
Betacianinas	55.7 ± 0.20%	14.9 ± 0.26%	8.40 ± 0.28%
Betaxantinas	62.2 ± 0.20%	22.7 ± 0.25%	17.1 ± 0.24%

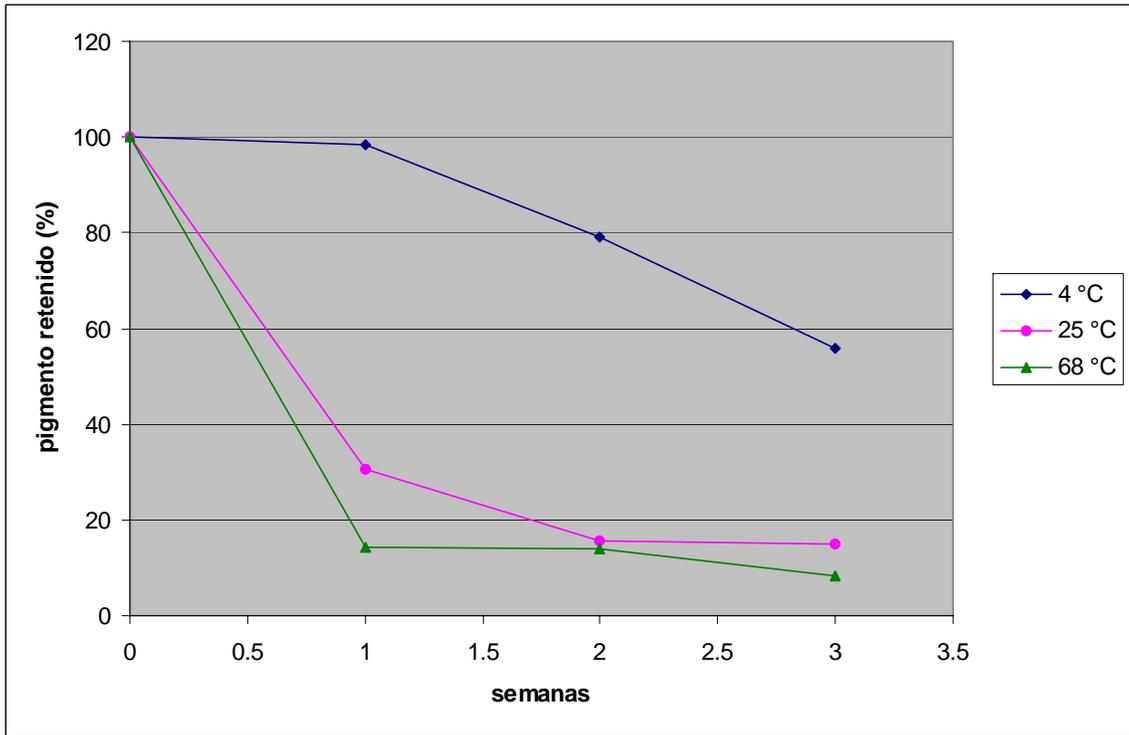


Figura 27. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las betacianinas.

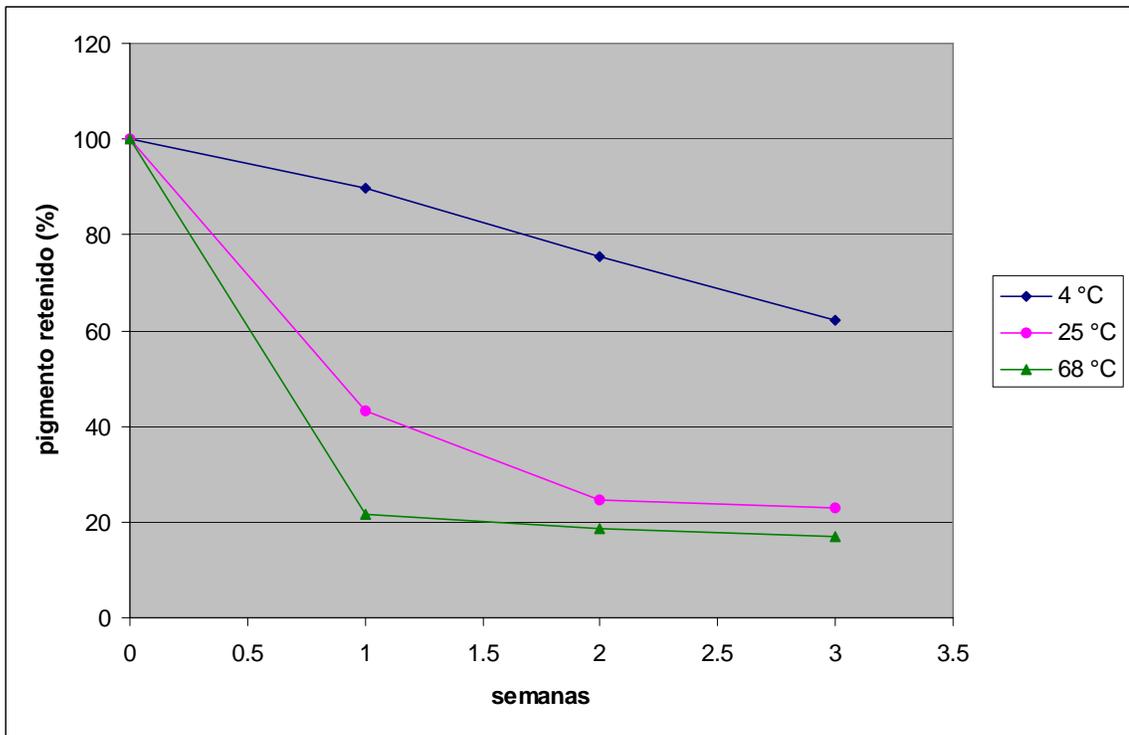


Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las betaxantinas.

La temperatura afectó significativamente la estabilidad del pigmento incluso desde los primeros días de tratamiento.

Al analizar los datos estadísticamente (Tabla 13) se corroboró que efectivamente la temperatura influyó de manera significativa en la estabilidad de los pigmentos de betacianinas y betaxantinas (α de 0.05), por lo que se recomienda mantener el extracto a bajas temperaturas para mantener su estabilidad (4 °C).

Tabla 13. ANOVA de la estabilidad del pigmento de cáscara de pitaya en relación a la temperatura.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo de Tablas
Tratamientos	8133.9492	3	2711.32	10.77	4.76
Bloques	4046.1868	2	2023.09		
Error	1511.0469	6	251.84		
Total	13691.1830	11			

En general, la estabilidad al calor de las betalaínas, está en función de la acidez y del oxígeno disuelto del medio; los valores de pH de 4 a 6 son favorables y resiste tratamiento térmicos en ausencia de este gas (Badui, 1993). Es por esto, que en se retuvo más pigmento en la condición de pH de 5, ausencia de luz y a bajas temperaturas. La pérdida de coloración (degradación del pigmento) se atribuye a la ruptura de las estructuras de resonancia.

Al analizar en forma conjunta los tres factores estudiados se encontró que tanto la temperatura, el pH, la interacción temperatura-pH y la conjunción de los tres factores temperatura-pH-presencia de luz, son los determinantes en la estabilidad de los pigmentos tipo betalaínas presentes en el extracto metanólico de cáscara de pitaya. Por lo que, las mejores condiciones para mantener su estabilidad consisten en mantener una temperatura de 4 °C, un pH de 5 y de preferencia en ausencia de luz.

6. CONCLUSIONES.

- Se lograron extraer betalainas de la cáscara de *Stenocereus stellatus* variedad roja usando como disolvente metanol al 80%.
- Se identificaron y purificaron parcialmente los dos grupos de betalainas en la cáscara de la pitaya presentando una mezcla de betaxantinas y betacianinas.
- Las betaxantinas fueron más estables a los diferentes factores probados (pH, luz y temperatura), alcanzando porcentajes de retención superiores a las betacianinas (10-20% más).
- El principal factor que afectó significativamente la estabilidad del pigmento fue la temperatura; degradando casi en su totalidad el pigmento (85–90%). A mayor temperatura mayor degradación del pigmento. La temperatura de 4 °C retuvo aproximadamente un 40-50% más de pigmento que las de 25 °C y 68 °C.
- El pH fue otro factor que tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad del pigmento, siendo más estable en un pH de 5 (retuvo 10-15% más que los otros valores de pH).
- La luz no tuvo efecto sobre la estabilidad del pigmento al analizarse estadísticamente los datos.
- El extracto de las cáscaras de pitaya fue más estable a bajas temperaturas (4 °C) con un pH de 5 y en ausencia de luz.

7. PERSPECTIVAS.

- Hacer la concentración del extracto obtenido mediante liofilización para mantener su estabilidad.
- Incorporar algún tipo de aditivos (antioxidantes y/o quelantes) para aumentar la estabilidad del pigmento.
- Probar el pigmento de la cáscara de pitaya como aditivo colorante en alimentos que mantengan condiciones adecuadas para asegurar su estabilidad, es decir, aquellos con pH entre 4 y 6, almacenados a bajas temperaturas (refrigeración o preferentemente congelados), protegidos de la luz; como son helados, pasteles, bebidas, yogurts, embutidos y gelatinas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Gómez Luz María. 2000. Fermentación Microbiana de la Pulpa de Pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) para la Liberación del Pigmento Hidrosoluble, Universidad Autónoma Chapingo.
- Adachi T. Nakatsukasa M. 1983. High performance liquid chromatographic separation of betalains and their distribution in *Portulaca grandiflora* and related species. *Z. Pflanzenphysiol.* 109 (2), 155-162.
- Aguilar Gaytán Martha Eugenia. 2003. Tesis: Aprovechamiento de cáscaras de pitaya para el crecimiento de setas (*Pleurotus ostreatus*) en condiciones de laboratorio. Universidad Tecnológica de la Mixteca. UTM.
- Arena E. 2000. Influence of Carotenoids and Pulpes on the Color Modification of Blood Orange Juice. *Journal Food Science.* 65. 458 – 460.
- Badui, Dergal Salvador. 1993. Química de los Alimentos. Editorial Pearson Educación, 3ª Ed. México. 377 – 405.
- Berlín J; Sieg S; Strack D; Bokern M; Harás H. 1986. Productions of betalains by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant cell tissue organ cultures.* 5 (3), 163-174
- Boehm H, Boehm L, Rink E. 1991. Establishment and characterization of a betaxanthin-producing cell culture from *Portulaca grandiflora*. *Plant cell tissue and organ culture.* 26 (2), 75-82.
- Bravo-Hollis H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las Cactáceas de México. Vol. III, Edit. UNAM. 501-535.
- Camire M. E, A. Chaovanalikit, M. Dougherty, J. Briggs. 2002. Blueberry and Grape Anthocyanins as Breakfast Cereal Colorants. *Journal Food Science.* 67, 438–441.
- Cano Medrano R. 1987. Estudio sobre la acumulación, identificación y estabilidad de pigmentos de frutas de tuna. Colegio de postgraduados de Chapingo. 52 - 85.
- Cenzano I. 1994. Color y Colorantes. Nuevo Manual de Industrias Alimentarias, Madrid, 47–52.
- Clydesdale M. Fergus. 2000. Natural Pigments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 40. 173–281.

- Colomas J., Barthe P, Bulard C. 1978. Separation and characterization of some betalains synthesized by *Myrtillocactus geometrizans* stem tissue cultivated in vitro. *Z. Pflanzenphysiol.* 87 (4), 341-346.
- CONACULTA (Consejo Nacional para la Cultura y las Artes). 1998. La Pitaya Verdadero Símbolo Nacional, México.
- Coultate T.P. 1984. Alimentos química de sus componentes. Acribia S.A. 115 - 127.
- Dominic W. S. 1989. Química de los alimentos. Mecanismos y teoría. Acribia, S.A. 186-191.
- Espín Juan Carlos. 2000. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A New source of Antiradical Activity for Foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* 48. 1588-1592.
- Fennema Owen R. 1993. Química de los alimentos. Acribia S.A. Cap. 8. 222, 640, 641, 648, 650, 653, 655.
- Fernández García A, P. Butz, B. Tauscher. 2001. Effects of High-pressure Processing on Carotenoid Extractability, Antioxidant Activity, Glucose Diffusion, and Water Binding of Tomato Puree (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal Food Science.* 66. 1033 – 1038.
- Florian C. 2002. Identification of Betalains from Yellow Beet (*Beta vulgaris* L.) and Cactus Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 50. 2302-2307
- García Barrera F, Reynoso C y González de Mejía E. 1998. Stability of betalains extracted from garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Science and Technology International.* 4 (2), 115-120.
- García Hernández Silvia C. 2000. Establecimiento de las condiciones de extracción, valoración, estabilidad y efectividad, del pigmento proveniente de pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) para su aplicación como posible colorante alimentario. Tesis de Licenciatura. Departamento de Farmacobiología. Universidad de Guadalajara.
- Glassgen W. E, Metzger J. W, Heuer S, Strack D. 1993. Betacyanins from fruits of *Basella rubra*. *Phytochemistry.* 33, (6), 1525-1527.

- González, C. I. y Guadarrama M. P. C. Septiembre 2002. Proceso tecnológico para el desarrollo de una conserva a base de pitaya (*Stenocereus* spp.) Memorias. XXXIII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. ATAM. Morelia, Michoacán, México.
- Granados Sánchez Diodoro, Andrés Mercado, Georgina Florencia. 1999. Las Pitayas de México. Ciencia Y Desarrollo, México. 145 (25): 59–67.
- Havlikova L; Mikova K, Kyzlink V. 1985. Red beet pigments as soft drink colorants. *Nahrung*. 29 (8). 723-730.
- Hempel J, Bohm H. 1997. Betaxanthin pattern of hairy roots from *Beta vulgaris* var lutea and its alteration by feeding of amino acids. *Phytochemistry*. 44 (5), 847-852.
- Hernández Pérez Héctor. 1996. Identificación de Pigmentos en Cultivos en Suspensión de Pitaya (*Stenocereus queretaroensis*). Webwer Buxbaum, 92. F.Q. (UADY) Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Hernández Rojas N. y Carreño R. 1977. Caracterización de los carotenos del melón (*Cucumis melo L.*) U.C.V. Departamento de Tecnología de Alimentos. Caracas, Venezuela. 27(4): 465 - 472.
- Huang S, Chuang Y, Liu Y. 1992. Studies on the characters and stability improvement of red pigments from cactus *opuntia dillenii* fruit. Report of the Taiwan Sugar research Institute. (138). 37-45.
- Investigación y Desarrollo. 2001. En busca de Frutos Para el Mercado. México.
- Kobayashi N, Schnidt J, Nimtz M, Wray V, Schliemann W. 2000. Betalains from Christmas cactus. *Phytochemistry*. 54 (4), 419-426.
- López L. C. 1993. Establecimiento de Líneas Sobreproductoras de Pigmentos a partir de cultivos *in vitro* de *Beta vulgaris L.* Tesis de Licenciatura. Fac. De Química, UADY.
- Lugo Cervantes Eugenia del Carmen. 1998. "Aprovechamiento Integral del Chile (*Capsicum annum*) y Pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) para la Producción de Colorantes Naturales Rojos Sustituyentes de los Sintéticos. Cooperativa de productores de pitaya de Techaluta Jal. Y CIATEJ.
- Luna, C. 1999. Etnobotánica de la pitaya Mixteca (*Pachycereae*). Ph.D. Tesis. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.

- Luna-Morales César del C, Aguirre Rivera R y Peña Valdivia C. 2001. Cultivares tradicionales mixtecos de *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxb. Y *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob. Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie botánica. 72. 2.
- Maldonado Salvador. 2002. Colorantes Naturales Cobran Fuerza Como Productos Sanos. Seminario, México.
- Marmión D. A. Wiley. 1991. Handbook of U.S. colorants, Foods, drugs, cosmetics and medical device. Third edición. Interscience publication. 14, 23, 24, 44, 130, 173.
- Mercado Bañuelos Andrés, Diodoro Granados. 1999. La Pitaya. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Montgomery C. Douglas. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. S.A de C.V.
- Pazmiño Duran E. Alexandra, Mónica Giusti, Ronald Wrolstad, Gloria Beatriz. 2001. Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential Food Colorants. Food Chemistry, 73. 327–332.
- Piatelli M, Imperato F. 1969. Betacyanins of the family cactaceae. Phytochemistry. 8. 1503-1507.
- Pimienta Barrios E. 1999. El pitayo en Jalisco y especies afines en México. Universidad de Guadalajara. Fundación Produce Jalisco, A.C. 17-53, 85-89.
- Pimienta-Barrios, E. y P. S. Nobel. 1994. Pitaya (*Stenocereus* spp. Cactaceae): And ancient and modern fruit crop of Mexico. Economic Botany. 48, 76-83.
- Reynoso R, García F, Morales D, González De Mejía E. 1997. Stability of betalain pigments from a cactaceae fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45 (8), 2984-2988.
- Reznik H, Engel U, Wambach C. 1988. Investigation on the betalain pigments of the Aizoaceae I. The betaxanthins of de Ruschieae. Beitr Biol. Pflanz. 63 (1-2), 209-220.
- Rivera Alemán C. 1994. Estudio preliminar sobre extracción de un colorante obtenido a partir de células en suspensión de *Stenocereus queretaroensis* (pitaya). Universidad de Guadalajara.
- Sapers G. Hornstein J. 1979. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. Journal of Food Science. 44 (4) 1245 – 1248.

- Secretaría de Desarrollo Industrial y Comercial. 1999. Pitaya de Oaxaca. Gobierno del Estado de Oaxaca.
- Soriano Santos J, Franco Zavaleta M, Pelayo Zaldivar C, Yáñez López L y Armella Villalpando M. 2004. Estudio de la composición del pigmento rojo de la jiotilla (*Escontria chiotilla*) y su potencial como fuente de colorantes. Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Stuppner H, Egger R. Cohen A. 1996. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris* (capillary electrophoretic separation of drugs). Journal of chromatography. A. 735, (1-2), 409-414.
- Trezzini G, Zryd J. 1991. 2 Betalains from *Portulaca grandiflora*. Phytochemistry. 30, (6), 1897-1899.
- Valadez Villarreal S y A, Chatelain M. S. 1979. Pigmentos de tuna cardona como posibles colorantes alimentarios. Fruticultura Mexicana. No. 15/18. Año 2. Tomo 1. 1-30.
- Vereltzis K, Buck E. 1984. Color stability and sensory attributes of chicken frankfurters made with betalains and potassium sorbate versus sodium nitrite. Journal of Food Protection. (Ames, Iowa: International Association of Milk, Food, and Environmental Sanitarians), 47 (1) 41-45.
- Wissgott U, K. Bortlik. 1996. Prospects for new natural Food Colorants. Trends in Food Science and Technology, 7. 298 – 302.
- Yizhong Cai. 1998. Colorant Properties and Stability of Amaranthus Betacyanin Pigments. J. Agric. Food Chem. 46. 4491-4495.
- Yizhong Cai. 2001. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigments from *Celosia argentea*. J. Agric. Food Chem. 49. 4429-4435.
- Zakharova N, Petrova T. 1997. Investigation of betalain oxidase of leaf beet. Applied Biochemistry and Microbiology. 33 (5). 481-484

PÁGINAS WEB UTILIZADAS COMO FUENTES DE INFORMACIÓN:

*[www.republika.pl/kaktusklub/ galeria2.html](http://www.republika.pl/kaktusklub/galeria2.html),

* <http://www.columnar-acti.org/stenocereus/>)

*<http://www.innerexplorations.org/bajatext/rancho3.htm>

*[www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/ stenocereus_stellatus.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/stenocereus_stellatus.htm)

* <http://www.encolombia.com/ciencias/arteyciencia91398-clorofila.htm>

ANEXOS.

En la Tabla 14 y 15 se muestran los datos usados para los cálculos.

Tabla 14. Porcentaje de pigmento retenido de las betacianinas.

Código	1ra. Lectura	2a. Lectura	3er. Lectura	4a. Lectura
A1B1C1	100	95.3125	54.8346	34.8356
A2B1C1	100	92.0978	48.6279	33.0963
A1B1C2	100	98.4573	71.5392	48.5238
A2B1C2	100	98.3613	79.0332	55.7161
A1B1C3	100	97.7027	78.9483	47.261
A2B1C3	100	97.6997	78.9416	49.3112
A1B2C1	100	20.4695	13.2707	8.1648
A2B2C1	100	23.6684	13.0727	13.0727
A1B2C2	100	28.1841	14.1922	13.9013
A2B2C2	100	30.4432	15.7777	14.9159
A1B2C3	100	29.903	11.2549	9.9844
A2B2C3	100	31.0538	15.5067	10.7046
A1B3C1	100	11.0131	10.7197	5.1906
A2B3C1	100	12.1421	11.7262	5.4762
A1B3C2	100	13.6802	10.6132	7.857
A2B3C2	100	14.269	13.8476	8.4028
A1B3C3	100	11.3157	8.3242	7.4437
A2B3C3	100	16.4769	10.9045	8.1032

Donde:

A = Luz

A1 = Luz

A2 = Oscuridad

B = Temperatura

B1 = 4 °C

B2 = 25 °C

B3 = 68 °C

C = pH

C1 = 4

C2 = 5

C3 = 6

Tabla 15. Porcentaje de pigmento retenido de las betaxantinas.

Código	1ra. Lectura	2a. Lectura	3er. Lectura	4a. Lectura
A1B1C1	100	86.8992	63.1346	49.5369
A2B1C1	100	85.2005	58.5338	47.2717
A1B1C2	100	88.4485	70.8701	58.1742
A2B1C2	100	89.623	75.3167	62.1919
A1B1C3	100	88.1699	60.1345	51.0562
A2B1C3	100	87.6381	73.2372	52.3314
A1B2C1	100	33.8413	24.3914	21.8001
A2B2C1	100	36.6261	24.4372	22.3838
A1B2C2	100	40.7879	22.8728	20.9961
A2B2C2	100	43.1781	24.5885	22.7726
A1B2C3	100	41.0212	20.2903	18.2873
A2B2C3	100	48.3293	22.1016	20.0998
A1B3C1	100	21.8092	17.1128	12.3326
A2B3C1	100	22.5626	18.0329	12.677
A1B3C2	100	17.3506	17.0199	16.6784
A2B3C2	100	21.7353	18.6131	17.0769
A1B3C3	100	16.5081	14.0239	13.0222
A2B3C3	100	17.0673	14.3327	13.431

Donde:

A = Luz

A1 = Luz

A2 = Oscuridad

B = Temperatura

B1 = 4 °C

B2 = 25 °C

B3 = 68 °C

C = pH

C1 = 4

C2 = 5

C3 = 6