

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



Proyecto Fin de Carrera

Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia stricta*

Autora: **Verónica Raquel García Gutiérrez**

Titulación: **Ingeniero Agrónomo**

Directores: **M^a. Rosario Castellar Rodríguez**

y **José María Obón de Castro**

Julio 2008



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental



DÑA. M^a ROSARIO CASTELLAR RODRÍGUEZ y D. JOSÉ MARÍA
OBÓN DE CASTRO profesores del Departamento de Ingeniería Química
y Ambiental

CERTIFICAN:

Que el Proyecto Fin de Carrera titulado “**Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de *Opuntia stricta***”, presentado por **Dña. Verónica Raquel García Gutiérrez**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y cumple las condiciones requeridas para optar al título de Ingeniero Agrónomo en la especialidad de Industrias Agrarias y Alimentarias.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente en Cartagena a 15 de julio de 2008.

Fdo: Dña. M^a Rosario Castellar Rodríguez

Fdo: D. José María Obón de Castro

**Parte de este Trabajo Fin de Carrera fue presentado en el “VIII Simposio
Nacional
y V Ibérico de Maduración y Post-Recolección” que tuvo lugar en Orihuela,
Alicante, en septiembre de 2006.**

Agradecimientos

*A mi familia, a la que quiero muchísimo y sin la que nunca podría haber llegado hasta aquí, y **muy especialmente a mi madre**, por los cuatro felices años que pasamos juntas en La Manga. Gracias...*

A mis abuelos por el amor que nos han regalado siempre de manera incondicional y por ser un ejemplo de bondad y trabajo constante a lo largo de toda su vida.

A los pequeños Jaime, Beatriz y Blanca, por traer la alegría e inocencia que nos faltaba en casa.

A Toli porque juntos y desde el primer día formamos un gran equipo. Σ'αγαπώ πολύ.

A Chari y José María por su inestimable colaboración, apoyo, ayuda y gran paciencia durante la elaboración de este trabajo, y por haberme brindado su cariño y amistad.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Los colorantes alimentarios	9
1.2. Colorantes alimentarios naturales	10
1.3 Importancia de los colorantes naturales frente a los artificiales	16
1.4 Las betalainas como colorantes alimentarios naturales	17
1.4.1 Las betalainas: qué son y su presencia en la naturaleza	17
1.4.2 Estructura química de betaxantinas y betacianinas	19
1.4.3 Estabilidad de las betalainas	20
1.4.3.1 Efecto del pH	21
1.4.3.2 Efecto de la temperatura	21
1.4.3.3 Efecto de las radiaciones	21
1.4.3.4 Efecto del oxígeno	22
1.4.3.5 Efecto de la actividad del agua	22
1.4.3.6 Acción enzimática	22
1.5 Fuentes de colorante E-162	22
1.5.1 La remolacha, <i>Beta vulgaris</i>	22
1.5.1.1 Ventajas y desventajas de la remolacha como fuente colorante	25
1.5.2 El género <i>Opuntia</i>	26
1.5.2.1 <i>Opuntia ficus indica</i>	28
1.5.2.2 <i>Opuntia stricta</i>	30
1.5.2.2.1 Maduración de frutos de <i>Opuntia stricta</i>	30
1.5.2.2.2 <i>Opuntia stricta</i> como fuente de betaninas	31
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Materiales	38
3.1.1 Material vegetal	38
3.1.2 Productos químicos.	38
3.2 Preparación de las muestras	38
3.2.1 Recogida de muestras y procesado de los frutos	38
3.2.2 Determinación del peso y dimensiones de los frutos	39
3.2.3 Determinación del color externo	39
3.2.4 Observación del corte longitudinal de los frutos	40
3.2.5 Conservación de los frutos	40
3.2.6 Obtención del zumo de los frutos de <i>Opuntia stricta</i>	41

3.2.7 Determinación de peso seco	42
3.2.8 Obtención de extractos de frutos de <i>Opuntia stricta</i>	42
3.3. Métodos de análisis	42
3.3.1 Determinación del pH	42
3.3.2 Determinación de sólidos solubles totales	43
3.3.3 Análisis espectrofotométrico	43
3.3.4 Análisis de fenoles totales	44
3.3.5 Análisis de azúcares reductores: Método DNS	45
3.3.6 Análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución	47
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1 Análisis morfológico del fruto	52
4.1.1 Evolución de la morfología del fruto	52
4.1.2 Evolución de la maduración del fruto	53
4.2 Análisis del zumo de <i>Opuntia stricta</i>	59
4.2.1 Determinación de peso seco	60
4.2.2 Azúcares	61
4.2.2.1 Sólidos solubles	61
4.2.2.2 Azúcares reductores (DNS)	61
4.2.3 Medida del pH	62
4.2.4 Determinación de polifenoles totales	62
4.2.4.1 Índice de formol	63
4.3 Estudio espectrofotométrico	64
4.4 Análisis de pigmentos y otros metabolitos por HPLC	65
V. CONCLUSIONES	87
VI. BIBLIOGRAFÍA	89

I

**Evolución de compuestos funcionales durante
la maduración de frutos de *Opuntia stricta***

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Los colorantes alimentarios

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento y la que determina el primer juicio sobre su calidad, ya que tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor, condicionando el éxito o fracaso de un producto en el mercado.

Según recoge el Real Decreto 2001/1995 de 7 de Diciembre de 1996, se entiende por colorantes alimentarios:

- a) Aquellas sustancias que añaden o devuelven color a un alimento e incluyen componentes naturales de sustancias alimenticias y otras fuentes naturales que no son normalmente consumidos como alimentos por sí mismos y no son habitualmente utilizados como ingredientes característicos en alimentación.
- b) Los preparados obtenidos a partir de los alimentos y otras materias naturales obtenidas mediante extracción física o química que ocasione una selección de los pigmentos que se usan como componentes nutritivos o aromáticos.

Los alimentos naturales tienen su propio color y lo ideal sería que se mantuvieran a lo largo del proceso de transformación en la industria, pero la mayoría de las veces no es así. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe en los diferentes lotes de fabricación de un producto y esto sólo puede obtenerse modificándolo de forma artificial (Cubero *et al.*, 2002).

Los colorantes tienen un uso limitado, no deben emplearse de una manera arbitraria, sino que la cantidad en cada alimento debe atender a la corrección de la pérdida de color producida por alguno de los siguientes problemas que se pueden plantear durante el proceso de fabricación o almacenamiento de un alimento:

- Pérdida de color por tratamientos tecnológicos del proceso: tratamientos térmicos, pelados, desecaciones, etc.
- Variaciones físico-químicas: cambios de luz, pH, potencial redox, etc.
- Efectos bioquímicos: microorganismos y sus metabolitos, pardeamiento enzimático y no enzimático.

Todos estos cambios hacen que el producto sea menos atractivo para el consumidor y que lleve al técnico a utilizar colorantes como aditivo y así conseguir los diferentes efectos:

- Reforzar los colores ya presentes en el alimento pero menos intensos de lo que el consumidor espera a causa de los cambios anteriormente descritos.
- Conseguir uniformidad de color en el alimento, logrando así una homogeneidad en el mercado.
- Hacer más apetecibles los alimentos y asociar sabores y colores.
- Impartir color a los alimentos elaborados, color de fantasía (helados, caramelos, etc.).
- Facilitar un efecto pantalla para ayudar a la protección del aroma y de las vitaminas sensibles a la luz.

De esta forma debe quedar por lo tanto prohibido el uso de colorantes para enmascarar defectos del producto o para dar una sensación de calidad que no posee.

Para acertar en el colorante que se debe emplear en un producto es importante tener en cuenta:

- Características del alimento a colorear: presencia de otras sustancias en el alimento que pueden llegar a interaccionar con el colorante y provocar inestabilidad y defectos de aplicación.
- Proceso de elaboración del alimento teniendo presente las características físico-químicas de cada colorante y su estabilidad a diferentes parámetros como pH, temperatura, etc.
- Material de envasado. Si es permeable a la luz, oxígeno, etc.
- Tiempo y condiciones de almacenamiento.
- Legislación vigente en cada país suponiendo que el producto producido en nuestro país sea exportado (Cubero *et al.*, 2002).

Los colorantes se pueden clasificar en dos grandes grupos según su procedencia sea natural o sintética. A continuación nos centraremos en los colorantes naturales ya que ha sido éste el ámbito de desarrollo del presente trabajo.

1.2 Colorantes alimentarios naturales

En la industria alimentaria la utilización de colorantes en la elaboración de los productos es práctica habitual. Su uso tiene una larga

tradición, ya que algunos productos naturales como el azafrán o la cochinilla ya eran conocidos por las civilizaciones antiguas.

Conocida ya la definición de colorante alimentario sería interesante diferenciar entre colorantes naturales y colorantes artificiales. Estos términos son muy utilizados en las polémicas sobre la salubridad de los alimentos. En sentido estricto, sólo sería natural el color que un alimento tiene por sí mismo. Sin embargo diremos que un colorante es natural cuando está presente en la naturaleza, y artificial cuando es un compuesto no natural y que sólo puede obtenerse por medio de síntesis química.

La preocupación por la seguridad ha hecho que los colorantes artificiales hayan sido estudiados de forma exhaustiva por lo que respecta a su efecto sobre la salud, mucho más que la mayoría de los colorantes naturales. Ello ha llevado a reducir cada vez más el número de colorantes artificiales utilizables, aunque al contrario de lo que sucede en los otros grupos de aditivos, existen grandes variaciones de un país a otro. Los consumidores rechazan hoy en día la presencia de colorantes sintéticos en los alimentos y prefieren los colorantes naturales (Obón *et al.*, 2003).

Esta preocupación por la seguridad de los alimentos, y la presión de la opinión pública, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes artificiales por otros naturales. En general, para la producción industrial, los colorantes artificiales son más baratos, más estables y poseen mayor poder colorante. Aun así, los colorantes sintéticos presentan también problemas en su uso; por ejemplo, en muchos casos se decoloran por acción del ácido ascórbico, efecto importante en el caso de las bebidas refrescantes, en que esta sustancia se utiliza como antioxidante. Los colorantes artificiales pueden utilizarse en forma soluble, como sales de sodio y potasio, y a veces amonio, en forma insoluble como sales de calcio o aluminio, o bien adsorbidos sobre hidróxido de aluminio formando lo que se conoce como una laca. La utilización de un colorante soluble o insoluble depende de la forma en que se va a llevar a cabo la dispersión en el alimento.

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales. En cualquier caso, la OMS (Organización Mundial de la Salud) obliga a seguir una investigación toxicológica cuando el colorante es empleado en

concentraciones más elevadas de las presentes en el producto natural, o cuando se modifica su estructura durante el proceso de extracción. Por tanto, los colorantes de origen natural han de cumplir también unas exigencias y pautas antes de ser aprobado su uso.

Los colorantes naturales alimentarios aprobados en la actualidad por la CE son los siguientes:

- **E-100 Curcumina.** Se obtiene del rizoma de la cúrcuma o azafrán indio *Curcuma longa*, un miembro de la familia del jengibre. Es de color amarillo-anaranjado (depende del pH). Es además un colorante con propiedades aromáticas cuando se utiliza la especie completa o la oleorresina. La forma comercial interesante por su capacidad colorante es la oleorresina con una pureza del 40-55% en curcumina y como curcumina pura con 90-95%. Aprovechando la aportación de aroma y color, sus aplicaciones son: mezclas de polvo de curry, escabeches, sopas, adobos, salsas, productos cárnicos, etc. Sin aportación de aroma: lácteos, margarinas, quesos, mermeladas, helados, bollería, etc.

- **E-101 Riboflavina.** Es la vitamina B₂, también se conoce como Lactoflavina, ya que se encuentra en la leche. Industrialmente se obtiene de la levadura o por biosíntesis. Posee también un color amarillo-anaranjado. Se encuentra además de en la leche, en sus derivados: huevos, espinacas, leguminosas, algunas carnes, etc. El producto comercial es un polvo cristalino naranja-amarillo, de color débil. Tiene aplicación en cereales, productos lácteos, recubrimiento de helados, confitería, yogures, etc.

- **E-120 Carmín de cochinilla.** Este pigmento se extrae del caparazón de las hembras del insecto *Coccus cacti* L. donde se encuentra en una concentración del 10% en las partes grasas. Su color es rojo o violáceo y ello también depende del pH. A pH alcalino ofrece tonos rojo-azulados y a pH ácido predomina la tonalidad roja. Se necesitan alrededor de 100.000 insectos para obtener 1kg de producto colorante. Puede encontrarse de muchas formas comerciales (lacas, polvos hidrosolubles, soluciones...). Sus aplicaciones son muy diversas, en productos cárnicos, caramelos, chicles, galletería, pastelería, confitería, repostería, conservas vegetales, productos lácteos y bebidas.

- **E-140/141 Clorofilas y clorofilinas.** Es un pigmento verde vegetal (y de algunos microorganismos) que interviene en la fotosíntesis. Se obtiene por extracción por disolventes a partir de fuentes naturales de hierbas,

alfalfa, ortigas y de otras materias vegetales comestibles. Es de color verde oliva o verde oscuro (según la cantidad de magnesio ligado). Se puede obtener un derivado de las clorofilas conocido como clorofilinas, que son las sales sódicas o potásicas de las clorofilas. También se pueden encontrar los complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas que se obtienen por la sustitución del grupo magnesio de la molécula de clorofila por el cobre que le confiere a la molécula un color más brillante y estable. Cada uno de estos grupos tiene su propio n° E:

- **E-140 Clorofilas y clorofilinas.**
- **E-140 i) Clorofilas.**
- **E-140 ii) Clorofilinas.**
- **E-141 Complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas.**
- **E-141 i) Complejos cúpricos de clorofilas.**
- **E-141 ii) Complejos cúpricos de clorofilinas.**

En forma comercial se presenta como un polvo verde oscuro. Se aplica en la elaboración de quesos, helados, productos lácteos, etc.

- **E-150 Caramelo.** Se obtiene por una reacción de caramelización de diferentes hidratos de carbono (glucosa, azúcar invertido, lactosa, hidrolizados de almidón, melazas o sacarosa), mediante calentamiento controlado en presencia de ácidos o álcalis. Es un colorante que no proporciona sabor dulce, a pesar de proceder de azúcares. Da colores marrones y pardos. Puede presentarse como un líquido o un polvo amorfo oscuro. Tiene aplicaciones muy diversas, es el colorante típico de muchas bebidas de cola, también de muchas bebidas alcohólicas. Su uso se extiende a productos de repostería, elaboración de pan, fabricación de caramelos, cerveza, helados, postres, yogures, sopas preparadas, conservas y diversos productos cárnicos.

- **E-160 Carotenoides.** Los carotenoides son un grupo de más de 450 pigmentos diferentes, liposolubles, de colores que van desde el amarillo al rojo. Se pueden encontrar formando parte de vegetales y de animales. Alrededor del 10% de los diferentes carotenoides tienen actividad provitamina A en mayor o menor extensión.

Los carotenoides que se emplean en la industria alimentaria como colorantes pueden obtenerse mediante dos vías. Bien por extracción directa de los vegetales que los contienen o bien por síntesis química. Están formados generalmente por ocho unidades de isopreno, es decir, constituyen una estructura de 40C, de 40 átomos de carbono.

Se dividen en dos grandes grupos:

- Los carotenos: hidrocarburos solubles en éter de petróleo y poco en etanol.
- Las xantófilas: que son derivados oxigenados de los carotenos, con características de alcohol, aldehído o ácido, solubles en etanol y éter de petróleo. Por su insaturación son sensibles al oxígeno, a la luz, a los metales y a las lipoxigenasas.

Como colorantes se encuentran la siguiente clasificación:

- **E-160 a Caroteno.**
 - **E-160 b Annato, Bixina Norbixina.**
 - **E-160 c Capsantina, Capsorrubina.**
 - **E-160 d Licopeno.**
 - **E-160 Xantófilas.**
- **E-160 a Caroteno.** Pertenece al grupo de los carotenoides, con estructura de hidrocarburo, formado por ocho unidades isoprenoides, abunda en productos de origen vegetal y animal; el más común es el β -caroteno. Cuando su obtención es natural se extrae de los vegetales, como zanahoria, o de las algas. Es de color amarillo-naranja. Dentro del grupo de clasificación E-160 a se incluyen las formas a, b y g del caroteno. Presentan actividad provitamina A. Se encuentra en el mercado como líquido anaranjado con diferentes concentraciones, también se encuentra en forma de polvo anaranjado. Encuentra aplicación en productos lácteos, margarinas, bebidas, snacks, etc.
- **E-160 b Bixina/Norbixina.** Es un carotenoide ácido, lineal, que se extrae de las semillas de achiote o innato (*Bixa orellana*). Su color va desde el naranja-amarillo claro hasta el naranja-rojo intenso. Por saponificación se elimina el grupo éster metilo y se transforma en norbixina que es soluble en agua. Ambos se suelen utilizar como sustitutos del β -caroteno. En América del Sur, el innato se utiliza como especia para dar sabor y color a las carnes y comidas picantes. Se comercializa como un polvo anaranjado. Es muy utilizado para colorear productos lácteos y cárnicos aprovechando su afinidad a las proteínas. Aprovechando y teniendo en cuenta que el color amarillo que proporcionan tiende a aclararse con la temperatura, se pueden conseguir tonos adecuados al producto.
- **E-160 c Capsantina/Capsorrubina.** Ambos pigmentos se encuentran en el pimiento rojo, de donde se extrae. *Capsicum annum L.* Tiene un color

naranja intenso-rojo. Lo podemos encontrar en el mercado como un líquido anaranjado-rojizo. La aplicación más importante de este tipo de colorantes es en la fabricación de embutidos, pero su uso se puede extender hasta el coloreado de bebidas, snacks, salsas, etc.

- **E-160 Licopeno.** Es el pigmento responsable del color rojo de los tomates, donde se encuentra en una concentración de aproximadamente 0,02 g/kg de producto fresco. Es de color rojo. Se comercializa en forma de polvo. Sus aplicaciones son salsas, sopas, snacks, etc.

- **E-161 Xantófilas.** Se pueden encontrar tanto en el reino animal como en el vegetal.

E-161 a Flavoxantina (hojas verdes).

E-161 b Luteína (yema de huevo y vegetales).

E-161 c Criptoxantina (tomate, naranja).

E-161 d Rubixantina (flores).

E-161 e Violaxantina (violetas).

E-161 f Rodoxantina (tejo).

E-161 g Cantaxantina (crustáceos).

El origen para aplicación alimentaria puede ser por extracción directa de la naturaleza (Alfalfa o de *Tagetes erecta*) o por síntesis química como es el caso de la cantaxantina. En cuanto al color abarca la gama de amarillo a rojo.

Estos derivados de los carotenoides a diferencia de ellos no tienen ninguna actividad provitamina A, a excepción de la criptoxantina.

Las xantofilas tienen mayor importancia como colorantes de las materias primas, ya que su principal aplicación es como aditivo en el alimento suministrado a los peces de piscifactoría de musculatura rosada (trucha asalmonada, salmón) y también en el pienso que alimenta a las gallinas para conseguir mayor coloración en la yema del huevo. El tipo de xantofila utilizada en cada caso concreto depende de la especie animal que se trate, y suele aportarse en forma de levaduras o algas que presenten estos pigmentos, más que como sustancia química aislada.

Se pueden encontrar en forma oleosa o de forma emulsionada. Su aplicación puede ser en alimentos como helados, margarinas, mayonesas y otras salsas, confitería, bebidas, etc. En general alimentos grasos por su solubilidad.

- **E-162 Rojo de remolacha (Betanina).** Pigmento coloreado que se encuentra en la remolacha roja *Beta vulgaris* y en los frutos de diversas

especies del género *Opuntia*. Se obtiene exprimiendo y pasteurizando el extracto líquido de la hortaliza y del fruto respectivamente. Es de color rojo-violeta. En su forma comercial se presenta como polvo higroscópico de color púrpura-café con brillo metálico o en forma de líquido concentrado. Generalmente colorea productos lácteos, sopas, confitería y aliños.

- **E-163 Antocianinas.** : Se encuentra en la piel de algunas frutas como manzanas, pera, ciruela o en la parte carnosa como fresas, cerezas, etc. La mayor fuente de obtención industrial es la piel de la uva negra y de otras industrias de zumos. Es de color naranja. El uso de antocianos se puede ver bastante limitado por el pH, ya que varían de color en función de este parámetro, por lo que suelen emplearse en aquellos alimentos ácidos que favorezcan el mantenimiento de su color natural. El color también puede verse afectado por diferentes efectos, por ejemplo las sales de estaño estabilizan la coloración del concentrado de fresas y de las conservas de espárragos. Se aplica en alimentos ácidos como mermeladas, bebidas refrescantes, zumos de frutas, confitería, etc. (Cubero *et al.*, 2002).

1.3 Importancia de los colorantes naturales frente a los artificiales

Las tendencias actuales indican que la búsqueda de nuevos colorantes va encaminada a la aplicación de pigmentos de origen natural, ya que cada vez más el consumidor se fija en la composición de aquello que forma parte de su alimentación y reclama productos naturales.

Existe una tendencia clara de sustituir los colorantes sintéticos por los de origen natural, pero sin perder las cualidades tecnológicas de los primeros. Por tanto, se tiende hacia una estabilización de los pigmentos naturales por diferentes métodos como pueden ser:

- Tecnología de la suspensión
- Emulsión
- Microencapsulación
- Aglomeración

Pero también se pueden controlar los cambios de color de la sustancia colorante si se conoce en profundidad el diagrama de flujo del producto alimentario que se elabora en la industria. Así, se pueden detectar aquellos puntos en los que el pigmento es dañado o alterado y actuar sobre él sabiendo que las principales causas de alteración son la

temperatura, la luz, el pH y la interacción con otras sustancias (SO₂, NO₂...).

Las tendencias de aplicación de colorantes de pueden resumir en:

- Conseguir las ventajas que ofrecen los colorantes sintéticos utilizando colorantes naturales, mediante modificaciones de los últimos, y así conseguir: mayor estabilidad, homogeneidad, intensidad de coloración, facilidades de manejo, aprovechando la mayor aceptación de los colorantes que se encuentran en la naturaleza.
- Una nueva tendencia hacia productos con tonalidades de coloreado más suaves, para una percepción del consumidor como alimentos más naturales.
- Aplicación de nuevos métodos de búsqueda de colorantes a partir de sustratos naturales como pueden ser hongos o extractos de plantas, vegetales o frutos con gran cantidad de pigmentos vegetales como: antocianos, betacarotenos, betalaínas, etc. (Cubero *et al.*, 2002).

1.4 Las betalaínas como colorantes alimentarios naturales

1.4.1 Las betalaínas: qué son y su presencia en la naturaleza

El término betalaínas se refiere a un grupo de aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles, con estructuras de glucósidos, derivados del ácido betalámico, y que se han dividido en dos grandes grupos: los rojos o betacianinas, y los amarillos o betaxantinas (Francis, 1999). La forma general de las betalaínas representa la condensación de una amina primaria o secundaria con ácido betalámico (Francis y Lauro, 2000).

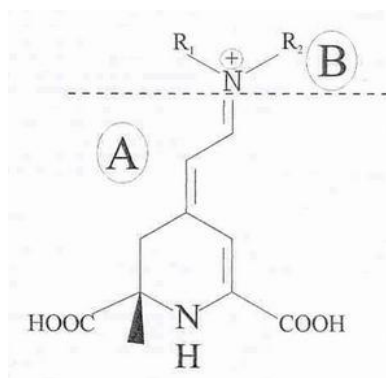


Figura 1. Fórmula general de las betalaínas

Son parecidas a las antocianinas y flavonoides en apariencia visual. Anteriormente se les llamaba antocianinas nitrogenadas. Estos pigmentos se encuentran sólo en 10 familias de vegetales, todas pertenecientes al orden *Caryophyllales*: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellanaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didiereaceae*, *Holophytaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* y *Portulacaceae* (Franco-Zavaleta, 2004). También se han encontrado algunas betalaínas de origen fúngico en el hongo venenoso *Amanita muscaria*. Las betalaínas, al igual que las antocianinas, se acumulan en las vacuolas celulares de las flores, frutas y hojas que las sintetizan, principalmente en la epidermis y la subepidermis.

De las fuentes de betalaínas, sólo la remolacha, el amaranto y las frutas de cactáceas son productos alimentarios (Franco-Zavaleta, 2004).

En la remolacha roja, la betanina corresponde a un 75-95% de los pigmentos, los otros son isobetanina, prebetanina e isoprebetanina; los dos últimos son monoésteres sulfatados de la betanina e isobetanina, respectivamente. Los pigmentos amarillos más abundantes en la remolacha son vulgaxantina I y II. La presencia de betalaínas en plantas es mutuamente excluyente de la de antocianinas. La del amaranto (*Amaranthus tricolor*), amarantina, es una de las betacianinas que últimamente ha sido motivo de investigación, se ha usado en algunos países como China para colorear diversos alimentos (Butera *et al.*, 2002).

Las betalaínas son uno de los pigmentos autorizados como aditivos por la FDA (Foods and Drugs Administration) de Estados Unidos y también está admitido en la Unión Europea con la designación de E-162, comercializándose de dos maneras, como polvo de remolacha, que incluye el pigmento y estabilizantes como azúcares y proteínas y antioxidantes, y como extracto líquido concentrado. 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 de ósmosis inversa. Incluso, debido a su potencial, se ha ensayado el cultivo de tejidos para producir remolachas con un mayor contenido de betaninas.

Dado que existen restricciones de tipo legal en el uso de colorantes rojos sintéticos, se ha sugerido emplear a las betalaínas en diversos alimentos tales como gelatinas, bebidas y postres en general (Weller *et al.*, 1982).

1.4.2 Estructura química de betaxantinas y betacianinas

Las betaxantinas, de color amarillo-naranja, se forman por condensación de ácido betalámico con aminas o aminoácidos. En la betaxantina, el anillo ciclodopa de la betacianina es desplazado por un grupo amino o por un aminoácido; por lo que puede haber más de 200 betaxantinas. En los frutos del cactus *Opuntia ficus indica*, la principal betaxantina es la indicaxantina que contiene a un triptófano (Reynoso *et al.*, 1997). En la remolacha se encuentran la vulgaxantina I y vulgaxantina II, sustituidas por glutamina y ácido glutámico, respectivamente (Huang y Von Elbe, 1985).

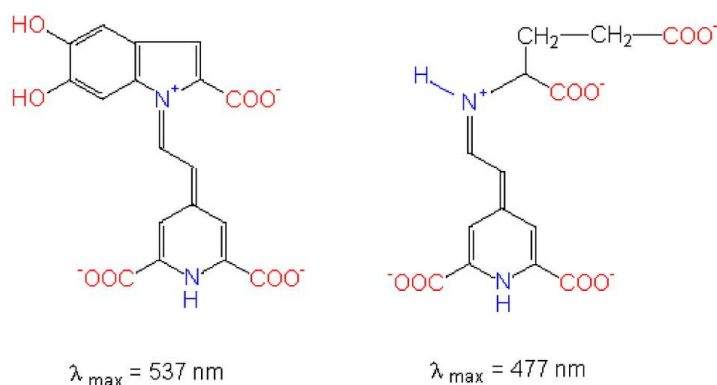


Figura 2. Fórmula general de las betacianinas (rojo-púrpura) y de las betaxantinas (amarillo)

Las betacianinas son pigmentos rojo-púrpura, y se forman por condensación de ácido betalámico con derivados de ciclodopa. Estos compuestos pueden estar glicosilados. Los glucósidos o glicósidos se forman por reacción del grupo alcohol de una molécula con otro grupo alcohol perteneciente a un azúcar (monosacárido u oligosacárido). En esta reacción se forma un enlace glicosídico con pérdida de una molécula de agua. A la parte no glucídica (no azúcar) del compuesto resultante se le llama aglicón. El aglicón se presenta en dos formas isoméricas, como betanina e isobetanina en la remolacha, y como amarantina e isoamarantina en el amaranto (Heuer *et al.*, 1994). Sin embargo, también existen otras formas, de acuerdo con el sustituyente unido al aglicón; por ejemplo, en la remolacha, además de betanina e isobetanina, también se encuentran prebetanina, isoprebetanina, betanidina e isobetanidina. Las

betacianinas absorben luz a 537 nm y las betaxantinas a 480 nm. Puede ocurrir también la acilación si el grupo acilo está esterificado al azúcar, es decir, que se forme un éster entre el grupo carboxilo y un alcohol del azúcar. Los grupos acilo pueden ser: ácidos sulfúrico, málico, cítrico, 3-hidroxi-3-metilglutárico, *p*-cumárico, ferrúlico, cafeico y sinápico (Wrolstand, 2000).

En la figura 3 se muestra la ruta de biosíntesis de estos compuestos con sus pesos moleculares. Como se observa, las betalaínas derivan del aminoácido tirosina. Se han aislado y caracterizado distintas enzimas de la ruta biosintética.

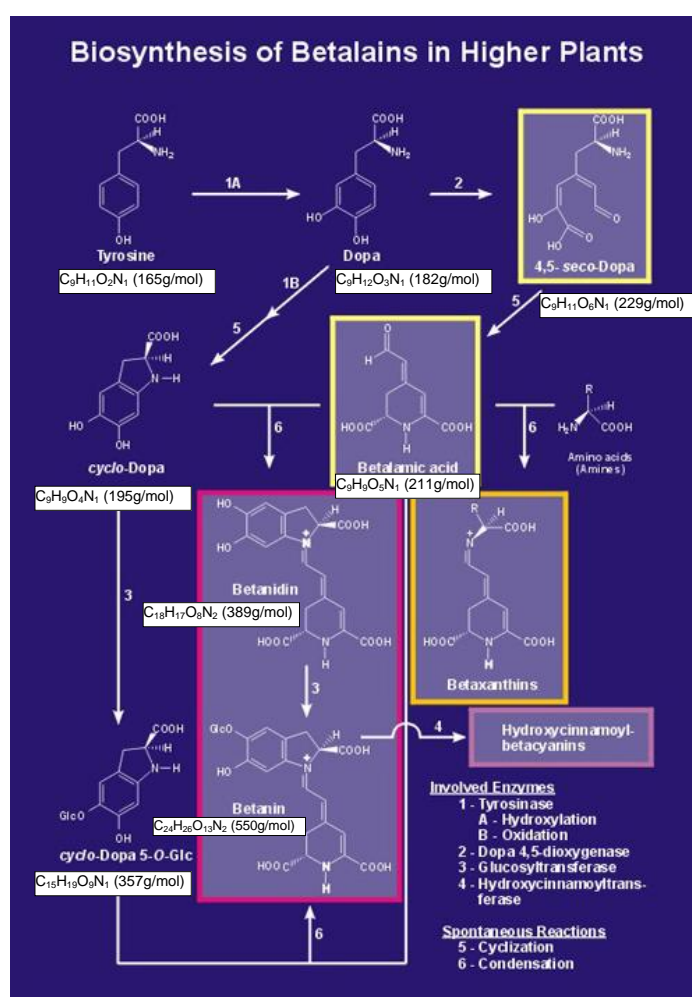


Figura 3. Biosíntesis de las betalaínas

1.4.3 Estabilidad de las betalaínas

La estabilidad de las betalaínas es restringida, debido a que su color se altera por varios factores: pH, temperatura, actividad acuosa y luz; no

se ha logrado la estabilización de estos pigmentos a través de acilación o sustitución de la molécula, aunque su estabilidad puede aumentar si se añaden antioxidantes como ácido ascórbico, E-321 o butil-hidroxi-tolueno (BHT) y E-320 o butil-hidroxi-anisol (BHA) (Lee *et al.*, 1982). Las betaxantinas se degradan con mayor rapidez que las betacianinas, además, por su color amarillo en general se enmascaran con las betacianinas u otros compuestos presentes. Todas las reacciones de degradación se aceleran por la acción catalítica de algunos metales, principalmente el cobre (Huang y Von Elbe, 1986).

1.4.3.1 Efecto del pH

El cambio de color con el pH es, a nivel general, menos marcado que el que presentan las antocianinas.

El color permanece inalterado en un intervalo de pH de 3 a 7; por debajo del pH 3.0 el color cambia a violeta, y su intensidad decrece. Por encima del pH 7.0, el color es más azulado debido a un efecto batocrómico o desplazamiento hacia el rojo. La mayor intensidad de azul se observa a un pH 9.0 (Von Elbe y Goldman, 2000).

1.4.3.2 Efecto de la temperatura

Las betalaínas son muy sensibles a la temperatura. La degradación de betalainas como betanina y vulgaxantina-I sigue una reacción de primer orden en un intervalo de pH 3.0 a 7.0, en ausencia de oxígeno. La betanina, por otra parte, produce isobetanina y/o betanina descarboxilada cuando se calienta a un pH de 3.0 a 4.0. Los enlaces glucosídicos son muy sensibles a la ruptura en altas temperaturas, así como a reacciones de oxidación, lo que iniciará una polimerización que dará productos similares a las melaninas.

1.4.3.3 Efecto de radiaciones

Al igual que las antocianinas, las betalaínas son muy susceptibles a la degradación iniciada por radiación de varios tipos: la degradación por fotooxidación depende del pH, y ocurre con más intensidad a pH 3.0 que a 5.0 (Von Elbe *et al.*, 2000). La radiación gamma incrementa la velocidad

de degradación de betanina, y se pierde totalmente a dosis de 100 krad (Saguy *et al.*, 1984).

1.4.3.4 Efecto del oxígeno

La presencia de oxígeno afecta la velocidad de fotooxidación y de degradación por temperatura; los iones metálicos (hierro, cobre, estaño, aluminio) aceleran la oxidación en presencia de oxígeno (Attoe y Von Elbe, 1985) La presencia de ácido ascórbico o α -tocoferol no protegen a las betalaínas de la oxidación; sin embargo, el ácido cítrico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sí la reducen (Butera *et al.*, 2002).

1.4.3.5 Efecto de la actividad del agua

Son estables en productos deshidratados con una actividad de agua menor a 5.0. La betanina se vuelve más inestable a medida que se aumenta la actividad de agua y el contenido de humedad del alimento; por esta razón, los sólidos de remolacha deben almacenarse con la menor cantidad de agua posible y en las condiciones más secas (Von Elbe *et al.*, 1981). Igualmente, en función de la actividad de agua, el oxígeno retenido en la remolacha deshidratada puede causar modificaciones en la betanina (Saguy *et al.*, 1984).

1.4.3.6 Acción enzimática

Otro mecanismo de decoloración de la betacianina y de la betaxantina, particularmente en la remolacha, es por la acción enzimática que alcanza su máximo a un pH 3.4 (Shi y Maguer, 2000), en apariencia debido a la actividad de las peroxidasas.

1.5 Fuentes de colorante E-162

1.5.1 La remolacha, *Beta vulgaris*

Aunque se trata probablemente de una planta originaria de Europa, no fue empleada como hortaliza hasta hace relativamente poco tiempo, siendo citada por primera vez para tal fin en el siglo XVI.

La remolacha pertenece a la Familia *Chenopodiaceae* y su nombre científico es *Beta vulgaris* L., variedad cruenta Alef. o *Beta vulgaris* L. spp. *vulgaris*, var. *conditiva* Alef. (Maroto, 2002).

Existen numerosas variedades de la especie, de las cuales algunas se emplean para la alimentación humana, otras como pienso para ganado, y otras para la producción de azúcar (la remolacha azucarera, *Beta vulgaris* variedad altísima); otras, entre ellas la *Beta vulgaris* variedad cicla, se cultivan por sus hojas.

La remolacha de mesa una planta muy apreciada, sobre todo en los países anglosajones. Determinadas industrias extraen de la remolacha el colorante rojo, la betanina, utilizado en sopas deshidratantes, yogures, ketchup, etc. Algunas variedades forman en mayor cuantía el colorante amarillo denominado betaxantina (Maroto, 2002).

En función de la forma de sus “raíces”, comercialmente se distinguen dos grupos: alargadas (pueden llegar hasta 30-40 cm de longitud) y redondeadas o aplastadas. Este segundo tipo de remolachas de mesa son las más cultivadas y las de mayor aceptación con miras a la exportación.

La remolacha es una planta bianual, que durante el primer año de cultivo produce una roseta de hojas de márgenes enteros o sinuosos, forma oval, con pecíolos alargados y limbos lisos o abullonados. Paralelamente, en este primer año hipertrofia la parte superior de su raíz junto con elementos caulinares, formando un tubérculo hipocotileo cuya forma puede ser alargada, redondeada o aplastada, que es de color rojizo o amarillento según la proporción de betacianina: betaxantina, estando controlado el contenido en betaxantina por un gen recesivo sencillo (Peirce, 1987).

El segundo año de cultivo, la planta emite el tallo floral que aloja una inflorescencia compleja larga y laxa en la que se agrupan las flores monoclamídeas, de color verde-amarillo.

El desarrollo de la remolacha de mesa es más rápido que el de la remolacha azucarera, pero pueden detectarse las mismas fases que son: período juvenil, período de adolescencia y período de maduración y reproducción sexual, lo que suele ocurrir el segundo año de cultivo (Moule, 1972).

Prefiere climatologías suaves, húmedas, aunque es de relativamente fácil adaptación. La remolacha es, por otra parte, una planta altamente resistente a la salinidad.

Durante los primeros estadios de desarrollo resiste muy poco el frío.

En términos generales, las remolachas de mesa redondas se cosechan cuando han adquirido un diámetro comprendido entre 3 y 6 cm, aunque esto es variable según los cultivares, el destino a que van dirigidas y los requerimientos del mercado. En conjunto, las remolachas más apreciadas son las que pesan entre 100 y 300 gramos (Faure, 1979).

Una vez recolectada la remolacha, su conservación debe hacerse a 0°C y 90-95% de HR, lo que puede mantenerla en buenas condiciones durante uno-tres meses.

Como objetivos perseguidos por la mejora genética puede destacarse uno que es el mayor contenido en pigmentos (betacianina y betaxantina), existiendo poblaciones de remolacha con contenidos pigmentarios muy elevados.



Figuras 4 y 5. Remolachas utilizadas como colorante alimentario natural

Watson y Gabelman (1982) estudiaron la influencia que sobre determinados parámetros de interés para la industria tienen factores de cultivo tan diversos como la variedad, la época de cultivo y sus interacciones. En el caso del contenido en betacianina (colorante rojizo), las variaciones experimentadas a lo largo del ciclo eran muy heterogéneas según la variedad y el ciclo utilizados, mientras que en el caso de la betaxantina (colorante amarillento) y los sólidos disueltos, su contenido se incrementaba a lo largo del ciclo de cultivo. Durante los primeros 83 días de desarrollo se constataba una correlación negativa entre el peso de

las raíces y el contenido en ambos colorantes, pero esta relación se atenúa al final del ciclo de cultivo (135 días).

1.5.1.1 Ventajas y desventajas de la remolacha como fuente colorante

Los extractos de la remolacha roja (*Beta vulgaris*) son considerados como una alternativa a los colorantes rojos para aplicación alimentaria frente a los colorantes de origen sintético, aunque su uso está limitado a alimentos deshidratados o refrigerados y en alimentos de corta duración, debido a que este colorante es susceptible a cambios con la luz y la temperatura (Han *et al.*, 1998).

Así la remolacha roja, es una buena fuente de pigmentos rojos. En particular, la raíz de la remolacha roja contiene betacianinas rojas: betanina, betanidina, prebetanidina; y betaxantinas de color amarillo: vulgaxantina I y vulgaxantina II.





Tras la maceración y extracción acuosa de la raíz de remolacha se obtiene un jarabe rojo oscuro, y de éste un polvo muy hidrosoluble. Se comercializa en ambas formas. La remolacha contiene una concentración de pigmentos entre 100 y 300 mg/100 g peso fresco (Francis y Lauro, 2000).

La betanina (D-glucopiranosido de la betanidina $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$. P.M. 550), es el agente colorante mayoritario. Las especificaciones alimentarias precisan que una preparación comercial debe contener al menos el 1% de betanina cuando esta preparación es líquida y al menos 4% cuando está en forma de polvo (Multon, 2000).

Uno de los inconvenientes que presenta el colorante rojo remolacha es que tiene un aroma característico desagradable a tierra, debido a la presencia de geosmina y de 3-sec-butilo 2-metoxipirazina, así como su elevado contenido en nitratos por tratarse de una raíz. Este hecho puede limitar sus aplicaciones en alimentos, o requerir un tratamiento adicional para eliminar este mal aroma.

Las alternativas a la remolacha como fuente de betanina son las flores de Amaranteaceas y los frutos de algunas especies de Cactáceas. En ambos casos los productos están libres de geosminas, siendo sus propiedades aromáticas más aceptables (Castellar *et al.*, 2003).

Tabla 1. Diferentes tonalidades del colorante E-162

Código UE: E162	
Uso de	Colorante
Otros nombres	Betanina o Rojo Remolacha
Cantidad	Tonalidad
1 MOL/1L agua*	
1/2MOL/1L agua*	
1/4MOL/1L agua*	
1/8MOL/1L agua*	
(*) 1 litro de agua desmineralizada. Colores aproximados debido a que el color final no es de tonalidad transparente	

1.5.2 El género *Opuntia*

Opuntia es un género de la Familia de las cactáceas, que consta de más de 300 especies todas oriundas del continente americano desde el norte de Estados Unidos hasta la Patagonia, donde viven silvestres. Fueron introducidas en Europa por los conquistadores y se naturalizaron fácilmente en la región mediterránea. La especie más cultivada y estudiada es *Opuntia ficus-indica*; sus frutos comestibles, las tunas o higos chumbos, son muy populares en México, Andalucía y el Levante español. Se cree que el nombre de *Opuntia* alude, al parecer, a la región griega Locris Opuntia, cuya capital era Opus, zona donde crecían varias plantas espinosas.

Este extenso género abarca plantas de muy diferentes tamaños, desde la pequeña *Opuntia micordasys* var. *albispina*, llamada comúnmente "ala de ángel" por sus gloquidios de diminutas espinas blancas que le dan un aspecto afelpado, hasta especies arbustivas o arbóreas con tronco y copa, como la *Opuntia leucotricha*, que puede llegar a medir 5 m de altura. Son plantas muy rústicas y ramificadas, con ramas muy extendidas o inclinadas. Los segmentos son característicos del género, con apariencia de hoja carnosa, planos y generalmente ovales; poseen la capacidad de convertirse en tallos y a su vez emitir nuevos segmentos y flores.

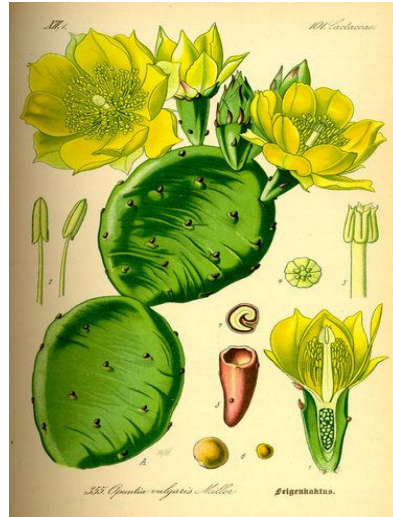


Figura 6. Detalle botánico de una planta de *Opuntia*

Otra peculiaridad son los gloquidios alrededor de las areolas; cojincillos de diminutas y finas espinas (como cabellos) que dan a algunas especies aspecto afelpado. El manejo de estas especies se debe hacer con mucho cuidado, ya que estas espinas se desprenden al simple roce y cuando entran en contacto con la piel producen comezón y enrojecimiento.



Figuras 7 y 8. Hoja de una planta de *O. stricta* y vista de los frutos verdes

Algunas especies poseen duras espinas de hasta 10 cm recubiertas por una vaina dentada en sentido opuesto. Las flores de estas plantas son grandes, muy abiertas, de aspecto satinado y de colores que varían entre el amarillo, naranja, rojo y hasta púrpura, aparecen en las areolas, en los bordes de los segmentos, pudiendo nacer a veces incluso en las areolas de

los frutos, lo que origina un grupo de frutos arracimados surgidos de cada flor.

Las Opuntias son un depósito natural de agua. Las partes comestibles son muy apreciadas para el ganado durante épocas de sequía, por lo que es una de las principales plantas cultivadas en las regiones áridas y semiáridas de México. Las características tanto fisiológicas como anatómicas de esta especie le hacen soportar difíciles condiciones en su hábitat debido al tipo de raíz, la constitución de las hojas, la constitución de su sistema vascular y parámetros fisiológicos que influyen en su adaptación (Flores-Hernández *et al.*, 2004). Además, las especies de Opuntia tiene unos requerimientos mínimos de tierra y de agua y debido a su metabolismo CAM se considera un cultivo alternativo interesante para zonas con pluviometría limitada (Castellar *et al.*, 2003).

Además, los frutos de *Opuntia* se caracterizan por ser de una gran importancia nutraceútica y funcional, habiéndose estudiado sus diversas actividades farmacéuticas como antiinflamatorio, hipoglucémico, inhibidor de úlceras estomacales, asma bronquial y efectos neuroprotectores por su elevada actividad antioxidante. Existen empresas de productos nutricionales, dietéticos, cosméticos, etc., que comercializan preparados de *Opuntia* para muy diversos usos (Castellar, 2008).

1.5.2.1 *Opuntia ficus indica*

Opuntia ficus indica es como se ha dicho anteriormente la especie más estudiada de todas las Opuntia. Su cultivo está dedicado a la producción de sus frutos y ciertos derivados, tales como zumos, mermeladas y frutas deshidratadas (Castellar *et al.* 2003).

Entre sus nombres comunes o vulgares destacan dependiendo de su origen y distribución: Chumbera, Nopal, Tuna, Tunera, Tuna de Castilla, Tuna de España, Tuna española, y a los frutos se les denomina como Higo Chumbo, Higo de pala, etc.

El cultivo de la chumbera es un cultivo “estrella”, que ayuda a enfrentar los serios problemas provocados por el incremento del contenido de CO₂ en la atmósfera, sequías persistentes, y desertificación. Resulta ser una poderosa máquina biológica que utiliza bajas dosis de agua y alcanza altas producciones.

Es un cactus en forma de matorral o arbóreo. Crece rápidamente hasta una altura de 4 m y lo mismo de ancho. Planta autógama, cuyo fruto es obtenido de flores hermafroditas y de polinización prevalentemente entomófila. La baya es de forma ovoidal, unilovular, polisperma y carnosa, umbilicada en el extremo superior y provista de un pericarpio coriáceo cubierto de numerosas espinas. La pulpa, una vez madura, es jugosa, mucilaginoso, azucarada y muy aromática, con las semillas incrustadas en su seno, caracterizadas por su pequeño tamaño y por poseer gran dureza. Aunque su destino principal en el mercado es el consumo en fresco, recientes investigaciones se han centrado en la utilización de este fruto como fuente de pigmentos (Obón et al., 2003).



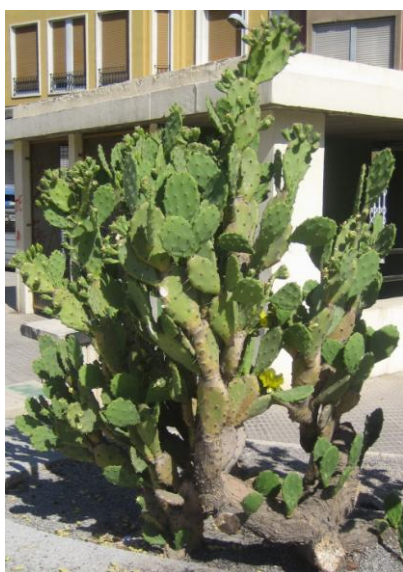
Figuras 9 y 10. Planta y fruto de *O. ficus-indica*

Su clima ideal es el templado-cálido con abundante insolación. En el hemisferio norte el límite máximo para su cultivo se encuentra cerca de los 40° de latitud. Se adapta bien a temperaturas medias máximas de 20 a 30°C. Es muy resistente a la sequía, pero se beneficia si tiene agua en los meses de verano. Para una buena maduración de los frutos se requieren temperaturas de 25 a 32°C y mínimas de 6°C. La chumbera se adapta a cualquier tipo de suelos, aunque prefiere suelos pedregosos, ligeros y arenosos. El pH adecuado es el neutro o ligeramente alcalino. Puede multiplicarse por semillas o esquejes.

Para la obtención de colorantes son varias las posibilidades que ofrece la chumbera, ya que los pétalos de las flores y los frutos contienen pigmentos de color rojo y amarillo, fácilmente solubles en agua, utilizados principalmente para colorear alimentos (Castellar *et al.*, 2003).

1.5.2.2 *Opuntia stricta*

Opuntia stricta es un cactus de unos 2 metros de altura que produce unos frutos de pequeño tamaño, piriformes y de aproximadamente 2.5 × 4.5 cm. Las flores son muy vistosas, de aspecto satinado y color amarillo. Se trata de una especie invasora en continentes como África y Australia (Randall, 2002). En Europa la podemos encontrar, entre otros, en el nordeste de la Península Ibérica (Gimeno y Vilà, 2002) y en el sureste (Valencia y Murcia) (Guillot y Van Der Meer, 2001).



Figuras 11 y 12. Planta y flor de *O. stricta* en Murcia

Opuntia stricta produce concentraciones de betalaínas similares o mayores incluso que las variedades de remolacha cultivadas para este fin (Fernández-López *et al.*, 2002), por lo cual se propone como recurso alternativo frente a la remolacha roja como fuente de este pigmento, ya que posee además mejores propiedades nutricionales y organolépticas, al concentrarse el pigmento en un fruto.

1.5.2.2.1 Maduración de frutos de *Opuntia stricta*

Para una buena maduración de los frutos de *Opuntia* se requieren temperaturas cálidas de 25 a 32°C y mínimas de 6°C.

Entre los índices visuales para determinar el grado de madurez tenemos:

- Color: El fruto del higo pasa de un color verde oscuro a matiz verde claro, luego se torna a un color rojizo cada vez más intenso convirtiéndose en púrpura hasta que alcanza su plena madurez.
- Brillo: cuando el higo inicia su maduración cambia su aspecto de opaco a brillante.
- Fruto: la forma ovalada del fruto es uno de los signos de que el fruto se encuentra en condiciones para ser cosechado ya que cuando está verde su forma es más alargada y de menor diámetro.

El fruto de *O. stricta* posee en la superficie unas espinas muy finas las cuales son más fuertes cuando el fruto esta verde y se vuelven frágiles y fáciles de desprender a medida que éste avanza en sus grados de madurez. La densidad de sus espinas es baja y poseen una piel fina lo que favorece la extracción de su pigmento ya que no es necesario pelar el fruto o quitar sus semillas. La mayor facilidad para arrancar el fruto de la planta es además otro indicativo de su estado de madurez.

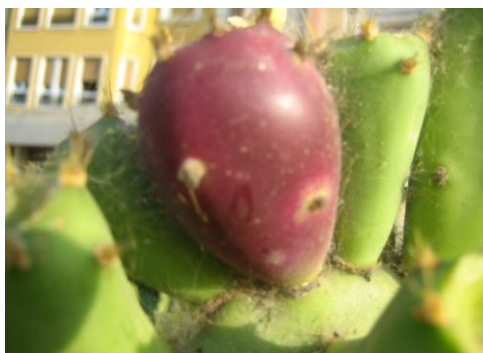


Figura 13. Fruto maduro de *O. stricta*

1.5.2.2.2 *Opuntia stricta* como fuente de betaninas

Son varias las especies de *Opuntia* que poseen frutos rojos. Entre ellas la especie *Opuntia stricta* que ha sido ampliamente estudiada por el grupo de investigación QUIMYTEC de la Universidad Politécnica de Cartagena.

En trabajos previos de este grupo de investigación se ha constatado la alta estabilidad (Castellar *et al.*, 2003) así como las propiedades antioxidantes (Obón *et al.*, 2003) de los pigmentos de *Opuntia stricta*, lo que les da la calificación de alimentos funcionales e incrementa

su valor añadido. Además se han hecho trabajos en los que se ha aplicado el extracto de *O. stricta* (higo chumbo) en diferentes alimentos (yogur, postre de gelatina y refresco) y dicha aplicación se ha comparado con la de *Beta vulgaris* (remolacha roja) y *Brassica oleracea* (lombarda roja) en los mismos alimentos, resultando el colorante de *Opuntia* apto para su uso comercial en yogur y productos refrigerados (Donate, 2005).

En más recientes estudios se ha llevado a cabo un proceso de secado por atomización de zumos de *Opuntia stricta* el cual ha permitido obtener elevados rendimientos y productividades y un colorante rojo púrpura en polvo con grandes posibilidades también a nivel de comercialización (Molina, 2005).

Resulta claro que una alternativa a la utilización de la remolacha roja como fuente de betanina sería el colorante obtenido de los frutos de *Opuntia stricta*. Ésta especie ofrece considerables ventajas tecnológicas y sensoriales como fuente de betaninas. Los frutos de *O. stricta* poseen un gran aroma y sabor a fruta fresca y poseen mejores propiedades nutricionales que la remolacha roja. Además estos frutos no muestran toxicidad, sus pigmentos no provocan ninguna reacción alérgica y este colorante puede ser utilizado sin necesidad de someterse a la certificación como colorante alimentario, debido a que posee la misma composición química que el colorante de remolacha roja, y cumple todos los requisitos exigidos a un colorante natural. Así, el colorante rojo obtenido de *Opuntia stricta* también podría catalogarse como E-162 (Castellar *et al.*, 2006).

Además los extractos de higo chumbo tienen una alta concentración de ácido ascórbico, más alta incluso que de carotenoides. El ácido ascórbico total contenido está en un rango desde 10 a 11 mg/g de peso fresco en higo chumbo de piel púrpura y de 23 a 792 mg/g de peso fresco en frutos de piel roja, con lo que se considera más alta que la media de vitamina C contenida en frutos comunes, tales como albaricoques, uvas o manzanas.

Por otro lado, *O. stricta* es una eficaz fuente de pigmentos de betacianina. Contiene altos niveles de betanina (800 mg/kg^{-1}), como cinco veces más altos que los encontrados en los frutos rojos de *Opuntia ficus-indica* e incluso mayor que algunas variedades de remolacha roja comercial utilizados por su color púrpura. El extracto de *O. stricta* carece de las betaxantinas amarillas, y la betanina y la isobetanina son las betacianinas mayoritarias presentes. Dichas betacianinas son las mismas que existen en

la remolacha roja (Castellar *et al.*, 2006). También se ha encontrado que los frutos de *O. stricta* tienen un elevado contenido en compuestos funcionales: vitamina C, quercitina, kampferol, rhamnetina o isorhamnetina, entre otros (Castellar, 2008).

Si a esto le sumamos que se trata de un cultivo con bajos requerimientos hídricos, tenemos una especie vegetal cuyo cultivo se puede potenciar en zonas áridas y semiáridas para obtener un producto de alto valor añadido, útil para la industria agroalimentaria.

II

**Evolución de compuestos funcionales durante
la maduración de frutos de *Opuntia stricta***

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Este proyecto ha sido planteado por el grupo de investigación de Tecnología Química y Agroalimentaria del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT, por la necesidad de estudiar más a fondo los compuestos producidos por la especie *Opuntia stricta*.

Actualmente existe un interés creciente en el desarrollo de ingredientes naturales para su uso en la industria agroalimentaria, el cual se ha visto reforzado por la gran demanda de productos naturales por parte de los consumidores. Esta tendencia conlleva también un considerable interés en obtener colorantes alimentarios de fuentes naturales, además de otros productos con propiedades funcionales.

Se sabe que la betanina es el pigmento mayoritario de la remolacha roja, y está admitido como colorante alimentario con la designación E-162 en la Unión Europea. *Opuntia stricta* también produce este pigmento, con concentraciones similares o mayores que las variedades de remolacha cultivadas para este fin.

La recolección del fruto en el momento de mayor producción de pigmentos llevaría a optimizar la obtención de estos compuestos con el máximo rendimiento. En trabajos previos se ha optimizado el proceso de extracción y caracterización de los pigmentos. Se ha constatado su alta estabilidad, así como sus propiedades antioxidantes, lo que les confiere la calificación de alimentos funcionales e incrementa su valor añadido.

Así, el objetivo general que se propone en el presente Proyecto Fin de Carrera se centra en el estudio de la maduración de los frutos de *Opuntia stricta* y en la determinación de su momento óptimo de recolección con el fin de optimizar el proceso de producción de betalaínas. De forma más concreta, se han perseguido tres objetivos fundamentales:

- Estudiar la evolución morfológica y de color durante la maduración de frutos de *O. stricta*.
- Caracterizar los zumos obtenidos de los frutos obtenidos en distintos estados de maduración.
- Analizar la evolución de los pigmentos y de otros metabolitos durante la maduración de los frutos de *O. stricta*.

II. JUSTIFICATION AND OBJECTIVES

This project has been planned by the group of investigation of Chemical and Food Technology in the Chemist and Environmental Engineering Department of the Polytechnic University of Cartagena, by the need of studying more profoundly the compounds produced by the specie *Opuntia stricta*.

Nowadays there is an increasing interest in the development of natural ingredients for their use in food industry. This interest has been supported due to the high demand of natural products by the consumers. This tendency entails also a considerable interest in obtaining food colorants from natural sources, besides other products with functional properties.

It's known that the betanin is the principal pigment in the red beetroot, and it's admitted as a food colorant with the designation E-162 in the European Union. *Opuntia stricta* also produces this pigment, in similar or higher concentrations than the varieties of *Beta vulgaris* cultivated for this purpose.

The harvest of the prickly pear fruit at the moment of the biggest production of pigments would optimize the extraction of these compounds with the maximum performance. The process of extraction and characterization of these pigments has been optimized in previous works. It has been verified their high stability and antioxidant properties, qualities that confer them the qualification of functional food-stuffs and increases their added value.

Therefore, the general objective proposed in the present Degree Final Project is to focus in the study of the maturation process of *Opuntia stricta* fruits and the determination of the optimum harvest-time with the aim of optimizing the process of betalains production. More specifically, three particular objectives have been pursued:

- Study the morphologic evolution and colour during the maturation of *O. stricta* fruits.
- Characterize the obtained fruit juices at different states of the maturation.
- Analyze the pigments evolution and other metabolites during the cycle of maturation of *O. stricta* fruits.

III

**Evolución de compuestos funcionales durante
la maduración de frutos de *Opuntia stricta***

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1. Material vegetal

Se selecciona una especie de *Opuntia* denominada *Opuntia stricta* (*Haw*). Los frutos se recolectan en Murcia a lo largo de todo un año. En cada muestra se recolectaron una media de 10 frutos. Tras la recolección son llevados directamente al laboratorio siendo posteriormente almacenados en un congelador a una temperatura de -20°C hasta su utilización para la obtención de zumo y la extracción de sus compuestos.

3.1.2 Productos químicos

En el análisis por HPLC se usan acetonitrilo y etanol procedentes de los Laboratorios Scan (Dublín, Irlanda). El ácido acético es de Panreac (España). El agua es purificada en un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

Los patrones usados han sido L-Tirosina (4-hidroxifenil-L-alanina) de la casa Fluka 93830-25G, L-Dopa (2,4-dihidroxifenil-L-alanina) procedente de la casa comercial Aldrich 37830-5G, ácido málico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$), ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) y ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) de la casa Panreac y ácido gálico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5\text{H}_2\text{O}$) de la casa Fluka. Además se utilizan ácido 3,5-dinitrosalicílico de Sigma y una disolución de tartrato de sodio y potasio 4-hidrato 2,12M.

Para el análisis de fenoles totales se utiliza reactivo de Folin-Ciocalteu de la casa Merck, disolución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y ácido gálico.

3.2. Preparación de las muestras

3.2.1 Recogida de muestras y procesado de los frutos

Desde junio de 2005 hasta abril de 2006 se recogieron una media de 10 frutos de *Opuntia stricta* (*Haw.*) de una misma planta cada dos o cuatro semanas, desde la floración hasta la completa maduración de los frutos.

Tras la recolección se lavan los frutos cuidadosamente con agua y se eliminan los gloquídios.

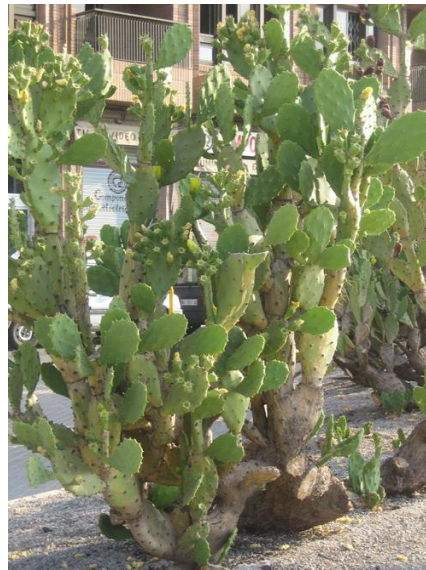


Figura 14. Vista de una planta de *O-stricta* en Murcia

3.2.2 Determinación de peso y dimensiones de los frutos

Se determina el peso fresco de los frutos lavados y secos mediante una balanza electrónica Gram Serie SV. Para obtener las dimensiones de los mismos se utiliza papel milimetrado determinando la medida tanto de la distancia longitudinal como transversal de cada uno de ellos.



Figura 15. Balanzas electrónicas Gram Serie SV y Sartorius BP 121S

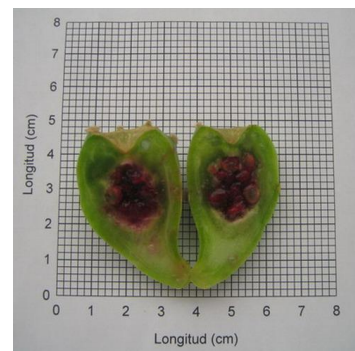


Figura 16. Fruto abierto longitudinalmente

3.2.3 Determinación del color externo

Las medidas de color externo de los frutos de *Opuntia* se determinan por reflectancia con un espectrofotómetro modelo Minolta serie CM-508i. Dichas medidas se llevaron a cabo por triplicado. De esta

manera se obtienen los valores de Lab. L* indica claridad, a* refleja el valor del rojo/verde y b* indica el valor amarillo/azul.



Figura 17. Espectrofotómetro Minolta

3.2.4 Observación del corte longitudinal de los frutos

En cada recogida de muestras se realiza el corte longitudinal en uno de los frutos representativo del grupo y se le toman fotografías con una cámara digital modelo Canon Ixus 40, lo que nos permite realizar una clasificación del estado de madurez con el fruto abierto. Esta clasificación se hace según el siguiente criterio: muy inmaduro, inmaduro, poco maduro, moderadamente maduro y maduro.

3.2.5 Conservación de los frutos

A continuación se almacenan los frutos en bolsas herméticas en un arcón congelador y debidamente etiquetadas a una temperatura de -20°C hasta su posterior utilización.



Figura 18. Muestras del fruto preparadas para congelar

3.2.6 Obtención del zumo de los frutos de *Opuntia stricta*

Para la preparación del zumo, los frutos de *Opuntia stricta* se sacan del congelador, se les deja unos 30 minutos aproximadamente para que se descongelen y acto seguido se homogeneizan con un homogeneizador Ultraturrax modelo Ika Labortechnik T25 basic, Alemania, a una velocidad de unas 3000 a 4000 rpm. Se realiza entonces el envasado adecuado de las muestras trituradas en botes de plástico estériles con una capacidad de 100 ml.



Figura 19. Homogeneizador utilizado en el experimento

Para obtener el zumo, y dada la alta viscosidad que presentan estos frutos, se hace necesaria la centrifugación de las muestras. En este proceso se eliminan los restos vegetales insolubles, semillas y parte de mucílagos. La centrifugación se realiza en una centrífuga refrigerada modelo Hermle Z383K (Wehingen, Alemania) y se tratan a razón de 15000 rpm durante quince minutos y a una temperatura de 19°C. El zumo, una vez decantado, se guarda en botes de plástico estériles de 100 ml de capacidad.



Figura 20. Centrífuga utilizada en el laboratorio

3.2.7 Determinación de peso seco

La determinación del peso seco y contenido de humedad de las muestras de higos se realizó con muestras de higos triturados, manteniéndolos a una temperatura de 35°C en una cámara de cultivo con ventilación hasta peso constante. Por diferencias de peso se obtuvieron los valores de peso seco y contenido en humedad.

3.2.8 Obtención de extractos de frutos de *Opuntia stricta*

La extracción de pigmentos se lleva a cabo utilizando primeramente una relación 1:5 referido a masa fruta (g)/volumen de agua (ml). Para la extracción, el homogeneizado se agita 20 minutos en condiciones de oscuridad. Tras la agitación las muestras se clarifican por centrifugación a 15000 rpm y una temperatura de 10°C durante 10 minutos en la centrífuga citada anteriormente con el fin de separar los residuos de tejido vegetal. El líquido sobrenadante se filtra a través de filtros de nylon de 0.45 μm (Lida, Kenosha, WI, USA) y los extractos obtenidos se analizan en primer lugar espectrofotométricamente y posteriormente se analizan usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

3.3. Métodos de análisis

3.3.1 Determinación de pH

El pH es el parámetro que permite conocer la concentración de protones (H^+) existentes en un medio. Para su determinación se utiliza un pHmetro micropH 2000 de la casa Crisol (Figura 21), el cual nos permite obtener medidas con una precisión de 0.001 unidades de pH.



Figura 21. pH-metro Crisol

Este pHmetro está controlado internamente por un micro procesador y se calibra antes de su uso con unas disoluciones tampón de pH 7.00 y 4.00.

3.3.2 Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en un jugo o pulpa. Para medir estos sólidos solubles se utiliza un refractómetro de mano ABBE. Se coloca una pequeña cantidad de muestra líquida de cada uno de los zumos en el campo del refractómetro y se lee sobre una escala de 0 a 32°Brix. Antes de cada nueva medida se calibra el aparato con agua situándolo en la posición 0.



Figura 22. Refractómetro manual ABBE

3.3.3 Análisis espectrofotométrico

Las muestras a analizar se diluyen por 100 o por 10 dependiendo de su concentración. A continuación se centrifugan durante 10 minutos a 13000 rpm antes de llevar a cabo el análisis espectrofotométrico de los zumos. Dicho análisis se lleva a cabo con un espectrofotómetro modelo Angilent 8453 UV-Visible (Waldbronm, Alemania) utilizando cubetas de cuarzo. Se hace previamente la línea base con agua.

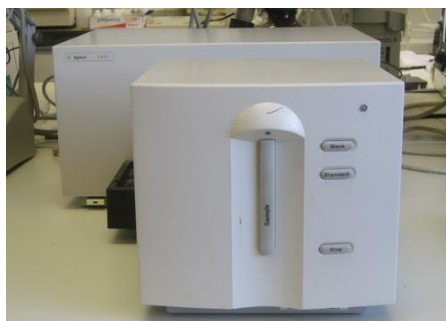


Figura 23. Espectrofotómetro Angilent

Los barridos de absorbancia se llevan a cabo en el rango de longitudes de onda entre 200 y 800 nm.

El contenido de pigmento rojo, definido como cantidad de pigmento (mg) por 100g de fruto se refirió a betanina y se determinó usando el coeficiente de extinción $E^{1\%}_{1\text{cm}}=1210$.

3.3.4 Análisis de fenoles totales

Para calcular la concentración de polifenoles totales se usa el método de Skerget *et al.* modificado. El resultado se expresa en g de ácido gálico/kg de extracto utilizando el método espectrofotométrico basado en una reacción colorimétrica de oxidación-reducción. Para ello se ha utilizado el reactivo Folin-Ciocalteu. Este reactivo consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{10}$) y de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$), que se reduce, por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida posee una absorción máxima aproximadamente a los 700 nm y es proporcional a las tasa de compuestos fenólicos. En este caso el reactivo utilizado, de la casa Merck, se diluye por 10.

Se prepara una disolución de ácido gálico a una concentración de 50mg/l. Para realizar la recta de calibrado del patrón se colocan 6 tubos en una gradilla y a cada tubo se le añade la cantidad de agua, ácido gálico y reactivo Folin indicado en la tabla 2, con el fin de hacer una recta de calibrado del reactivo.

Tabla 2. Preparación de las muestras para la calibración del método de fenoles totales con ácido gálico

Número de tubo	H ₂ O (µl)	Ácido gálico (µl)	Reactivo Folin (µl)
1	500	0	2500
2	400	100	2500
3	300	200	2500
4	200	300	2500
5	100	400	2500
6	0	500	2500

Se calienta durante 5 minutos a una temperatura de 50°C, se deja enfriar y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis a $\lambda=760\text{nm}$ (A_{760}) frente a un blanco preparado con agua destilada. De esta

manera, los resultados se referirán a g de ácido gálico/kg extracto o bien a mg de ácido gálico/ml de zumo.

Por otro lado, se preparan 9 tubos correspondientes a las 9 muestras de zumo desde junio hasta febrero. Se añaden 2.5 ml de reactivo Folin en cada uno de los tubos y una cantidad que va desde 50 a 200 μ l de zumo dependiendo de la cantidad de color que éste posea y todos ellos se llevan hasta 3 ml con agua destilada (ver Tabla 3). Se agitan para favorecer la mezcla y se dejan reaccionar 8 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se les adiciona 2 ml de carbonato de sodio Na_2CO_3 (75g/l) y se vuelve a agitar. Se incubará durante 5 minutos a una temperatura de 50°C y una vez concluido esto se dejará enfriar. Es entonces cuando se miden las absorbancias a una longitud de onda de 760 nm frente a un blanco realizado con 0.5 ml de agua.

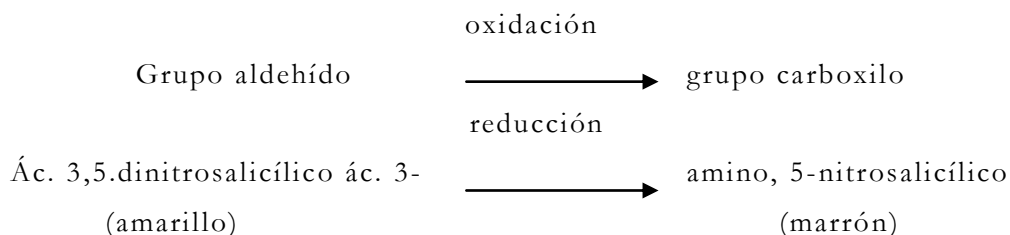
Tabla 3. Preparación de las muestras para el ensayo de determinación de fenoles totales

Número de tubos	Reactivo Folin (μ l)	Zumo (μ l)	H ₂ O (μ l)
1	2500	200	300
2	2500	200	300
3	2500	200	300
4	2500	100	400
5	2500	100	400
6	2500	100	400
7	2500	50	450
8	2500	50	450
9	2500	50	450

Se determina la cantidad de fenoles totales refiriéndola a ácido gálico, y se expresa como g. de ácido gálico/kg de fruta.

3.3.5 Análisis de azúcares reductores. Método DNS

El método DNS determina la presencia de grupos carbonilos libres (C=O), los llamados azúcares reductores. Se basa en la utilización de ácido 3,5-dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y, al mismo tiempo, su propia reducción, desarrollándose la siguiente reacción:



Según lo anterior, un mol de azúcar reaccionará con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, dando lugar a una relación estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. Esta reacción, además, se puede seguir fácilmente al espectrofotómetro ya que da lugar a una reacción colorimétrica: el ácido 3,5-dinitrosalicílico es de color amarillo, mientras que la aparición del ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico provoca un viraje a pardo oscuro-marrón, cuya intensidad será, por tanto, proporcional a la cantidad de azúcares reductores.

Primeramente se prepara el reactivo DNS disolviendo 5g de ácido dinitrosalicílico en 100 ml de NaOH 2N a T^a ambiente. Este reactivo se calibra con glucosa como azúcar patrón. A esto se le añaden 250 ml de agua y 150 g de sal de Rochelle (tartrato duplo de sodio y potasio). Una vez mezclado se lleva todo a 500 ml y se guarda en un frasco oscuro.

Una vez preparados los 500 ml de la disolución de glucosa con una concentración de 1 g/l (0.5 g en 500 ml) y para poner a punto el ensayo, se preparan 7 tubos de vidrio con las siguientes cantidades de glucosa indicadas en la tabla de forma que el volumen final en cada tubo sea de 500 μ l.

Tabla 4. Preparación de las muestras para la calibración del Método de azúcares reductores con glucosa

Número de tubo	Glucosa stock (μ l)	H ₂ O (μ l)
1	0	500
2	50	450
3	100	400
4	200	300
5	300	200
6	400	100
7	500	0

Uno de los tubos lo preparamos sin glucosa en las mismas condiciones que el resto de los tubos pues servirá de blanco a la hora de medir las absorbancias. Se añaden 500 μ l de reactivo DNS a cada tubo.

Esto se calienta durante 10 minutos a una temperatura de 100°C, se le añaden 2 ml más de agua a cada tubo y se mide con ayuda del espectrofotómetro la absorbancia a 540 nm. Se construye una recta patrón con los valores obtenidos.

Una vez hecho esto, para conocer la concentración de azúcares reductores que tienen nuestras muestras se diluyen éstas por 10 y se centrifugan en tubos eppendorf durante 5 minutos a 13000 rpm.



Figura 24. Centrifuga eppendorf

Una vez separado el precipitado del sobrenadante se vuelven a diluir dichas muestras, por 25 las de higos inmaduros y por 50 las de higos maduros. Se ponen 500 µl de muestra en cada tubo.

Seguidamente se añaden 500 µl de reactivo DNS a cada tubo y se incuba durante 10' a 85-100°C de temperatura. Entonces se enfría a temperatura ambiente, se añade a cada tubo 2 ml de agua y se lee la absorbancia a 540 nm frente al blanco exento de muestra. La concentración de azúcar se calcula referida a la de glucosa que se ha utilizado para calibrar el método.

3.3.6 Análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución

En la investigación de los pigmentos la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se ha convertido una técnica muy utilizada debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación y su aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en este caso la alimentaria (Skoog *et al.*, 2003)

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida,

la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija.

La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Después de depositar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Los distintos compuestos presentes en la muestra se separan según su mayor o menor afinidad con la fase móvil y la estacionaria. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de micras, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC), que ha sido la utilizada en este trabajo, consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención de cada compuesto dentro de la columna es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta

la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio por controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquier resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de silica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por silica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de silica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deberían estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC (Rubinson *et al.*, 2001).

En este análisis se utiliza un equipo de Cromatografía líquida de Alta Resolución (Waters, Milford. MA, USA) compuesto por dos bombas M510, un detector de fotodiodos (PDA) M996 y un inyector automático modelo 7125 (Rheodyne, Cotati, CA, USA). El HPLC funciona con un sistema de datos Millennium 2010. La columna usada es una C18 (fase reversa unida químicamente formada por cadenas de hidrocarburo lineal de 18 átomos de carbono) con un tamaño de partícula de 5 μm y de 250 mm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno de la casa Teknokroma (Barcelona, España). La elución es llevada a cabo siguiendo el método

propuesto por Strack *et al.* El método consiste en un gradiente lineal de concentración durante 27 min desde el 100% del disolvente A (agua + 0.5% ácido acético) al 88% del disolvente B (acetonitrilo + 0.5% ácido acético) con un flujo de 0.8 ml/min. En cada análisis se inyectan mediante una microjeringa en la columna cromatográfica 20 μ l (volumen de inyección) del extracto del fruto previamente filtrado. Las identidades de los diferentes picos cromatográficos se confirman por sus características del espectro visible en comparación a estándares y tiempos de retención, lo que permite identificar los aminoácidos presentes en la mezcla. La cantidad relativa de cada uno de ellos se determina calculando el área a la curva del pico correspondiente.



Figura 25. Equipo HPLC

IV

**Evolución de compuestos funcionales durante
la maduración de frutos de *Opuntia stricta***

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis morfológico del fruto

El análisis morfológico del fruto se ha llevado a cabo estudiando cómo evolucionan los higos desde el punto de vista de su tamaño, morfología y de su color externo.

4.1.1 Evolución de la morfología del fruto

Tal y como se ha explicado en la sección de materiales y métodos se realizó la medida de los frutos de *Opuntia stricta* durante el transcurso de la maduración de los mismos. El periodo de estudio fue desde junio de 2005 hasta febrero de 2006. La planta tuvo su máxima floración en el mes de mayo, por lo tanto la primera muestra de junio se ha considerado que corresponde al mes siguiente de tener lugar dicha floración.

A lo largo del proceso de maduración se observó como variaron las medidas del corte longitudinal y transversal y el diámetro de los frutos (Tabla 5). El tamaño medio de un fruto maduro fue de 4,9 cm de longitud x 2,8 cm de anchura.

Tabla 5. Evolución del tamaño de los frutos con el tiempo de maduración

Tiempo (mes)	Corte longitudinal (cm)	Corte transversal (cm)	Relación longitud/diámetro
junio	4.84±0.21	2.25±0.18	2.15±0.13
julio	4.66±0.34	2.26±0.14	2.06±0.24
agosto	4.36±0.32	2.34±0.19	1.86±0.21
septiembre	4.23±0.32	2.42±0.13	1.75±0.15
octubre	4.57±0.22	2.52±0.21	1.81±0.19
noviembre	4.95±0.63	2.63±0.27	1.88±0.38
diciembre	4.73±0.59	2.75±0.27	1.72±0.29
enero	4.65±0.36	2.73±0.20	1.70±0.12
febrero	4.72±0.62	2.86±0.20	1.65±0.23

Los frutos fueron engrosando a lo largo de la maduración pero su longitud no varió de forma significativa durante la misma.

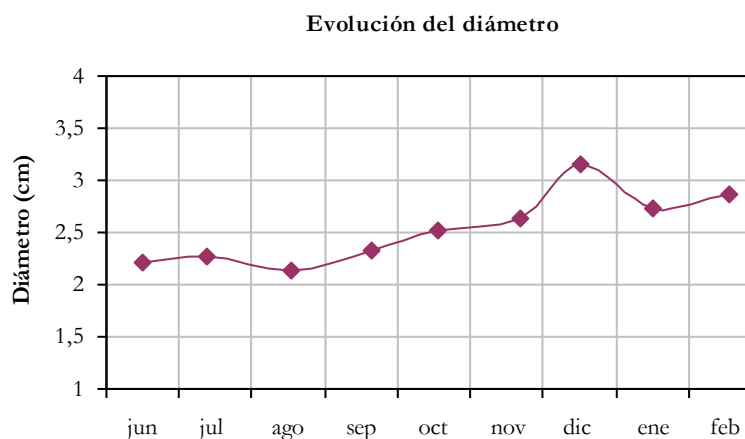


Figura 26. Evolución del diámetro de los frutos con el tiempo

En cuanto al peso, durante los primeros meses posteriores a la floración se produjo un aumento paulatino de éste, incrementándose de forma significativa durante los meses de septiembre a noviembre después de la floración, para estabilizarse entorno a una media de 24g por higo, hasta que se inició la senescencia del fruto nueve meses después de florecer.

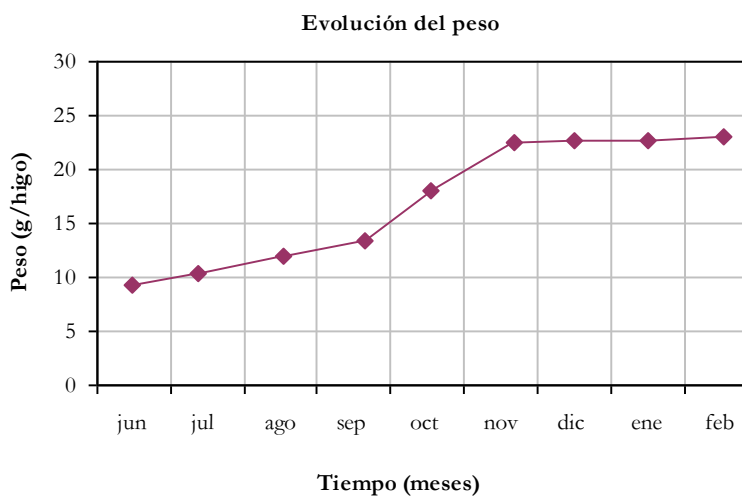


Figura 27. Gráfico de la evolución del peso con el tiempo

4.1.2 Evolución de la maduración del fruto

Durante la maduración, los frutos pasan a través de una serie de cambios de color, textura y sabor lo que indica que se están produciendo los cambios en su composición. En este caso, la evolución de la maduración se siguió atendiendo al color externo del fruto medido por reflectancia, como se indicó en el apartado de materiales y métodos.

En el modelo colorimétrico **La*b*** (también llamado *CIELab*), se indican los colores según tres valores:

- **L**, luminancia, expresado como porcentaje (desde el 0, que indica negro, hasta el 100, que indica blanco).
 - **a** y **b** dos gamas de colores, desde el verde hasta el rojo y desde el azul hasta el amarillo respectivamente, con valores que van del -120 al +120.
- Por lo tanto, el modo *Lab* abarca todo el espectro de visión del ojo humano y lo representa de manera uniforme, lo que hace posible describir todos los colores visibles.



Figuras 28, 29 y 30. Plantas de *O. stricta* en diferentes estados de maduración

Los valores obtenidos se correlacionaron con el índice de maduración observado, que se determinó de manera visual y se realizó una clasificación siguiendo el siguiente criterio: muy inmaduro, inmaduro, poco maduro, moderadamente maduro y maduro (García-Gutiérrez, 2006). A continuación se muestran las imágenes de los frutos íntegros y de su corte longitudinal.



Figuras 31 y 32. Muestra de junio (1mes)

Muy Inmaduro $L^* = 53,14$ $a = -14,73$ $b = 25,47$



Figuras 33 y 34. Muestra de julio (2 meses)

Inmaduro $L^* = 55,2$ $a = -13,41$ $b = 23,71$



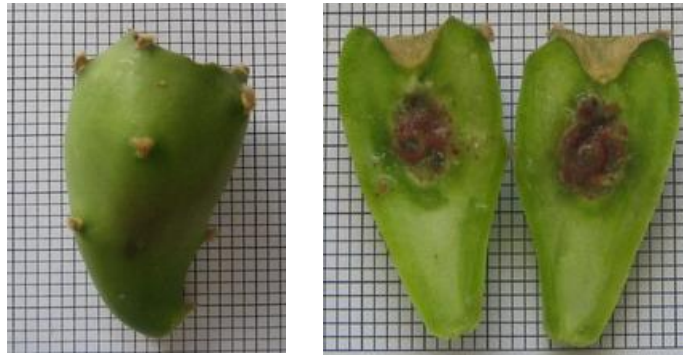
Figuras 35 y 36. Muestra de agosto (3 meses)

Inmaduro $L^* = 57,07$ $a = -13,32$ $b = 23,71$



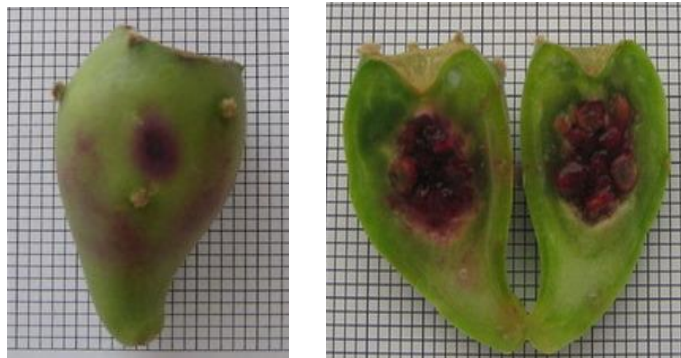
Figuras 37 y 38. Muestra de septiembre (4 meses)

Poco maduro $L^* = 60,46$ $a = -12,75$ $b = 27,74$



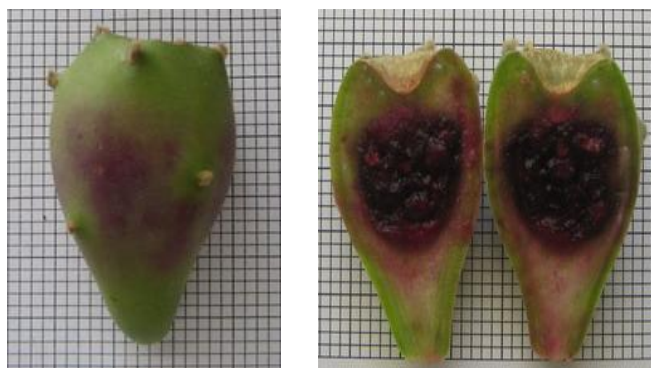
Figuras 39 y 40. Muestra de octubre (5 meses)

Poco maduro $L^* = 62,00$ $a = -12,04$ $b = 27,34$



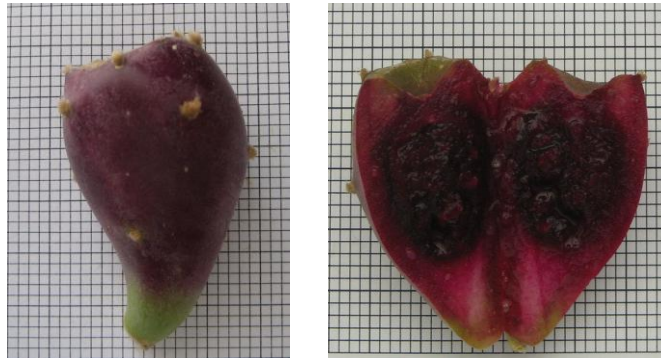
Figuras 41 y 42. Muestra de noviembre (6 meses)

Moderadamente maduro $L^* = 38,55$ $a = 22,60$ $b = -0,69$



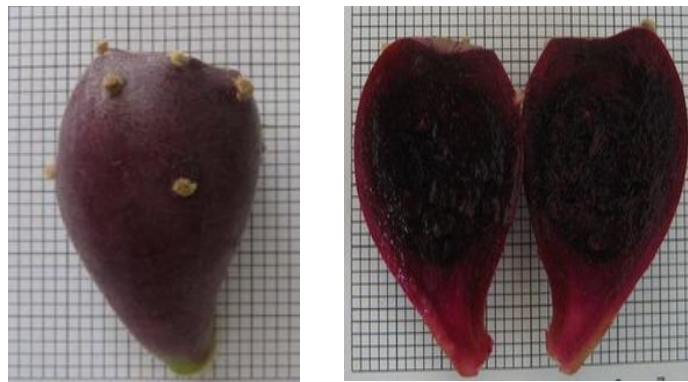
Figuras 43 y 44. Muestra de diciembre (7 meses)

Moderadamente maduro $L^* = 33,69$ $a = 19,28$ $b = -0,29$



Figuras 45 y 46. Muestra de enero (8 meses)

Maduro $L^* = 31,05$ $a = 17,73$ $b = 0,13$



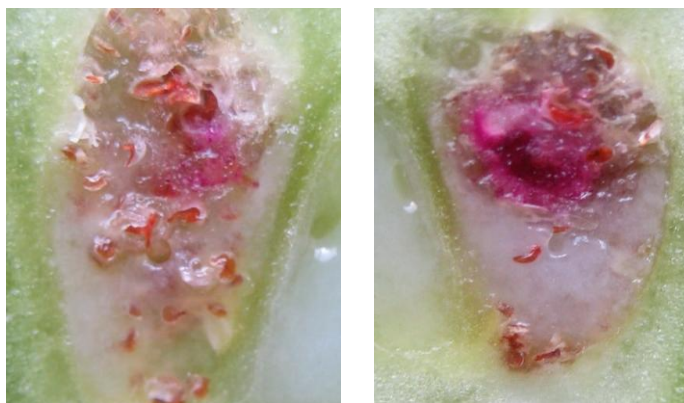
Figuras 47 y 48. Muestra de febrero (9 meses)

Maduro $L^* = 33,15$ $a = 15,68$ $b = -0,007$

Durante los primeros meses en los que el fruto aun está inmaduro o poco maduro (de junio a octubre) presentan una coloración verde oscura y con poco brillo. Son frutos piriformes y de menor peso. Poseen una reducida cantidad de semillas y la corona aparece hundida. Los gloquidios están espaciados y son de un color que van de amarillo a pardo marrón. Las espinas son finas, de tamaño desigual y se encuentran espaciadas en el fruto.

A medida que avanza la maduración los frutos adquieren un mayor grosor, es decir, un aspecto más globoso. Su color se va tornando a verde más claro (meses de septiembre y octubre) pasando después a rojo-violáceo hasta llegar en su plena madurez a un color casi púrpura (meses de enero y febrero). La difusión del pigmento se va produciendo poco a

poco desde la parte ovárica hacia el exterior, tal y como se puede ver en las Fig. 50 y 51. Los pigmentos comienzan a observarse ya en las vacuolas lo que resulta característico de las betaninas. Desde el endocarpio se comienza a teñir de rojo el fruto hasta llegar a la capa más externa del mismo, el epicarpio, como hemos visto anteriormente en el mes de febrero, momento en el que el fruto se encuentra ya completamente maduro y teñido de color púrpura.



Figuras 49 y 50. Detalle de la difusión del pigmento en el interior del fruto de una muestra correspondiente al mes de agosto

La pulpa del fruto va perdiendo su aspecto mucilaginoso para volverse más acuosa. El fruto adquiere un aspecto brillante, presenta una piel fina y se desprende con gran facilidad de la planta.

Cabe destacar que otras especies de *Opuntia* presentan la piel coloreada de púrpura y sin embargo su pulpa carece de estos pigmentos, como es el caso de *O. Argentina*. Otras como *O. dilleni*, *O. bergeriana*, *O. linguiformis*, etc., tienen un fruto maduro de características muy similares a *O. stricta*.

Mediante un diagrama cromático se muestra claramente como se va produciendo dicho cambio en el color conforme avanza la maduración. Los frutos pasan de una tonalidad verdosa en sus primeros estadios (+b*) a una tonalidad rojiza cuando alcanzan su completa maduración (+a*). Debe considerarse que más de 5 unidades de diferencia indican que el ojo humano ya es capaz de distinguir entre estos colores.

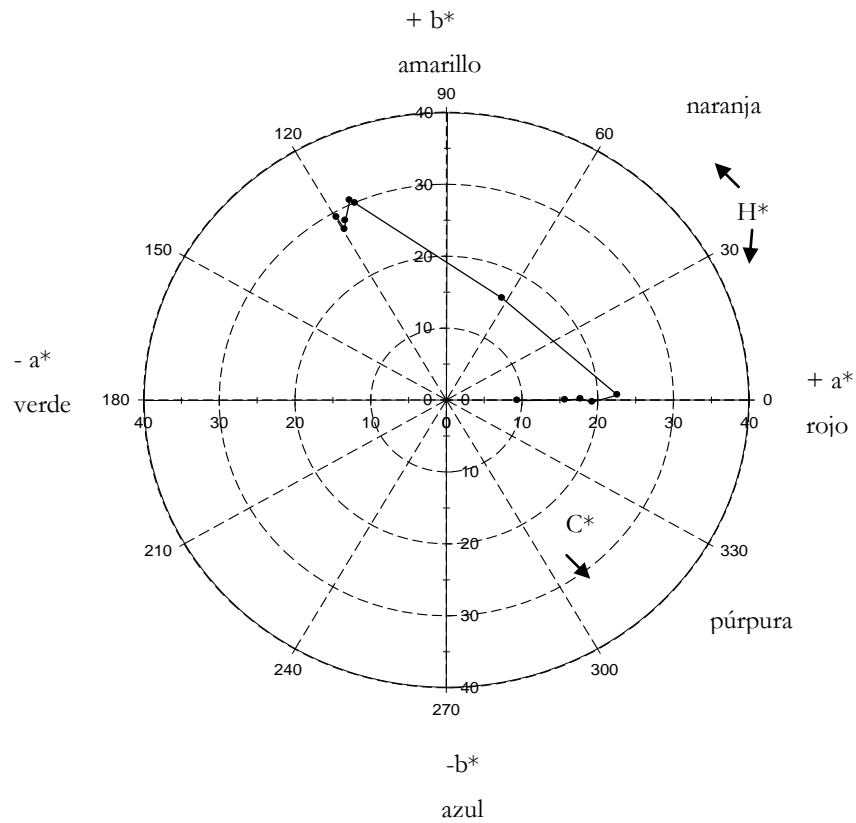


Figura 51. Diagrama cromático

4.2 Análisis del zumo de *O. stricta*

Una vez realizado el análisis morfológico y de color del fruto se procedió a obtener los zumos de las distintas muestras con el fin de realizar un análisis final de sus características. En la Figura 52 se puede observar una imagen de los zumos obtenidos.



Figura 52. Muestras de zumo de *O. stricta* a lo largo de la maduración

4.2.1 Determinación de peso seco

Para determinar el peso seco y el porcentaje en humedad se procedió a secar las muestras hasta peso constante, como se indica en Métodos y Materiales. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 6.

Como puede observarse tanto en la tabla 6 como en la figura 53, los cambios en humedad y por tanto en peso seco no son muy marcados a lo largo del estudio. Se observa una pérdida de humedad y aumento de peso seco coincidiendo con el periodo estival, que se explica por la falta de precipitaciones y la ausencia de riegos a la que se ve sometida la planta. Ésta se encuentra en un jardín de secano que prácticamente no se riega.

Tabla 6. Evolución del peso seco y porcentaje en humedad con la maduración del fruto

Tiempo (mes)	% Peso seco	% Humedad
Junio	11,912	88,088
Julio	14,832	85,168
Agosto	18,921	81,079
Septiembre	15,782	84,218
Octubre	12,593	87,407
Noviembre	11,827	88,173
Diciembre	12,969	87,031
Enero	10,683	89,317
Febrero	11,710	88,290

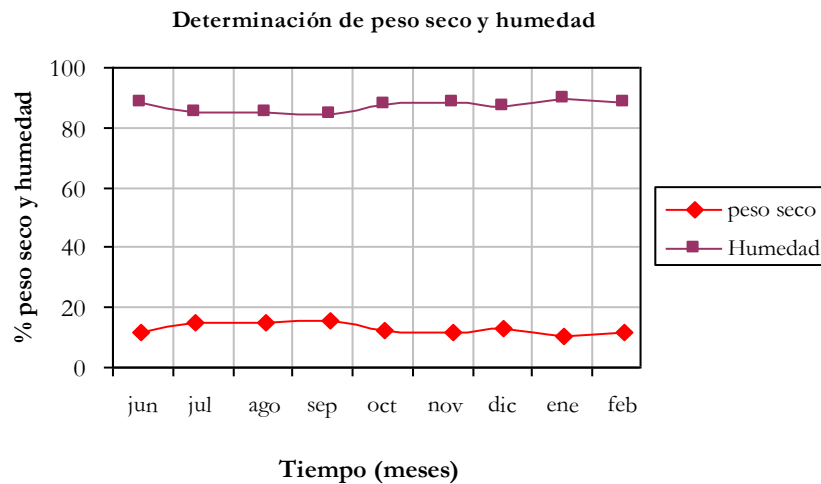


Figura 53. Evolución del peso seco y la humedad con el tiempo

4.2.2 Azúcares

Los azúcares se determinaron tanto en forma de sólidos solubles como de azúcares reductores. Los azúcares mayoritarios en los zumos de *O. stricta* son glucosa y fructosa, ambos con propiedades reductoras.

4.2.2.1 Sólidos solubles

Se llevó a cabo la medida de los grados Brix. En los meses de junio a septiembre los grados brix permanecen entorno a 5 y se produce un claro aumento del contenido de azúcar de los zumos de *Opuntia stricta* a partir de septiembre y hasta diciembre cuando tiende a estabilizarse en valores próximos a 11°Brix.

4.2.2.2 Azúcares reductores (DNS)

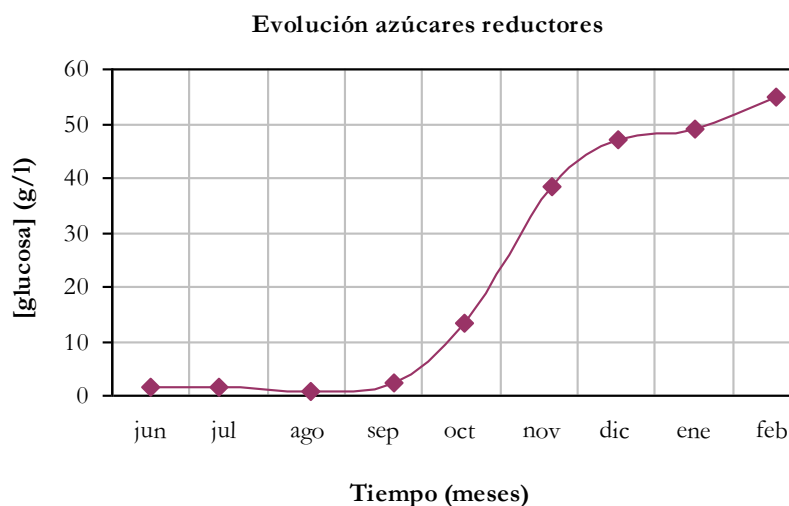


Figura 54. Evolución temporal de los azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se mantiene a un nivel muy bajo desde el mes de junio hasta septiembre, momento en el cual el fruto comienza a madurar. A partir de aquí se produce un aumento en lo que a concentración de azúcares se refiere, situándose en el mes de diciembre en un valor de 47,11 g/l. De diciembre a febrero el aumento es menos acusado debido a que el fruto se encuentra ya maduro.

El contenido en azúcares reductores, por lo tanto, está relacionado con la maduración, y en consecuencia, con el cambio de color que progresivamente se va produciendo en el fruto a lo largo de los meses.

4.2.3 Medida del pH

Los frutos de *Opuntia* tienen en general un pH ácido. Durante todo el proceso de maduración el pH se mantiene entre unos valores de 3,75 y 4,49 respectivamente, propios de éste pH. Se muestran valores más altos de pH al comienzo de la maduración, que van disminuyendo durante los meses de agosto y septiembre. En los cuatro meses posteriores el valor del pH se mantendrá hasta producirse un ligero aumento del pH desde los meses de diciembre a febrero.

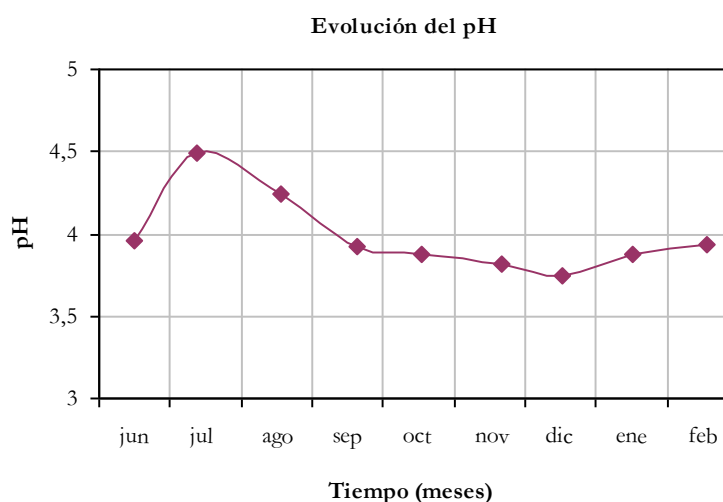


Figura 55. Evolución del pH con el tiempo

4.2.4. Determinación de polifenoles totales

La importancia de los compuestos fenólicos, presentes en la mayoría de alimentos, es considerable y está relacionada con dos factores de gran importancia: calidad y salud. Los beneficios para la salud de los compuestos fenólicos derivan en que son biológicamente activos, son antioxidantes y pueden poseer propiedades preventivas de diversas enfermedades.

El índice de polifenoles totales (IPT) es uno de los parámetros analizados relacionado con las propiedades antioxidantes. Se observa una evolución progresiva de la cantidad de polifenoles expresada como gramos de ácido gálico por kilogramo de fruta, a medida que avanza la maduración. La curva obtenida presenta el mismo perfil que la de los azúcares reductores.

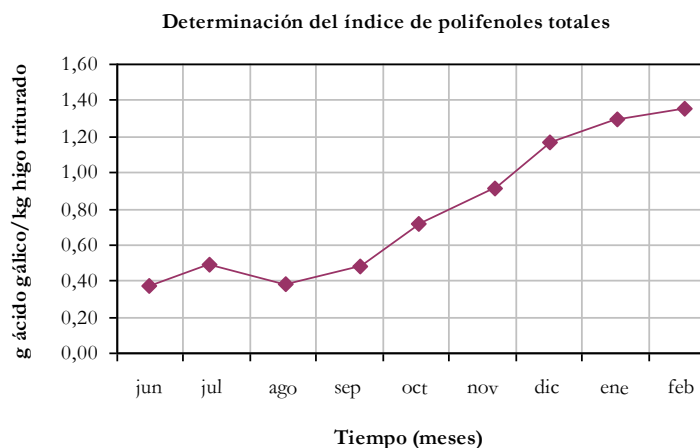


Figura 56. Evolución del índice de polifenoles totales

4.2.4.1 Índice de formol

El índice de formol es otro parámetro para la caracterización del zumo de *O. stricta*. Se trata de un índice característico de la cantidad de aminoácidos. A continuación, en la figura 57, vemos como se produce una evolución ascendente del mismo conforme avanza la maduración, llegando a su máximo en los meses de diciembre y febrero respectivamente.

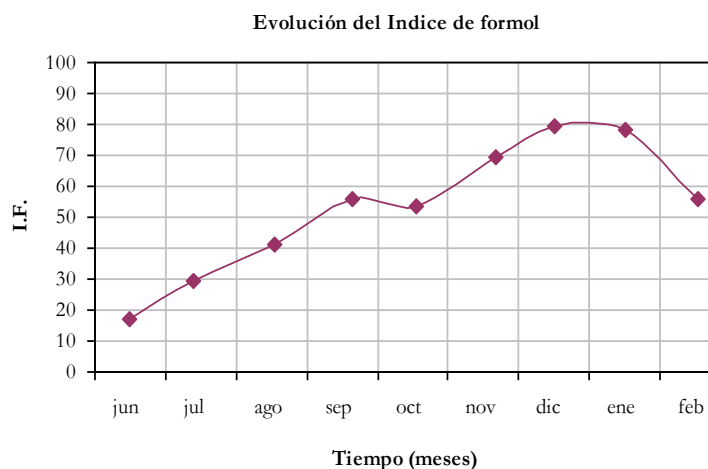


Figura 57. Evolución del índice de formol

4.3 Estudio espectrofotométrico

Mediante el análisis espectrofotométrico se puede detectar la presencia de compuestos fenólicos por su absorbancia en U.V., y la de pigmentos que absorben entorno a 535 nm. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los pigmentos por contener anillos aromáticos en su estructura también absorben en U.V. de manera que los compuestos fenólicos no se pueden cuantificar con un simple espectro. Por otra parte, las betalaínas sí se pueden cuantificar por su absorbancia a 535 nm aplicando su coeficiente de absortividad molar como se indica en Materiales y Métodos.

Cada una de las muestras diluidas fue analizada espectrofotométricamente en un rango visible de 200 a 800 nm.

El máximo de absorbancia a 250 nm corresponde con los compuestos fenólicos y a la absorbancia debida a las betacianinas, mientras que el máximo de absorbancia a 535 nm corresponde solamente con los pigmentos rojos de betacianina.

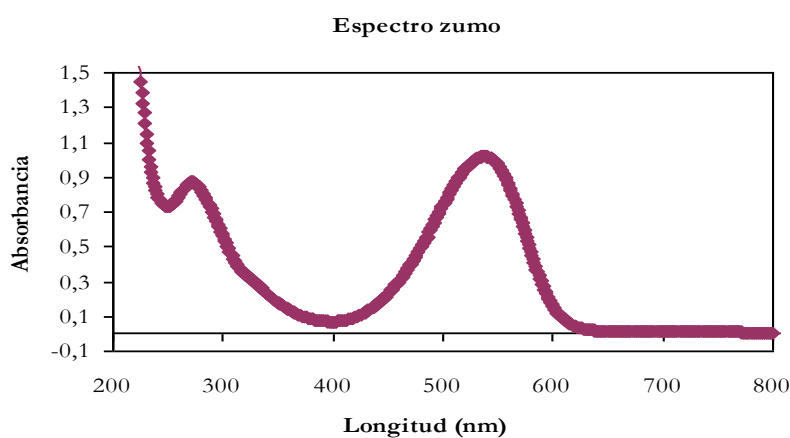


Figura 58. Espectro del zumo de *O.stricta* maduro

El pigmento rojo contenido en los zumos expresado como betanina o betacianina se determinó usando el coeficiente de extinción de la betanina a 535 nm ($E_{535}^{1\%} = 1120\%^{-1}\text{cm}^{-1}$). Estos análisis indicaron el alto contenido en betacianina existente en los zumos de *O. stricta*.

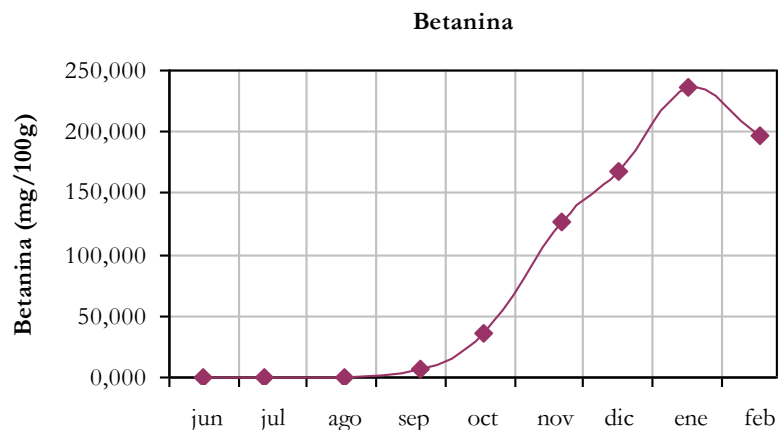


Figura 59. Evolución de la betanina a lo largo de la maduración

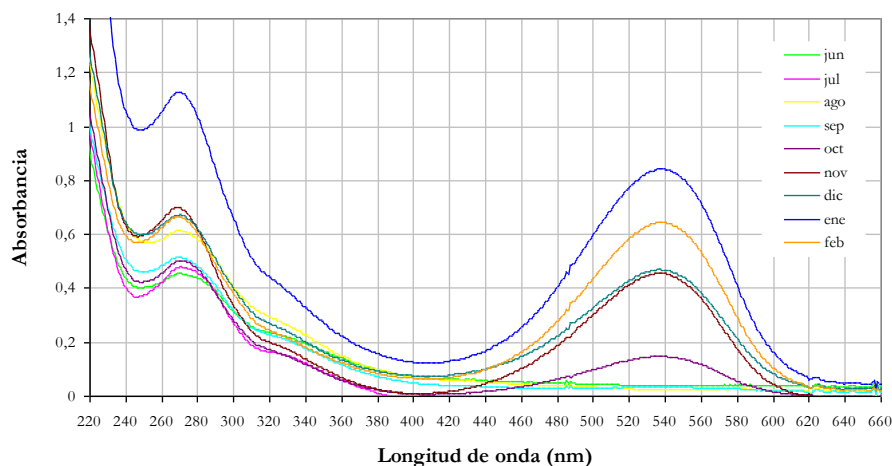


Figura 60. Espectros de absorbancia de cada una de las muestras de zumo

4.4 Análisis de pigmentos y otros metabolitos por HPLC

Para conocer la composición química de cada una de las muestras y detectar compuestos e intermedios metabólicos, se realizó el análisis de los zumos por HPLC. Además, debido a que las propiedades espectroscópicas y cromatográficas que posee la betanina son semejantes a las de otros compuestos que posee el zumo de *O. stricta*, el HPLC resulta ser una de las mejores herramientas para su separación.

Se analizaron mediante este método los extractos sin diluir de cada una de las muestras a lo largo de todo el ciclo de maduración. Los picos se identificaron según su tiempo de retención y su espectro de absorbancia, excepto vitamina C y L-tirosina que se identificaron según el

tiempo de retención de sus correspondientes patrones, por el método de estándar externo.

Los metabolitos que se analizaron, con sus correspondientes tiempos de retención y longitud de onda máxima se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Metabiltos analizados por HPLC

Compuesto	Tiempos de retención (min)	Longitud de onda
L-Tirosina	6,80	274,50
L-Dopa	5,53	280,50
Ácido ascórbico	4,04	243,80
Betanina	15,94	535
Isobetanina	17,96	535
Neobetanina	19,32	542

A continuación se presentan los datos de los análisis por HPLC de las muestras.

- **Muestra de junio (1 mes)**

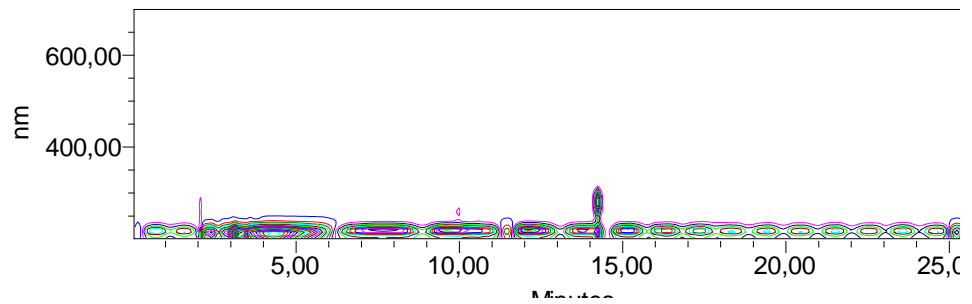


Figura 61. Cromatograma de 220 a 700 nm

280 nm

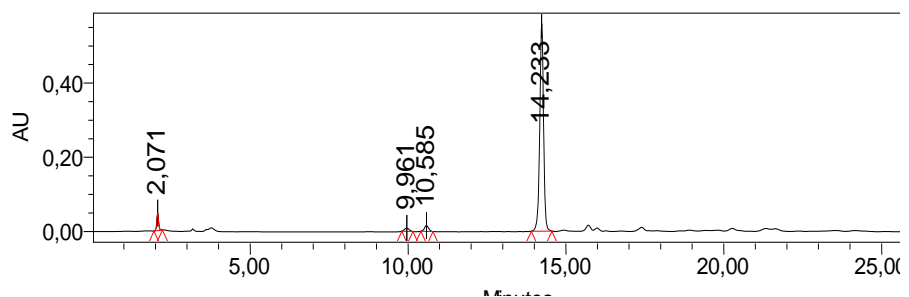


Figura 62. Cromatograma a 280 nm

Tabla 8. Datos cromatográficos de la muestra de junio a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
	9,961	87572
	10,585	146013
N.I.	14,233	4668470

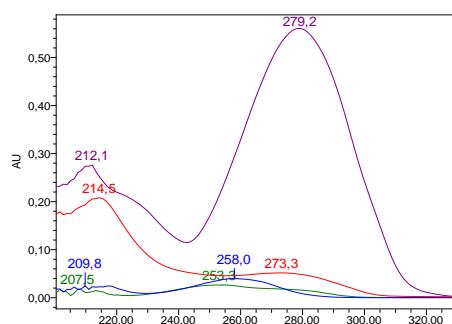


Figura 63. Espectro de absorbança

A 279,2 nm aparece un pico a considerar con un tiempo de retención de 14,233 min. Este compuesto no se ha podido identificar y aparece en sucesivas muestras.

Aparecen dos picos más con menor concentración a 258 y 253,3 nm con tiempos de retención de 10,585 y 9,961 minutos aunque desconocemos igualmente de qué compuestos se trata.

- **Muestra de julio (2 meses)**

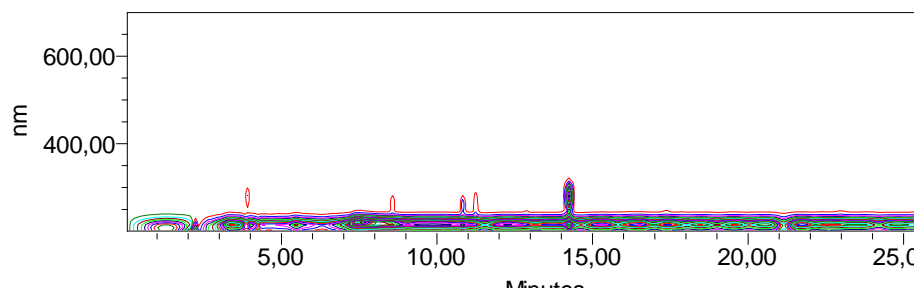


Figura 64. Cromatograma de 220 a 700 nm

280 nm

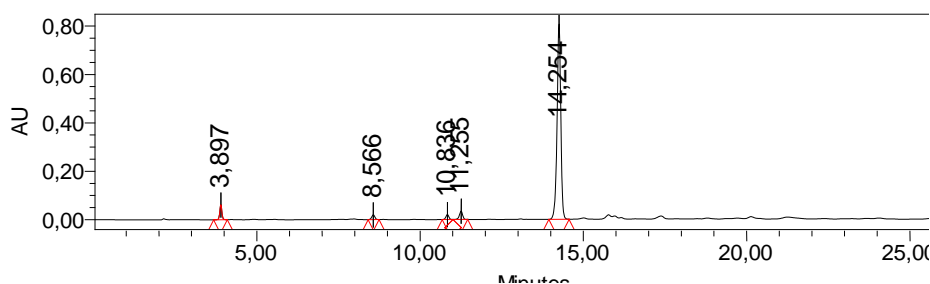


Figura 65. Cromatograma a 280 nm

Tabla 9. Datos cromatográficos de la muestra de julio a 280 nm.

Compuesto	Tiempo de retención	Area
	3,897	289589
	8,566	132939
	10,836	132906
	11,255	241425
N.I.	14,254	6420561

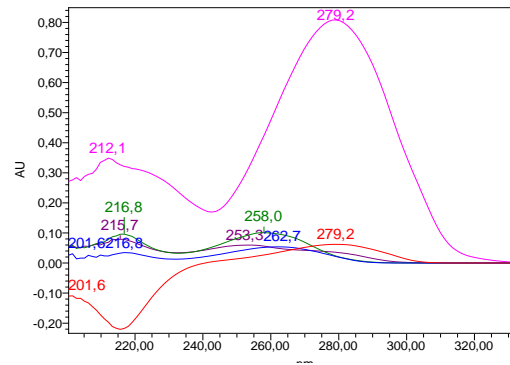


Figura 66. Espectro de absorbancia

A 279,2 nm se vuelve a observar un pico con un tiempo de retención de 14,254 minutos, al igual que en la muestra anterior.

Otros tres picos aparecen a 253,3 nm ($t_r = 11,255$ min.), 258nm ($t_r = 10,836$ min.) y 262,7nm ($t_r = 8,566$ min.).

La ausencia de un pico a 535 nm indica que en estos frutos de los primeros meses las betacianinas se encuentran aun en un nivel muy bajo.

- Muestra de agosto (3 meses)

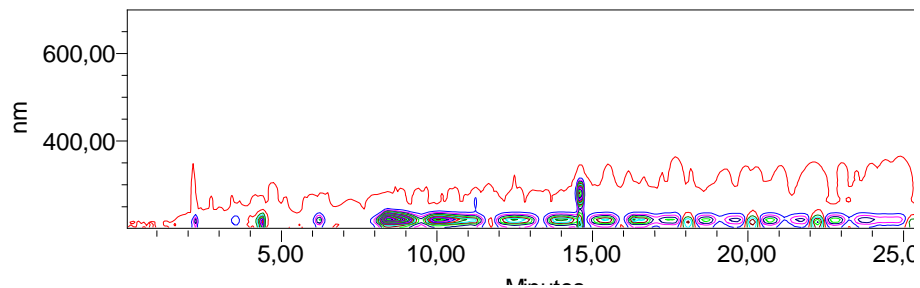


Figura 67. Cromatograma de 220 a 700 nm

280 nm

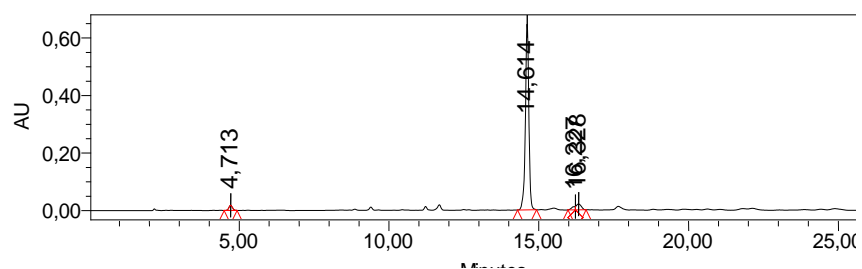


Figura 68. Cromatograma a 280 nm

Tabla 10. Datos cromatográficos de la muestra de agosto a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
	4,713	152901
N.I.	14,614	5149850

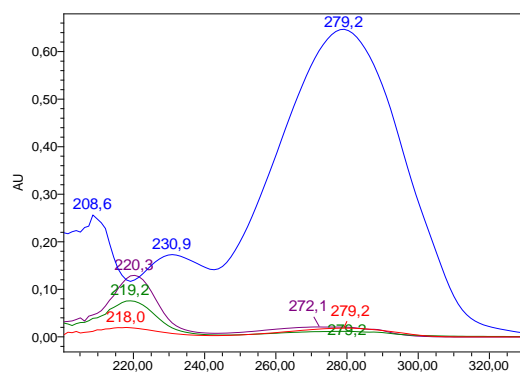


Figura 69. Espectro de absorbancia

Se encuentra de nuevo el pico a 279,2 nm con un tiempo de retención de 14,614 min. Su concentración se mantiene más o menos constante en las diferentes muestras analizadas aunque, como hemos dicho anteriormente no podemos identificarlo.

Se observan otros picos con tiempos de retención que no coincidieron con ninguno de los tiempos de retención de los estándares.

- Muestra de septiembre (4 meses)

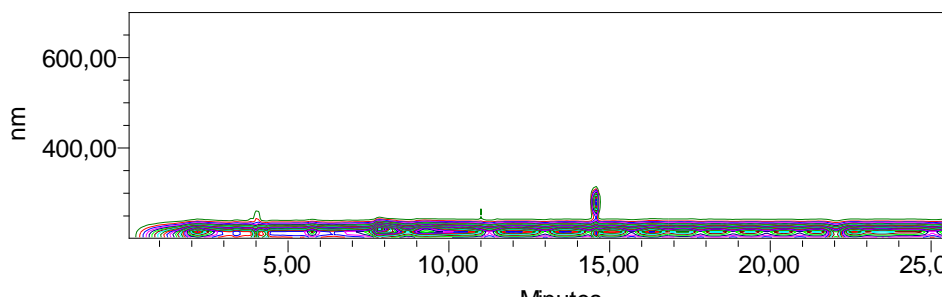


Figura 70. Cromatograma de 220 a 700 nm

535 nm

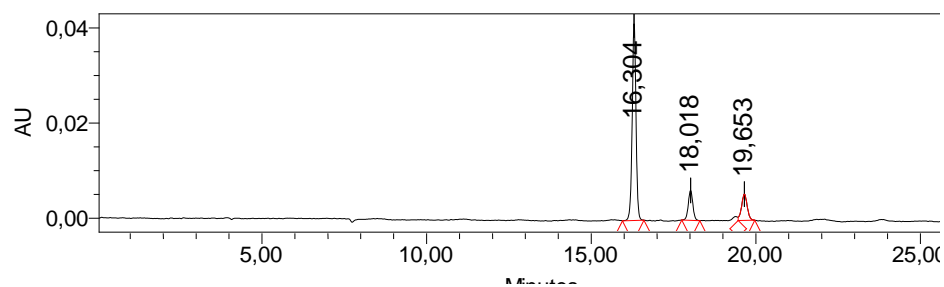


Figura 71. Cromatograma a 535 nm

Tabla 11. Datos cromatográficos de la muestra de agosto a 535 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Betanina	16,304	332382
Isobetanina	18,018	61455
Betanidina	19,653	66174

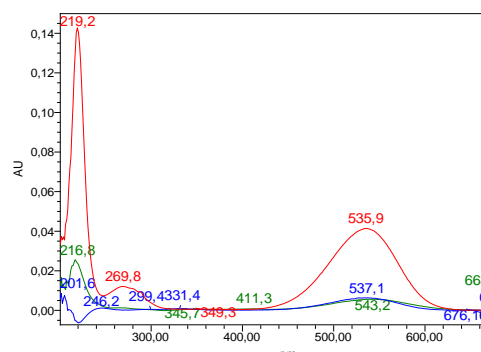


Figura 72. Espectro de absorción

En el extracto correspondiente a la muestra del mes de septiembre comienza a aparecer la presencia de betanina con un tiempo de retención de 16,304 a 535,9 nm. Estos datos indican que es el momento en el que el fruto comienza a madurar y adquirir la tonalidad roja.

El $t_r = 18,018$ de este pico corresponde a la isobetanina. Su área es de 61455.

Por otra parte, identificamos como betanidina el compuesto cuyo tiempo de retención es de 19,653.

280 nm

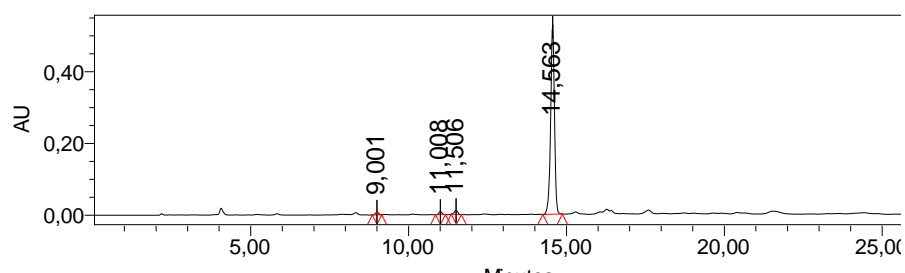


Figura 73. Cromatograma a 280 nm

Tabla 12. Datos cromatográficos de la muestra de septiembre a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
	9,001	51795
	11,008	56628
	11,506	85182
N.I.	14,563	4427819

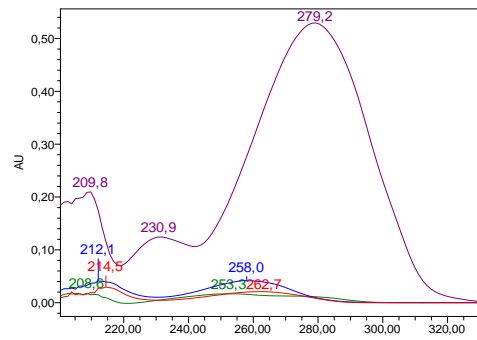


Figura 74. Espectro de absorbancia

A una absorbancia de 279,2 nm sigue apareciendo un pico con un tiempo de retención de 14,563 que no resulta identificable. También se aprecian otros picos con tiempos de retención de 9,001, 11,008 y 11,506 minutos.

243 nm

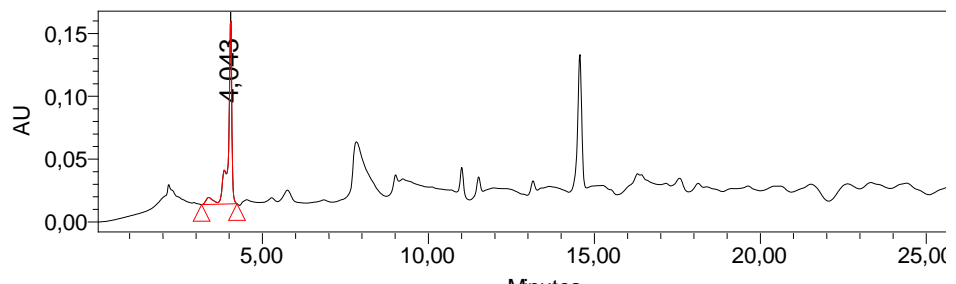


Figura 75. Cromatograma a 243 nm

Tabla 13. Datos cromatográficos de la muestra de septiembre a 243 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Vitamina C	4,043	1128311

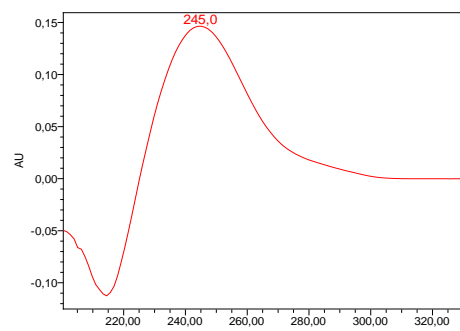


Figura 76. Espectro de absorbancia

A 245 nm se observa la aparición de un nuevo compuesto a una absorbancia de 245 nm y un tiempo de retención de 4,043 min. Se trata de ácido ascórbico cuya presencia ayuda a proteger el color rojo del fruto.

- **Muestra de octubre (5 meses)**

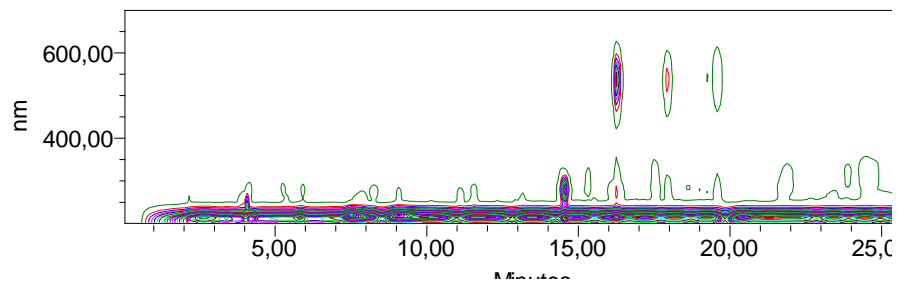


Figura 77. Cromatograma de 220 a 700 nm

535 nm

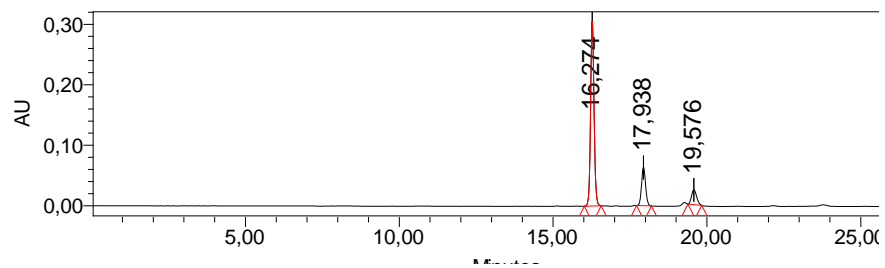


Figura 78. Cromatograma a 535 nm

Tabla 14. Datos cromatográficos de la muestra de octubre a 535 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Betanina	16,274	2380053
Isobetanina	17,938	588173
Betanidina	19,576	283084

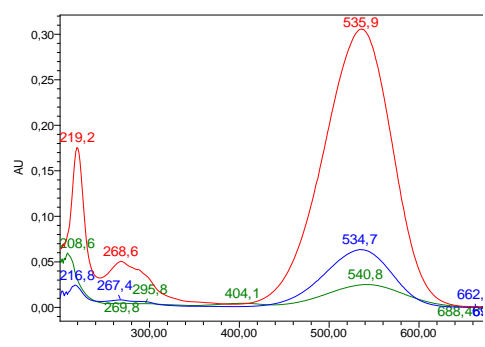


Figura 79. Espectro de absorbancia

Tal y como vemos en el cromatograma, aparece un pico a los 16,274 min con un valor de absorbancia máxima según el espectro de 535,9 nm que corresponde a la betanina.

Otro pico importante es el que tiene un tiempo de retención de 17,938 a una absorbancia de 534,7 nm tratándose de isobetanina.

En cuanto al pico a 19,576 minutos aunque por su tiempo de retención podría ser neobetanina, se corresponde con la betanidina. Este pico muestra un espectro con dos máximos, a 404,1 nm y a 540,8 nm.

280 nm

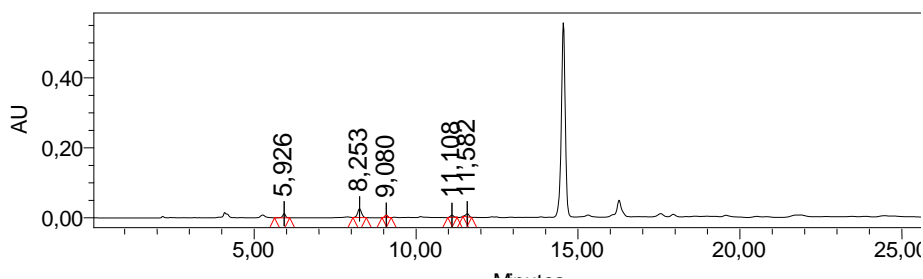


Figura 80. Cromatograma a 280 nm

Tabla 15. Datos cromatográficos de la muestra de octubre a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
	5,926	76266
Tirosina	8,253	214138
	9,080	44655
	11,108	42089
	11,582	64546

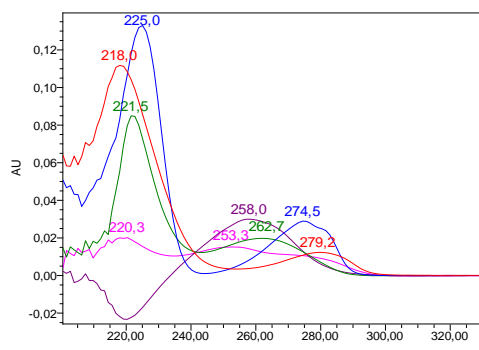


Figura 81. Espectro de absorbancia

En el rango de absorbancias de 280 nm vuelven a aparecer tres compuestos con tiempos de retención de 11,582, 11,108 y 9,080 min.

Por primera vez en el extracto de octubre aparece un pico a 8,253 minutos a una absorbancia de 274,5 que se puede identificar como tirosina.

243 nm

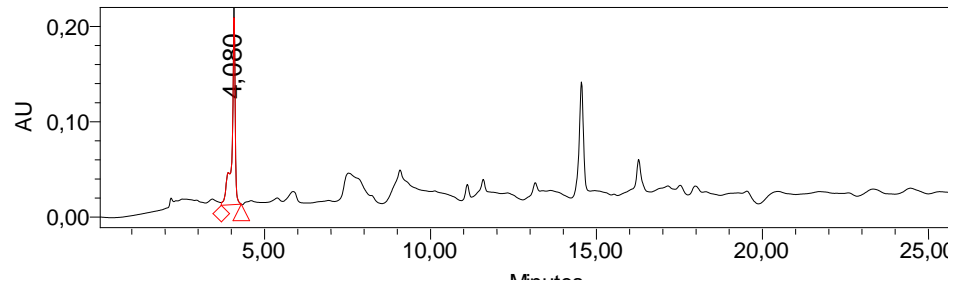


Figura 82. Cromatograma a 243 nm

Tabla 16. Datos cromatográficos de la muestra de octubre a 243 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Vitamina C	4,080	1329566

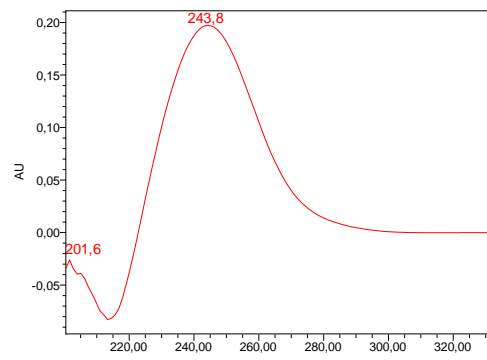


Figura 83. Espectro de absorbancia

En el espectro de absorbancia de 243 nm se puede apreciar en el cromatograma un pico a 4,080 min. tal y como hemos identificado, se trata de vitamina C o ácido ascórbico.

- **Muestra de noviembre (6 meses)**

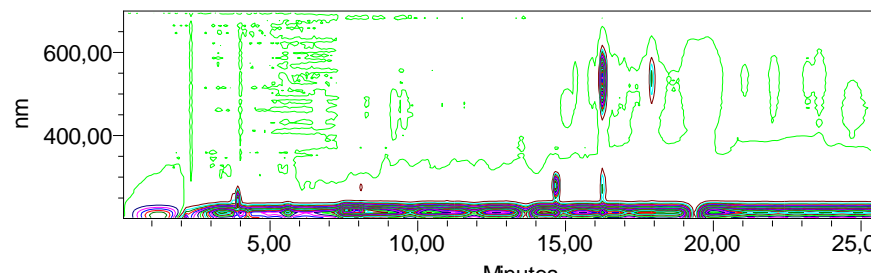


Figura 84. Cromatograma de 220 a 700 nm

535 nm

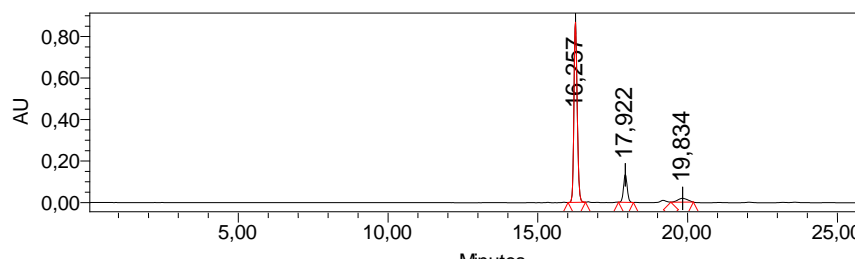


Figura 85. Cromatograma a 535 nm

Tabla 17. Datos cromatográficos de la muestra de noviembre a 535 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Betanina	16,257	6622150
Isobetanina	17,922	1150485
Betanidina	19,834	420241

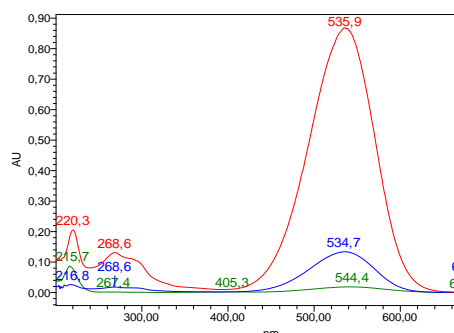


Figura 86. Espectro de absorbancia

Se observa que hay presencia de betanina a una longitud de onda de 535,9 nm y un tiempo de retención de 16,257. El área de la betanina es mayor que en la muestra del mes anterior.

Por otro lado con un tiempo de retención de 17,922 aparece un pico a 534,7 nm que se identifica con isobetanina y posee un área de 1150485.

La betanidina aparece a los 19,834 minutos.

280 nm

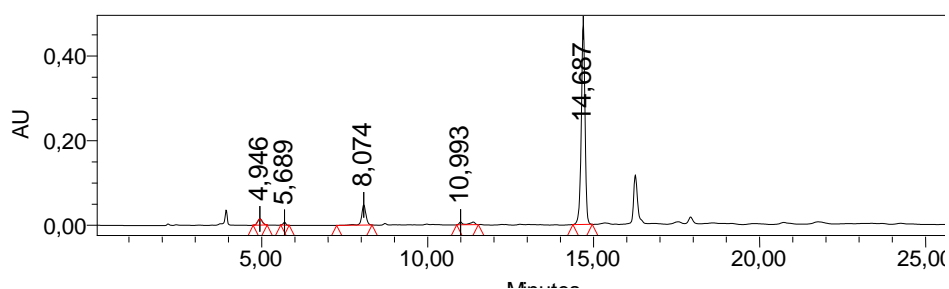


Figura 87. Cromatograma a 280 nm

Tabla 18. Datos cromatográficos de la muestra de noviembre a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
	4,946	145747
	5,689	38128
Tirosina	8,074	429465
	10,993	110298
N.I.	14,687	3687861

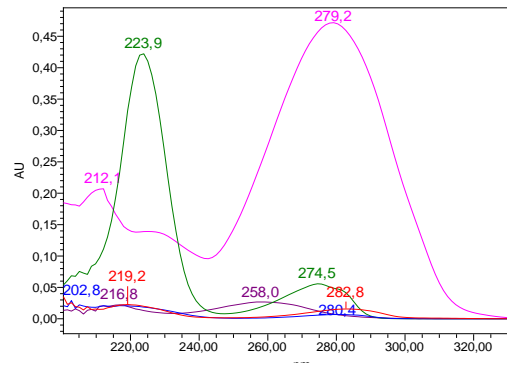


Figura 88. Espectro de absorbancia

A una absorbancia de 279,2 nm se encuentra de nuevo el pico no identificable con un tiempo de retención de 14,687 min. Otro pico a los 8,074 min. y una absorbancia de 223,9 indica la existencia de tirosina.

243 nm

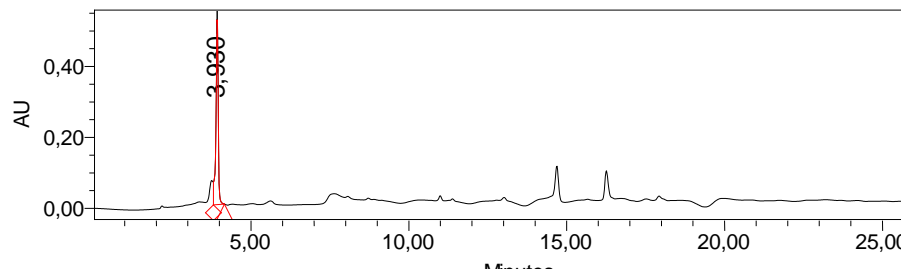


Figura 89. Cromatograma a 243 nm

Tabla 19. Datos cromatográficos de la muestra de noviembre a 243 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Vitamina C	3,930	2649078

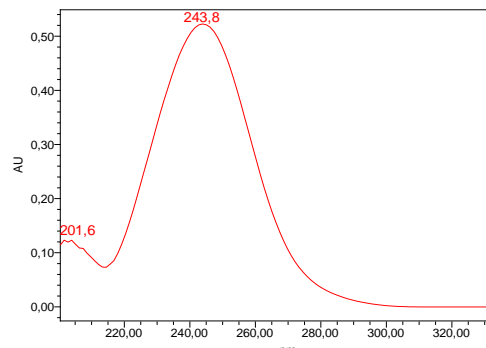


Figura 90. Espectro de absorbancia

Sólo se encontró un compuesto a un tiempo de retención de 3,930 nm. Si analizamos el espectro de este pico vemos que corresponde con el ácido ascórbico.

- **Muestra de diciembre (7 meses)**

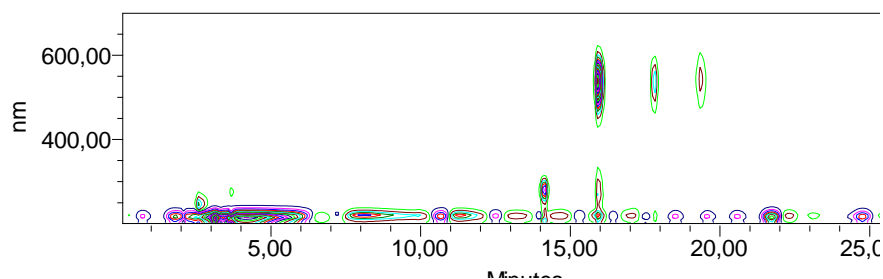


Figura 91. Cromatograma de 220 a 700 nm

535 nm

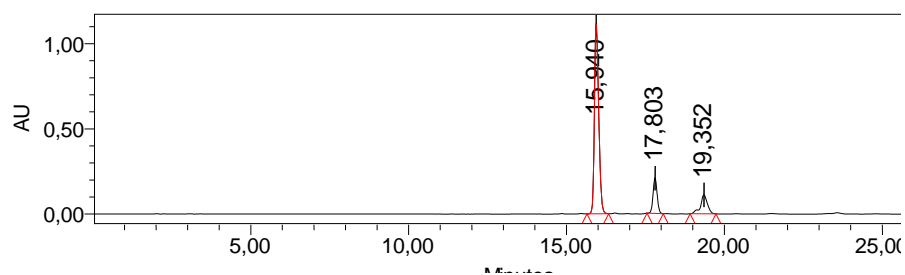


Figura 92. Cromatograma a 535 nm

Tabla 20. Datos cromatográficos de la muestra de diciembre a 535 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Betanina	15,940	10467805
Isobetanina	17,803	1862635
Betanidina	19,352	1698245

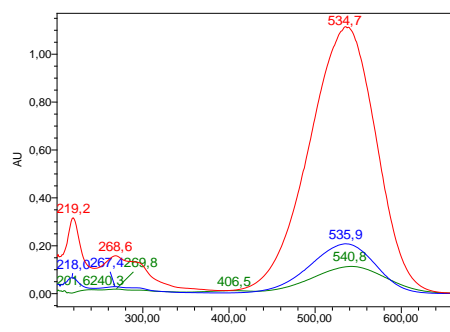


Figura 93. Espectro de absorbancia

A 534,7 nm se encuentra un primer pico a los 15.940 min. Se trataría por lo tanto de betanina. Otro pico se detecta en este espectro a

los 17, 803 min, en cuyo caso estaríamos hablando de la presencia de iso betanina. Con un tiempo de retención de 19,352 aparece la betanidina.

280 nm

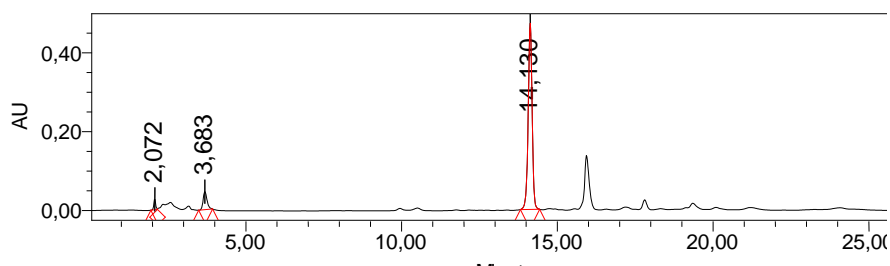


Figura 94. Cromatograma a 280 nm

Tabla 21. Datos cromatográficos de la muestra de diciembre a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Tirosina	3,683	403612
N.I.	14,130	4143002

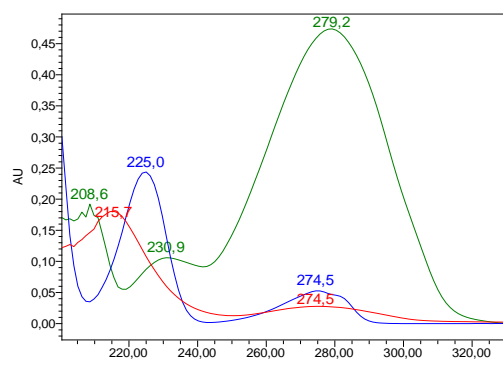


Figura 95. Espectro de absorbancia

Con una absorbancia máxima de 279,2 nm se vuelve a detectar un pico con un tiempo de retención de 14,130 min que no podemos relacionar con ningún compuesto. Encontramos tirosina a un tiempo de retención de 3,683 y con un área de 403612.

243 nm

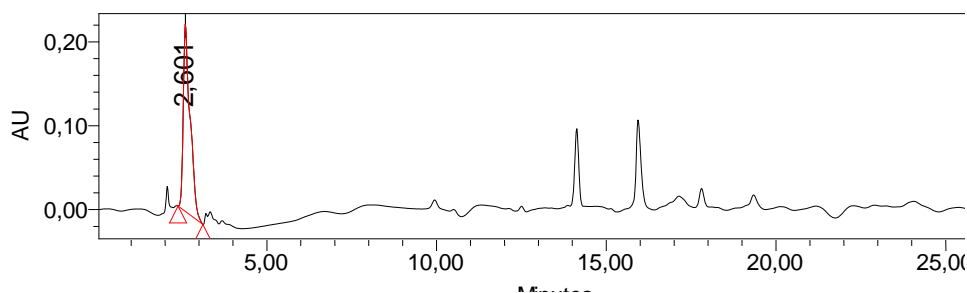


Figura 96. Cromatograma a 243 nm

Tabla 22. Datos cromatográficos de la muestra de diciembre a 243 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Vitamina C	2,601	3109262

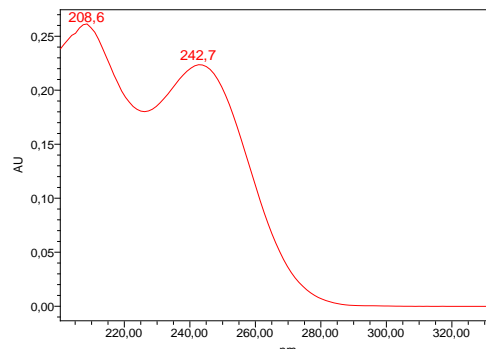


Figura 97. Espectro de absorbancia

De nuevo en esta muestra hay presencia de ácido ascórbico a 242,7 nm y un tiempo de retención de 2,601 minutos.

- **Muestra de enero (8 meses)**

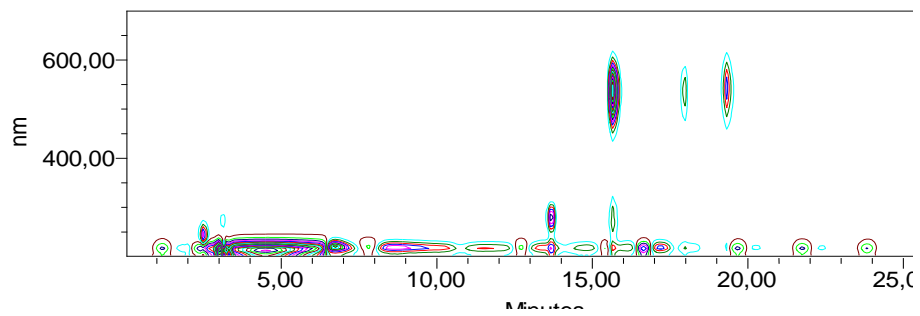


Figura 98. Cromatograma de 220 a 700 nm

535 nm

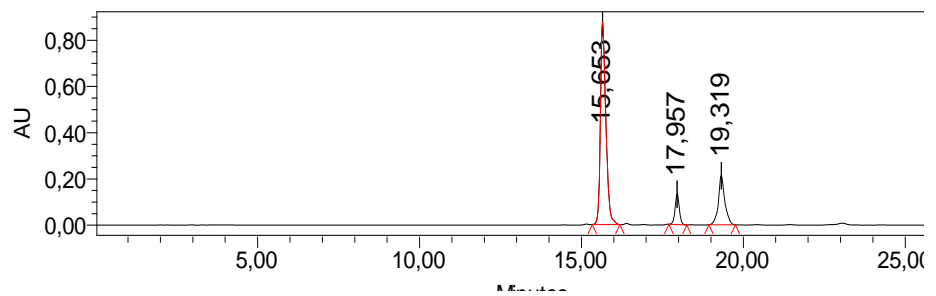


Figura 99. Cromatograma a 535 nm

Tabla 23. Datos cromatográficos de la muestra de enero a 535 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Betanina	15,653	10261764
Isobetanina	17,957	1204954
Betanidina	19,319	2945556

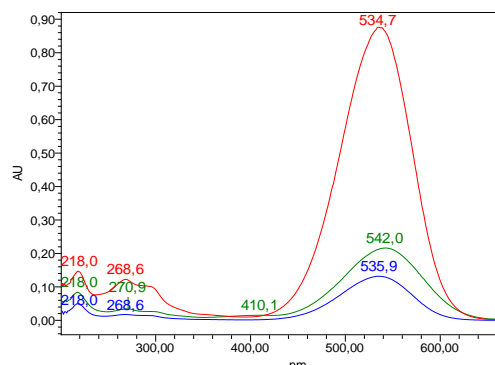


Figura 100. Espectro de absorbancia

Durante el mes de enero se puede apreciar la clara aparición de tres compuestos: betanina, isobetanina y betanidina. Aparecen en el espectro de absorbancia de de 535 nm. Sus tiempos de retención son: 15,653 (534,7 nm), 17,957 (535,9 nm) y 19,319 min (542 nm). La betanina supone un área del 71,20%. De estos datos se puede deducir que nos encontramos en el momento óptimo de producción de pigmentos rojos.

280 nm

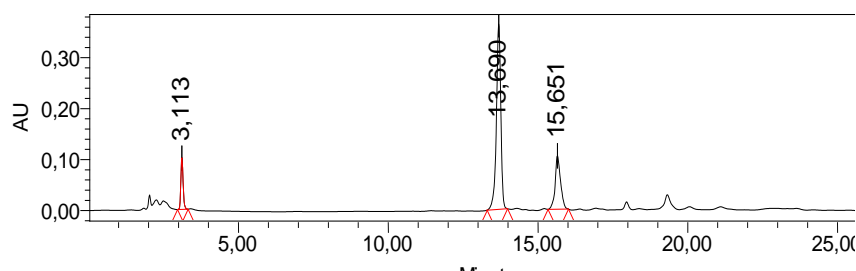


Figura 101. Cromatograma a 280 nm

Tabla 24. Datos cromatográficos de la muestra de enero a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Tirosina	3,113	534576
N.I.	13,690	3716076
	15,651	1320540

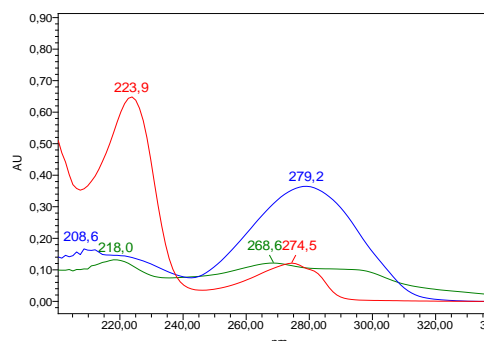


Figura 102. Espectro de absorbancia

Cuando el mismo extracto se monitoriza a 280 nm, sigue apareciendo el pico a 279,2 nm y un tiempo de retención de 13,690.

A 223,9 nm se puede apreciar otro pico con un tiempo de retención de 3,113 min y un área de 534576 que corresponde a la tirosina.

243 nm

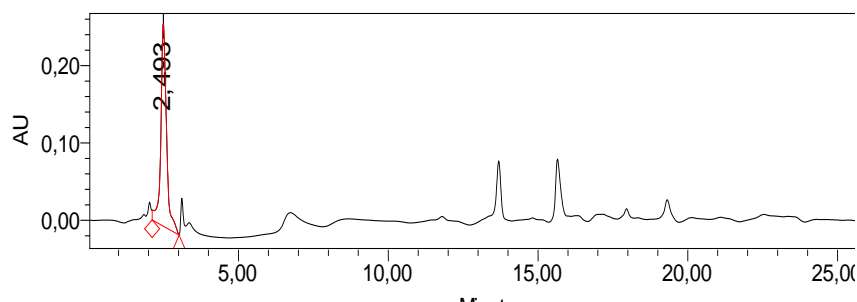


Figura 103. Cromatograma a 243 nm

Tabla 25. Datos cromatográficos de la muestra de enero a 243 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Vitamina C	2,493	3470773

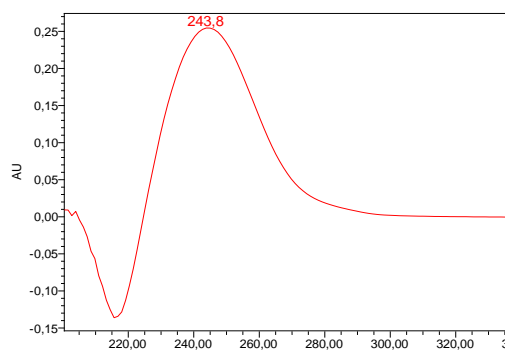


Figura 104. Espectro de absorbancia

En este cromatograma (página anterior), se muestra un pico con un tiempo de retención de 2,493 min y a una absorbancia de 243,8 nm, lo que nos indica nuevamente la presencia de ácido ascórbico.

- **Muestra de febrero (9 meses)**

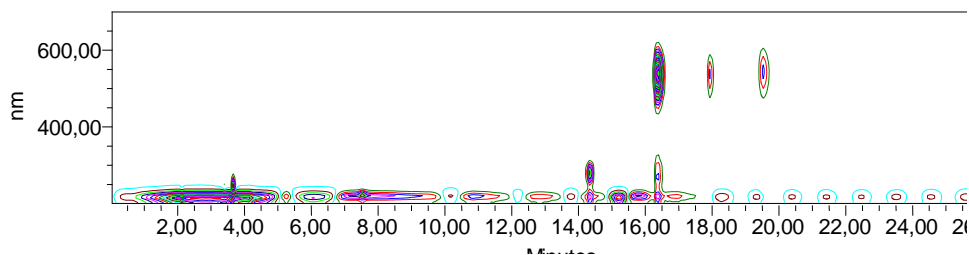


Figura 105. Cromatograma de 220 a 700 nm

535 nm

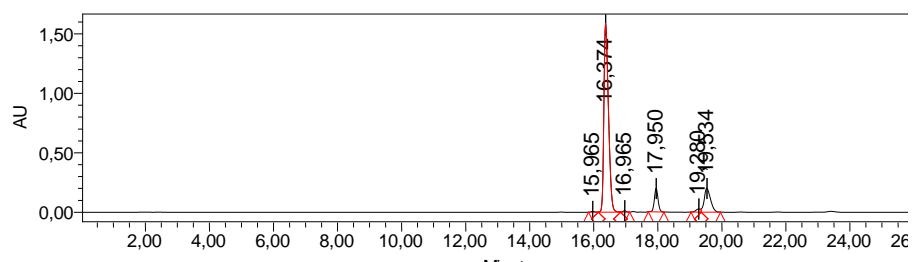


Figura 106. Cromatograma a 535 nm

Tabla 26. Datos cromatográficos de la muestra de febrero a 535 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
betanina	16,374	15575429
	16,965	81222
isobetanina	17,950	1573681
	19,280	272664
betanidina	19,534	2745630

Se encuentra un pico principal a un tiempo de retención de 16,374 minutos identificable como betanina. Su concentración es muy elevada encontrándose de forma mayoritaria al resto de compuestos. También se haya la presencia de isobetanina a un tiempo de retención de 17, 950 nm y betanidina con una absorbancia de 542 nm y un tiempo de retención de 19,534 minutos.

280 nm

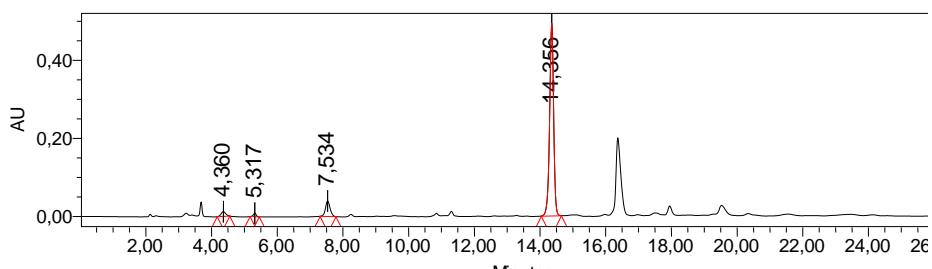


Figura 107. Cromatograma a 280 nm

Tabla 27. Datos cromatográficos de la muestra de febrero a 280 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
	4,360	123990
	5,317	52401
Tirosina	7,534	393115
N.I.	14,356	4141553

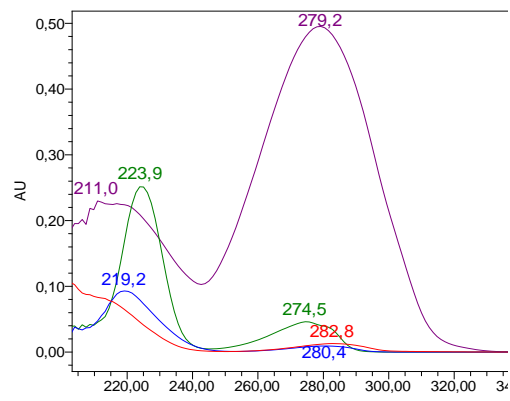


Figura 108. Espectro de absorbancia

En el espectro de 280 nm se encontró un pico a una absorbancia máxima de 279,2 nm y tr 14,353 min que continuamos sin identificar. Por otra parte, a 223,9 nm y con un tiempo de retención de 7,537 reconocemos el compuesto tirosina con un área de 393115.

243 nm

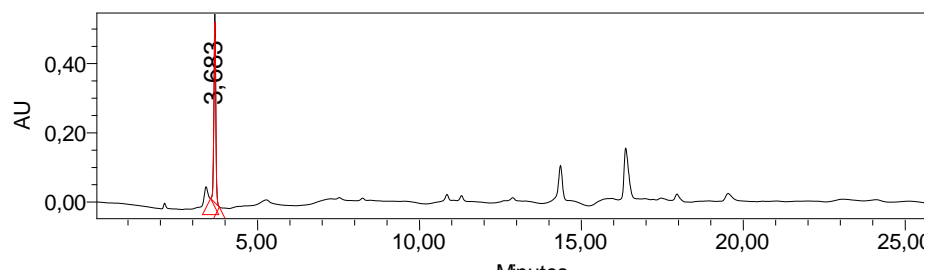


Figura 109. Cromatograma a 243 nm

Tabla 28. Datos cromatográficos de la muestra de febrero a 243 nm

Compuesto	Tiempo de retención	Area
Vitamina C	3,683	2140135

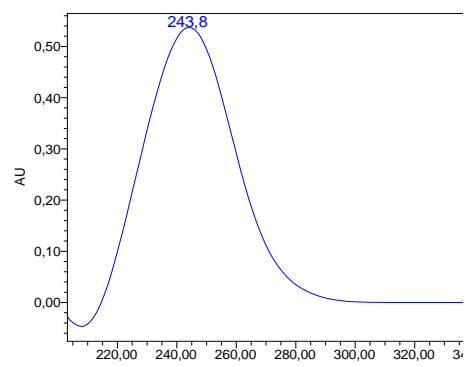


Figura 110. Espectro de absorbancia

Se detectó por último en el extracto de la muestra de febrero sólo un pico a destacar a 243,8 nm y un tiempo de retención de 3,683 minutos

que como hemos venido apuntando anteriormente se trata de ácido ascórbico.

A continuación, en la figura 110, destaca la presencia continua del compuesto sin identificar y la aparición de tirosina como intermedio o punto de partida de la síntesis de pigmentos junto a la vitamina C. A partir del mes de septiembre comienza la producción de los pigmentos: betanina, isobetanina y betanidina.

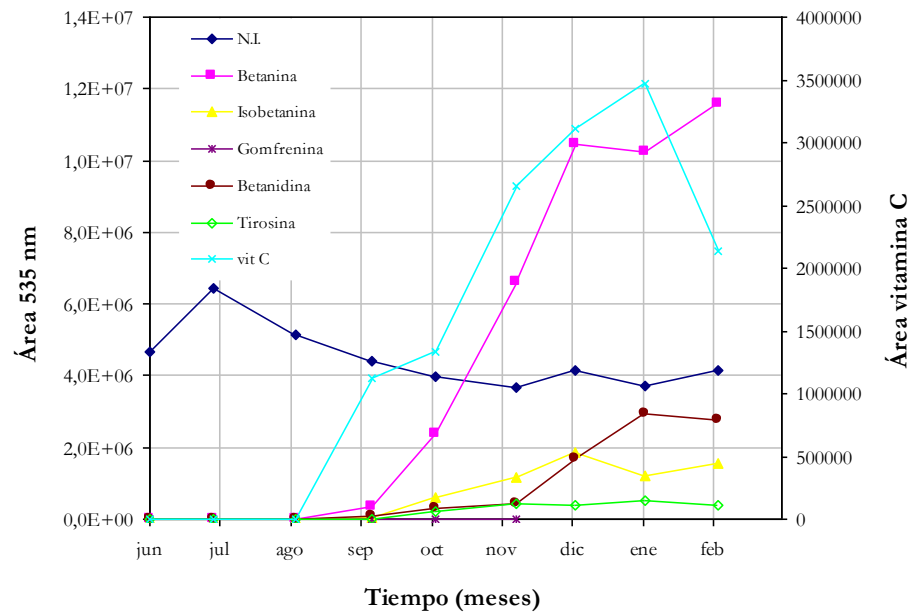


Figura 111. Evolución del área de cada compuesto con el tiempo



V

**Evolución de compuestos funcionales durante
la maduración de frutos de *Opuntia stricta***

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- El fruto de *Opuntia stricta* se engruesa durante la maduración, aumentando su peso, pero mantiene constante la longitud. En estado maduro las dimensiones medias de este fruto son: 4,7 x 2,9 cm aproximadamente y pesa en torno a los 20g.
- Los pigmentos empiezan a producirse cuatro meses después de la floración, en la zona ovárica del fruto, alrededor de las semillas.
- Desde la zona ovárica, los colorantes van pigmentando sucesivamente el epicarpio, mesocarpio y endocarpio, según prosigue el proceso de maduración.
- Tres meses después de la floración comienza la producción de vitamina C, que va a ir en aumento conforme se produzcan y aumenten los pigmentos. Se inicia así un cambio en el metabolismo del fruto que finaliza con la maduración del mismo.
- Cuatro meses después de la floración comienza simultáneamente la producción de azúcares, compuestos fenólicos y pigmentos.
- La tirosina compuesto del que parte de la síntesis de betalaínas, se detecta también a partir del cuarto mes y en los meses sucesivos junto con los pigmentos.
- Los pigmentos que se producen son betanina, isobetanina y gonfrenina. De ellos la betanina es el mayoritario seguido de isobetanina, detectándose betanidina en cantidades bajas.
- La máxima concentración de pigmentos se observa a los 8 meses, resultando por tanto este tiempo, que coincide con el mes de enero, el más indicado para la recolección de los frutos con la mayor concentración de pigmentos.

VI

Evolución de compuestos funcionales durante
la maduración de frutos de *Opuntia stricta*

BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- **ATTOE, E.L. y VON ELBE, J.H.** 1985. Oxygen involvement in betanine degradation: effects of antioxidants. *J. Food. Sci.*, 50:106.
- **BUTERA D., TESORIERE L., DI GAUDIO F., BONGIORNO A., ALLEGRA M., PINTAUDI A.M., KOHEN R. Y LIVREA M.A.** 2002. "Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruits extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin", *J. Agric. Food Chem.*, 50:6895.
- **CASTELLAR, M.R., OBÓN, J.M. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.** 2006. The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *J. Sci. Food Agric.*, 86, 122-128.
- **CASTELLAR, M.R., OBÓN, J.M., ALACID, M. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.** 2003. Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2772-2776.
- **CUBERO N., MONFERRER, A. y VILLALTA, J.** 2002. Aditivos Alimentarios. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 21-23, 48-49.
- **DONATE, J.M.** 2005. Aplicación del colorante rojo E-162 obtenido de frutos de *Opuntia stricta*, en alimentos procesados y sistemas modelo. Proyecto Final de Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena.
- **FAURE, D.** 1979. Panorama économique du marché de la betterave potàgere. CTIFL Documents, n°63. París.
- **FERNÁNDEZ LÓPEZ, J.A., CASTELLAR, M.R., OBÓN, J.M. y ALMELA L.** 2002. Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia*, 56, 591-595.
- **FLORES-HERNÁNDEZ, A., ORONA-CASTILLO, I., MURILLO-AMADOR, B., GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. y TROYO-DIEGUEZ, E.** 2004. Yield and physiological traits of prickly pear cactus 'nopal' (*Opuntia* spp.) cultivars under drip irrigation. *Agricultural Water Management* 70, 97-107.
- **FRANCIS, F.J.** 1999. Colorants. Practical Guides for the food industry. American Association of colour chemists. Eagan Press. St. Paul, Minnesota.
- **FRANCIS, F.J. y LAURO, G.S.** 2000. Natural food colorants. Science and technology. Marcel Dekker, Inc. New York.
- **FRANCO ZAVALETA, M.** 2004 Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de jiotilla (*Escontria chiotilla*) una cactácea subexplotada. Tesis de maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.

- **GARCÍA-GUTIÉRREZ, V.R, CASTELLAR, M.R., OBÓN, J.M., ALACID, M. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.** 2006. Maduración de frutos de *Opuntia stricta*. Innovaciones Fisiológicas y Tecnológicas de la Maduración y Post-recolección de Frutas y Hortalizas. Editores D. Valero y M. Serrano, pp. 41-44.
- **GARCÍA-GUTIÉRREZ, V.R, CASTELLAR, M.R., OBÓN, J.M., ALACID, M. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.** 2006. Maduración de frutos de *Opuntia stricta*. VIII Simposio Nacional y V Ibérico de Maduración y Post-Recolección, Orihuela, Alicante.
- **GIMENO, I. y VILÀ, M.** 2002. Recruitment of two *Opuntia* species invading abandoned olive groves. *Acta Oecologica* 23, 239-246.
- **GUILLOT, D. y VAN DER MEER, P.** 2001. Siete taxones nuevos del género *Opuntia* Mill. en la provincia de Valencia: aspectos históricos, ecológicos y reproductivos. *Flora Montiberica* 19, 37-44.
- **HAN, D., KIM, S.J., KIM S.H. y KIM D.M.** 1998. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. *J. Food Sci.*, vol. 63, nº1. 69-72 pp.
- **HUANG, A.S. y VON ELBE, J.H.** 1986, Stability comparison of two betacyanine pigments: amaranthine and betanine. *J. Food Sci.*, 51-670.
- **HUANG, A.S. y VON ELBE, J.H.** 1985. Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. *J. Food Sci.*, 51-670.
- **HEUER, S., RITCHER, S., METZINGER, J.W., WRAY, V., NIMTZ, M y STRACK, D** 1994. Betacyanins from bracts of *Bouganvillea glabra*. *Phytochem.*, 37: 761.
- **LEE, Y.N., WILEY, R.C., SHEU, M.J. y SCHLIMME, D.V.** 1982. Purification and concentration of betalaines by ultrafiltration and reverse osmosis. *J. Food Sci.*, 47:465.
- **MAROTO BORREGO J.V.** 2002. Horticultura herbácea especial. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 67-69.
- **MOLINA, R.** 2005. Aplicación del secado por atomización para obtener un colorante rojo alimentario en polvo a partir de frutos de *Opuntia stricta*. Proyecto Final Carrera. Universidad Politécnica de Cartagena.
- **MOULE.** 1972. Phytotechnie spéciale (III). Plantes sarclées et diverses. La Maison Rustique. París.
- **MULTON, J.** 2000. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Editorial Acribia. Zaragoza. 343-345 pp.
- **OBÓN, J.M., CASTELLAR, R., CASCALES, J.A., ALMELA, L. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.** 2003. Propiedades multifuncionales del higo

- chumbo. *II National Congress on Food Science and Technology*, Ed by CEE Limencop, S.L., Orihuela, Alicante, 229-232.
- **PEIRCE, L.C.** 1987. Vegetable characteristics, production and marketing. J. Willey and son. Nueva York-Chichester.
 - **RANDALL, R.P.** 2002. A global compendium of weeds. R.G. & F.J. Richardson. Melbourne.
 - **REYNOSO, R., GARCÍA, F.A., MORALES, D.A. y GONZÁLEZ, E.** 1997. Stability of betalain pigments from a cactaceae fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2884.
 - **RUBINSON, K. y RUBINSON, J.** 2004. Análisis instrumental. Ed. Prentice Hall. Madrid. 640-642.
 - **SAGUY, I., GOLDMAN, M., BORD, A., y COHEN, E.** 1984. Effect of oxygen retained on beet powder on the stability of betanine and vulgaxanthine I. *J. Food. Sci.*, 49:99.
 - **SHI, J. Y MAGUER, L.** 2000. "Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 40(1):1.
 - **SKERGET, M., KOTNIK, M., HRAS, A.R., SIMONIC, M. y KNEZ, Z.** 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89, 191-198.
 - **SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. y NIEMAN, T.A.** 2003. Principios de análisis instrumental. Ed. Mc Graw-Hill. Madrid. 786.
 - **STINZING, F.C., SCHIEBER, A., y CARLE, R.** 2001. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 396-407.
 - **STRACK, D., ENGEL, V. y WRAY V.** 1987. *Phytochemistry* 26. 2399.
 - **VON ELBE, J.H. y GOLDMAN I.L.** 2000. The betalains. *Natural food colorants*. Ed. G.J. Lauro y F.J. Francis. Basic Symposium Series. Marcel Dekker, Nueva York.
 - **VON ELBE, J.H. SCHWARTZ, S.J. Y HILDENBRAND, B.E.** 1981. "Loss and regeneration of betacyanine pigments during processing of red beets", *J. Food Sci.*, 46:1973.
 - **WATSON, J.F. y GABELMAN, W.H.** 1982. Season changes and cultivar differences in pigment concentrations and percent dissolved solids in roots of table beets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107(5), 713-716.
 - **WELLER, T.A. y LASURE, L.L.** 1982. Betalains in beet root tissue culture, *J. Food Sci.*, 47:162.
 - **WROSTLAND, R.E.** 2000. Colorants. *Food chemistry and applications*. Ed. G.L. Christen y J.S. Smith. Science Technology System. West Sacramento, California.