



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN FUNCIONAL DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES  
DE PITAYA DE MAYO (*Stenocereus pruinosus*) Y JIOTILLA (*Escontria chiotilla*)

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

DIANA CAROLINA FRANCO VÁSQUEZ  
MATRÍCULA: 2153804189

CODIRECTORES DE TESIS

DRA. LAURA JOSEFINA PÉREZ FLORES  
DR. SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO

ASESORA

DRA. ANGÉLICA ROMÁN GUERRERO

CIUDAD DE MÉXICO. JUNIO 2023

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”**

Ciudad De México al 5 de junio de 2023

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad

Iztapalapa aprobó la tesis:

“EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN FUNCIONAL DE COMPUESTOS  
ANTIOXIDANTES DE PITAYA DE MAYO (*Stenocereus pruinosus*) Y JIOTILLA  
(*Escontria chiotilla*)”

Que presentó:

**Diana Carolina Franco Vásquez**

**Comité Tutorial:**

**Co-directora:** Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Co-director:** Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma

**Asesora:** Dra. Angélica Román Guerrero

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

**Jurado:**

Presidente: Dra. Angélica Román Guerrero \_\_\_\_\_

Secretario: Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera \_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Juan Manuel Villa Hernández \_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante mis estudios del Doctorado en Biotecnología.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por permitirme realizar mis estudios de posgrado. Gracias a los integrantes de la comunidad universitaria que me han apoyado durante todo el proceso.

A mi codirectora la Dra. Laura Josefina Pérez Flores y mi codirector el Dr. Silvestre Alavez, muchas gracias por darme la oportunidad y confianza de trabajar con ustedes, gracias por su colaboración, su disposición, su paciencia y su asesoría durante el desarrollo del proyecto. Gracias por sus palabras de ánimo y por ser un apoyo personal.

A mi asesora la Dra. Angélica Román Guerrero por su colaboración durante el proyecto. Así como las observaciones y sugerencias realizadas al presente escrito.

A mi familia. En especial a mis padres, por su amor, fortaleza y confianza, los amo inmensamente. A mis hermanos, por su compañía, apoyo y amor.

A Adrián Marcelo Franco Vásquez, mi hermano, mi compañero y gran colaborador. Gracias por todo el esfuerzo, apertura, gestión, disposición y constancia para abrirnos espacio y montar técnicas en el laboratorio de Biomacromoléculas-2 del Instituto de Química de la UNAM, estas técnicas fueron de gran importancia para el desarrollo de este proyecto. Gracias por estar atento de mi, gracias por lo que contigo y de ti he aprendido.

Al Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros del Laboratorio de Biomacromoléculas-2 del Instituto de Química de la UNAM, muchas gracias por abrirnos las puertas de su laboratorio y poder realizar diferentes metodologías importantes para el desarrollo de este proyecto. Así mismo, gracias por las observaciones y sugerencias realizadas al presente escrito.

A la Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera y el Dr. Juan Manuel Villa Hernández por su colaboración con las observaciones y sugerencias realizadas al presente escrito.

A los integrantes de los laboratorios de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de Plantas; de Metabolitos Secundarios, de Farmacología de la Universidad Autónoma Metropolitana. Gracias por sus aportaciones en diferentes etapas de este proyecto, por su apoyo, por las risas.

## RESUMEN

La jiotilla (*Escontria chiotilla*) y la pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*), son frutos endémicos de México. Una alternativa para incrementar el aprovechamiento de estos frutos consiste en la extracción y caracterización de sus compuestos funcionales tales como betalainas y compuestos fenólicos. La extracción es el proceso principal en la obtención de los compuestos, sin embargo, debido a que existen diferentes factores que afectan este proceso es importante establecer el método de extracción y condiciones que permitan obtener el mayor contenido de compuestos. El interés sobre estos compuestos deriva de las actividades funcionales que han sido reportadas siendo la capacidad antioxidante una de las más estudiadas.

Para el desarrollo del presente trabajo se realizó inicialmente la caracterización fisicoquímica de frutos de pitaya de mayo y jiotilla mediante la determinación del contenido de sólidos solubles totales, pH, humedad, acidez titulable, betalainas y compuestos fenólicos. Posteriormente, se evaluó el efecto de diferentes factores en la extracción de los compuestos funcionales y la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* por los métodos de ABTS y DPPH empleando tecnologías de extracción convencional (maceración con agitación) y no convencional (ultrasonido y ultrasonido-microondas) con el objetivo de establecer las condiciones de extracción que permitieran obtener el mayor contenido de los compuestos con la mayor capacidad antioxidante. Además, en los extractos obtenidos utilizando tecnología convencional se identificaron por HPLC algunas betacianinas, betaxantinas y compuestos fenólicos presentes en los extractos de jiotilla y de pitaya de mayo. Finalmente, se determinó el efecto del extracto de jiotilla obtenido convencionalmente en la resistencia al estrés térmico, al estrés oxidante y al estrés con radiación ultravioleta, así como en el periodo de vida, la fertilidad y la movilidad en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, un modelo invertebrado multicelular que ha sido empleado con dicha finalidad. Se seleccionó el extracto de jiotilla debido que es un fruto que se ha considerado una posible fuente alternativa de las betalainas, además, no se había reportado ensayos en modelos *in vivo* con extractos de este fruto.

Los resultados mostraron que el método de extracción afectó el contenido de compuestos funcionales y la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de jiotilla y pitaya de mayo. La extracción por maceración con agitación presentó mayor cantidad de los pigmentos, de compuestos fenólicos totales y mayor capacidad antioxidante en los extractos de pitaya de mayo. Mientras que la extracción de ultrasonido incrementó el contenido de compuestos

fenólicos totales y mayor capacidad antioxidante de frutos de jiotilla y la extracción convencional de maceración con agitación permitió obtener el mayor contenido de betalaínas en estos frutos. El contenido de los compuestos funcionales fue mayor en los frutos de jiotilla que en pitaya de mayo. El análisis por HPLC de los extractos etanólicos obtenidos por maceración con agitación permitió identificar las betacianinas betanina e isobetanina, las betaxantinas vulgaxantina I, indicaxantina e isoindicaxantina y compuestos fenólicos como el ácido gálico en extractos de ambos frutos. Finalmente, la evaluación de la actividad funcional del extracto etanólico de jiotilla mostró que este aumentó la resistencia al estrés oxidante y al estrés térmico, así como el tiempo de supervivencia media de *Caenorhabditis elegans* sin afectar sus funciones de fertilidad y de movilidad. Estos resultados son los primeros reportes del efecto protector del extracto de jiotilla en el modelo del nematodo *Caenorhabditis elegans* sometido a distintos tipos de estrés. El efecto del extracto en el nematodo se atribuye principalmente a las betaxantinas y compuestos fenólicos presentes.

## ABSTRACT

Jiotilla (*Escontria chiotilla*) and pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) are endemic fruits from Mexico. An alternative to stimulate the utilization of these fruits is the extraction and characterization of their functional compounds such as betalains and phenolic compounds. The extraction is the main process to obtain these compounds; however, since there are different factors that affect this process, it is important to establish the extraction method and conditions that allow obtaining the highest content of compounds. The interest in these compounds derives from the functional activities that have been reported, being the antioxidant capacity one of the most studied.

In this work, the physicochemical characterization of pitaya de mayo and jiotilla fruits was initially carried out by determining the content of total soluble solids, pH, moisture content, titratable acidity, betalains and phenolic compounds. Then, the effect of different factors on the extraction of functional compounds and the determination of antioxidant capacity *in vitro* by ABTS and DPPH methods were evaluated using conventional (maceration with agitation) and non-conventional extraction technologies (ultrasound and ultrasound-microwave), to establish the extraction conditions that would allow obtaining the highest content of compounds and antioxidant capacity. In addition, in the extracts obtained using conventional technology, some betacyanins, betaxanthins and phenolic compounds present in the extracts of jiotilla and pitaya de mayo were identified by HPLC. Finally, the functional effect of conventionally obtained jiotilla extract on resistance to heat stress, oxidative stress and ultraviolet radiation stress, as well as on life span, fertility and motility in the nematode *Caenorhabditis elegans*, a multicellular invertebrate model that has been used for this purpose, was determined. Jiotilla extract was selected because it is a fruit that has been considered a possible alternative source of betalains, and *in vivo* model assays with extracts of this fruit had not been reported.

The results showed that the extraction method affected the content of functional compounds and the *in vitro* antioxidant capacity of jiotilla and pitaya de mayo extracts. Extraction by maceration with agitation showed higher amounts of pigments, total phenolic compounds and higher antioxidant capacity in pitaya de mayo extracts. While the ultrasound extraction increased the content of total phenolic compounds and greater antioxidant capacity of jiotilla fruits and the conventional extraction of maceration with agitation allowed obtaining the highest content of betalains in these fruits. The content of functional compounds were higher in jiotilla

fruits than in pitaya de mayo. HPLC analysis of ethanolic extracts obtained by shaking maceration allowed the identification of betacyanins such as betanin and isobetanin, betaxanthins like vulgaxanthin I, indicaxanthin and isoindicaxanthin, and phenolic compounds such as gallic acid in extracts of both fruits. Finally, the evaluation of the functional activity of the ethanolic extract of jiotilla showed that it increased the resistance to oxidative stress and heat stress, as well as the mean survival time of *Caenorhabditis elegans* without affecting its fertility and motility functions. These results are the first reports of the protective effect of jiotilla extract on the model nematode *Caenorhabditis elegans* subjected to different types of stress. The effect of the extract on the nematode is mainly attributed to the betaxanthins and phenolic compounds present.

## **Abreviaturas**

BC: Betacianinas

BX: Betaxantinas

BET: Betalaínas totales

EAG: Equivalentes de ácido gálico

d: Día

pf: Peso fresco

ps: Peso seco

tr: Tiempo de retención

TFA: Ácido trifluoroacético

CFT: Compuestos fenólicos totales

UAE: Extracción asistida por ultrasonido

UMAE: Extracción asistida por ultrasonido-microondas

UV: Ultravioleta

## Índice

RESUMEN.....	4
Abreviaturas.....	8
1. Introducción.....	16
2. Marco teórico.....	18
2.1 Pitaya de mayo.....	18
2.1.2 Compuestos bioactivos en pitaya de mayo.....	19
2.2 Jiotilla.....	21
2.2.1 Compuestos bioactivos en jiotilla.....	22
2.3 Betalaínas.....	22
2.3.1 Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas.....	25
2.4 Compuestos fenólicos.....	26
2.5 Métodos de extracción de compuestos bioactivos.....	28
2.6 Especies reactivas de oxígeno, radicales libres y estrés oxidante.....	29
2.6.1 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres.....	29
2.6.2 Efectos de EROS en biomoléculas.....	31
2.6.3 Protección de los antioxidantes a biomoléculas.....	33
2.7 Cuantificación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	34
2.8 Determinación de la actividad funcional de los antioxidantes con <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo biológico de estudio.....	36
3. Justificación.....	39
4. Hipótesis.....	40
5. Objetivos.....	41
5.1 Objetivo general.....	41
5.2 Objetivos específicos.....	41

6. Metodología .....	42
6.1 Material biológico .....	42
6.2 Caracterización fisicoquímica de los frutos.....	42
6.2.1 Determinación de acidez titulable .....	42
6.2.2 Determinación de pH .....	42
6.2.3 Determinación de sólidos solubles totales.....	42
6.2.4 Determinación de contenido de humedad.....	43
6.3 Extracción de compuestos funcionales.....	43
6.3.1 Extracción convencional de compuestos fenólicos y betalaínas de frutos de pitaya de mayo.....	43
6.3.2 Extracción convencional de compuestos fenólicos y betalaínas de frutos de jiotilla .....	45
6.3.3 Extracción no convencional de compuestos fenólicos y betalaínas de frutos de pitaya de mayo y jiotilla. ....	47
6.4 Caracterización de los extractos.....	47
6.4.1 Determinación del contenido de betalaínas.....	47
6.4.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales.....	48
6.4.3 Semisíntesis y purificación de betaxantinas .....	48
6.4.4 Identificación de betalaínas y compuestos fenólicos mediante HPLC .....	48
6.4.5 Determinación de capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	49
6.5 Efecto del extracto de frutos de jiotilla en <i>C. elegans</i> .....	50
6.5.1 Manipulación y mantenimiento de <i>C. elegans</i> .....	50
6.5.2 Ensayo de resistencia al estrés oxidante .....	50
6.5.3 Ensayo de resistencia al estrés térmico .....	51
6.5.4 Ensayo de resistencia al estrés por radiación ultravioleta .....	51
6.5.5 Ensayo de fertilidad .....	51
6.5.6 Ensayo de periodo de vida y toxicidad .....	52

6.5.7 Ensayo de movilidad.....	52
6.6 Análisis estadístico.....	52
7. Resultados.....	54
7.1 Caracterización físicoquímica de los frutos de pitaya de mayo ( <i>Stenocereus pruinosus</i> ) y jiotilla ( <i>Escontria chiotilla</i> ) .....	54
7.2 Evaluación de los métodos de extracción en la obtención de compuestos funcionales de pitaya de mayo ( <i>Stenocereus pruinosus</i> ) .....	56
7.3 Evaluación de los métodos de extracción en la obtención de compuestos funcionales de jiotilla.....	69
7.4 Identificación por HPLC de betalaínas presentes en los extractos de frutos de pitaya de mayo y jiotilla.....	80
7.5 Identificación y cuantificación por HPLC de compuestos fenólicos presentes en los extractos de frutos de pitaya de mayo y jiotilla .....	83
7.6 Ensayos de actividad funcional del extracto de jiotilla en el nematodo de <i>C. elegans</i> .	86
7.6.1 Efecto del extracto de jiotilla en la resistencia de <i>C. elegans</i> al estrés oxidante....	86
7.6.2 Efecto del extracto de jiotilla en la resistencia de <i>C. elegans</i> con radiación ultravioleta .....	87
7.6.3 Efecto del extracto de jiotilla en la resistencia de <i>C. elegans</i> al estrés al estrés térmico.....	87
7.6.4 Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en el periodo de vida de <i>C. elegans</i> .....	89
7.6.5 Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en la fertilidad de <i>C. elegans</i> .....	91
7.6.6 Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en la movilidad de <i>C. elegans</i> ....	92
8. Conclusiones .....	94
9. Perspectivas .....	96
10. Rererencias bibliográficas.....	97
11. Anexos.....	112
Anexo 1. Curva estándar empleada para la determinación de fenoles totales.....	112

Anexo 2. Curva estándar para la determinación de capacidad antioxidante por el método de ABTS.....	112
Anexo 3. Curva estándar para la determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH.....	113
Anexo 4. Cromatograma de HPLC del estándar de betanina e isobetanina (C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub> ) [1 mg/mL] A) λ=535 nm y B) 480 nm.....	114
Anexo 5. Cromatograma de HPLC de estándares de betaxantina [1 mg/mL] a λ= 480 nm. A) indicaxantina e isoindicaxantina C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> y B) Vulgaxantina I C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .....	115
Anexo 6. Cromatogramas de HPLC de estándares de compuestos fenólicos .....	116
Anexo 7. Lista de productos obtenidos.....	118

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de las betaxantinas.....	24
Figura 2. Estructura química de las betacianinas.....	24
Figura 3. Clasificación de los compuestos fenólicos .....	27
Figura 4. Barrido espectral de: A) pitaya de mayo ( <i>Stenocercus pruinosus</i> ) y B) jiotilla ( <i>Escontria chiotilla</i> ). Longitudes de onda analizadas 200- 650 nm.....	56
Figura 5. Perfil de betalainas de HPLC del extracto de pitaya de mayo [1 mg/mL]. A) $\lambda$ =535 nm y B) 480 nm .....	81
Figura 6. Perfil de betalainas por HPLC del extracto de jiotilla [1 mg/mL]. A) $\lambda$ =535 nm y B) 480 nm .....	82
Figura 7. Perfil de compuestos fenólicos por HPLC del extracto de pitaya de mayo [10 mg/mL]. A. $\lambda$ =280 nm. B. $\lambda$ =370 nm.....	84
Figura 8. Perfil de compuestos fenólicos por HPLC del extracto de jiotilla [1 mg/mL] a $\lambda$ =280 nm. ....	85
Figura 9. Efecto de tratamiento con extracto crudo convencional etanólico de jiotilla obtenido por maceración con agitación en <i>C. elegans</i> en respuesta al estrés. A. Estrés oxidante inducido por la aplicación de peróxido de hidrógeno 1.5 mM. B. Estrés con radiación ultravioleta. C. Estrés térmico a 35°C.....	89
Figura 10. Efecto del tratamiento con extracto de jiotilla en <i>C. elegans</i> . A. Periodo de vida media. B. Periodo de vida máxima. C. Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> de individuos sincronizados expuestos a agua (control), betanina, 2,3.43 y 10 mg/mL de extracto de jiotilla a 20°C en la cepa nativa N2.....	91
Figura 11. Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en la fertilidad de <i>C. elegans</i> ....	92
Figura 12. Efecto del tratamiento con extracto de jiotilla y betanina en la función de movilidad de <i>C. elegans</i> en los días 1, 6, 10, 14, 17 y 22. Movimiento tipo A (movimiento sinusoidal normal), movimiento tipo B (movimiento menos suave y descoordinado) y movimiento tipo C (balanceo sólo de la cabeza o la cola). ....	93

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Composición química y análisis proximal de pitaya de mayo <i>Stenocereus pruinosus</i> .....	18
Cuadro 2. Identificación y cuantificación de betalaínas y compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS en pitaya de mayo naranja y roja.....	20
Cuadro 3. Composición química y análisis proximal de jiotilla <i>Escontria chiotilla</i> .....	22
Cuadro 4. Especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno.....	30
Cuadro 5. Caracterización físico-química de los frutos de pitaya de mayo y jiotilla. ....	55
Cuadro 6. Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de extractos de pulpa fresca y liofilizada de frutos de pitaya de mayo. ....	57
Cuadro 7. Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en extractos de pitaya de mayo. Efecto del tipo de disolvente metanol 80% (v/v) y etanol 50% (v/v) y agua.....	58
Cuadro 8. Método de superficie de respuesta (RSM) y resultados de BX, BC, BET, CFT y capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH. ....	59
Cuadro 9. Modelos matemáticos para la optimización de la extracción convencional de betalaínas, betaxantinas, betacianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en frutos de pitaya de mayo.....	60
Cuadro 10. Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en las condiciones óptimas del proceso de extracción convencional en frutos de pitaya de mayo. ....	61
Cuadro 11. Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en extractos de pitaya de mayo obtenidos con extracción convencional, evaluación del efecto del número de extracciones. ....	63
Cuadro 12. Contenido de compuestos funcionales y capacidad antioxidante mediante extracción asistida por ultrasonido con sonda en frutos de pitaya de mayo. ....	65
Cuadro 13. Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en frutos de pitaya de mayo obtenidos por extracción asistida con ultrasonido- microondas. ....	67
Cuadro 14. Comparación del contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en los procesos de extracción convencional,	

extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por ultrasonido/microondas en frutos de pitaya de mayo. ....	68
Cuadro 15. Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en extractos de jiotilla obtenidos por extracción convencional con metanol 80% (v/v), etanol 50% (v/v) y agua.....	70
Cuadro 16. Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en extractos de jiotilla obtenidos con extracción convencional, evaluación del efecto del número de extracciones.....	71
Cuadro 17. Método de superficie de respuesta (RSM) y resultados de BX, BC, BET, CFT y capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH. ....	72
Cuadro 18. Modelos matemáticos para la optimización de la extracción convencional de betalaínas, betaxantinas, betacianinas, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante en frutos de jiotilla.....	73
Cuadro 19. Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en condiciones óptimas del proceso de extracción convencional en frutos de jiotilla. ....	74
Cuadro 20. Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en extractos de frutos de jiotilla obtenidos con ultrasonido. ...	76
Cuadro 21. Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> en frutos de jiotilla obtenidos por extracción asistida con ultrasonido- microondas.....	78
Cuadro 22. Comparación del contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos de jiotilla en los procesos de extracción convencional, extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por ultrasonido/microondas.....	79

## 1. Introducción

La pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) y la jiotilla (*Escontria chiotilla*), son frutos de cactáceas provenientes de la Mixteca Oaxaqueña, Poblana y Guerrerense de México, éstos se consumen frescos o procesados, en aguas, jugos, nieves, entre otros. Además de proporcionar nutrientes, la pitaya y la jiotilla contienen compuestos antioxidantes, tales como betalaínas y compuestos fenólicos, que son de interés para la industria alimenticia, cosmética y farmacológica (Luna Morales y Aguirre, 2001; Soriano-Santos *et al.*, 2007; García-Cruz *et al.*, 2013). Una alternativa para incrementar el aprovechamiento de estos frutos consiste en la extracción y caracterización de sus compuestos funcionales tales como betalaínas y compuestos fenólicos.

La extracción es el proceso principal en la obtención de los compuestos funcionales. Dicho proceso está influenciado por diferentes factores como la naturaleza química de los compuestos, el tamaño de partícula de la muestra, la presencia de sustancias interferentes, así como el método de extracción (Stalikas, 2007). Entre los métodos de extracción de compuestos funcionales, se encuentran los métodos convencionales tales como la maceración o reflujo con el uso de diferentes disolventes, los cuales presentan como ventaja la simplicidad de los equipos empleados para el proceso, sin embargo, estos métodos tienen menor selectividad y eficiencia, además de requerir tiempos largos de extracción y uso de grandes cantidades de disolvente. Recientemente se han incluido técnicas emergentes o no convencionales como la extracción asistida por ultrasonido, por microondas, entre otros, que ofrecen ventajas como mayor selectividad, mayor rendimiento y disminución del tiempo de extracción (Oroian *et al.*, 2015).

A pesar de que existen diferentes métodos para la obtención de compuestos funcionales es necesario establecer las condiciones óptimas del proceso de extracción de las betalaínas y compuestos fenólicos para cada matriz que los contiene, como los frutos de pitaya y de jiotilla que proporcionen un extracto con alto contenido de estos compuestos.

Una estrategia para evaluar la capacidad antioxidante de un extracto o compuesto es mediante ensayos *in vitro*, que consisten en determinar la actividad de los extractos o compuestos frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical tales como 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), ácido 2,2'-[3- etil benzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS), entre otros (Kuskoski *et al.*, 2005). Sin embargo, estos métodos no reflejan las condiciones celulares fisiológicas, la absorción, la

biodisponibilidad y el metabolismo de los compuestos antioxidantes (Villa-Hernández *et al.*, 2017), por lo que se ha sugerido el estudio conjunto de ensayos *in vitro* e *in vivo*. El nematodo *C. elegans* se ha propuesto como un buen modelo *in vivo* por poseer características como fácil manejo en el laboratorio, tiene un tiempo de vida corto, su genoma ha sido completamente secuenciado y tiene una alta similitud con el genoma de mamíferos (Martorell *et al.*, 2011). *C. elegans* se ha empleado para evaluar el efecto de extractos de origen vegetal y compuestos puros en el periodo de vida, resistencia a distintos tipos de estrés, verificando además que estos efectos no generen afectaciones en funciones fisiológicas del nematodo como la fertilidad y la movilidad.

El presente proyecto tuvo como objetivo evaluar el efecto de las tecnologías de extracción convencional y no convencional en la obtención de compuestos funcionales de pitaya de mayo y jiotilla, así como evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de estos extractos de los frutos. Además, se estudió en *C. elegans* el efecto *in vivo* de los extractos de los frutos de jiotilla, debido al potencial como de este fruto como fuente alternativa de betalaínas

## 2. Marco teórico

### 2.1 Pitaya de mayo

La pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) es un cactus columnar de hasta 8 m de altura que crece en zonas semiáridas de los estados de Oaxaca, Puebla, Chiapas, Veracruz, Tamaulipas y Yucatán, en México (Parra *et al.*, 2008), es una especie cultivada en huertos caseros (Fujihara *et al.*, 2021), y es una de las cactáceas más cultivadas en el centro de México, ya que sus frutos son comestibles y tienen el mayor valor económico de todas las especies de cactáceas columnares en la región (Parra *et al.*, 2008; Parra, *et al.*, 2012).

Los frutos son espinosos, de forma ovalada, con diámetro ecuatorial entre 6-6.46 cm y diámetro polar entre 7.5- 8.7 cm, pesan entre 171-195 g, su pulpa presenta diferentes colores según la variedad es de color blanco, naranja, rosa, roja o púrpura; con semillas de color negro (García-Cruz *et al.*, 2016; García-Cruz *et al.*, 2021). La máxima producción de este fruto en México se presenta en los meses de abril y mayo (Luna Morales y Aguirre, 2001). En el Cuadro 1 se presenta la composición química de *Stenocereus pruinosus* variedad roja.

**Cuadro 1.** Composición química y análisis proximal de pitaya de mayo *Stenocereus pruinosus* tomado de García-Cruz *et al.*, 2013.

	Variable	Pitaya de mayo roja
Caracterización química	Sólidos solubles totales (°Brix)	9.3 ± 1.1
	Acidez titulable (% ácido málico)	0.17 ± 0.09
Análisis proximal	Humedad (%)	87.1 ± 1.4
	Carbohidratos (%)	10.2 ± 0.24
	Proteína (%)	1.3 ± 0.05
	Fibra cruda (%)	0.67 ± 0.09
	Cenizas (%)	0.63 ± 0.11
	Ácidos grasos (%)	0.12 ± 0.001

### 2.1.2 Compuestos bioactivos en pitaya de mayo

García-Cruz *et al.* (2012), evaluaron el contenido total de betalaínas (BET), betaxantinas (BX) y betacianinas (BC) en pitaya roja y anaranjada procedentes del estado de Puebla. La pitaya roja presentó mayor cantidad de BET (347 mg/100 g muestra seca), con BC (199.6 mg/100 g muestra seca), mientras que la pitaya anaranjada tuvo un mayor contenido de BX (177.37 mg/100 g muestra seca). También se ha reportado el contenido de fenoles totales solubles en las pitayas rojas y naranjas, siendo de 120 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ 100 g peso seco (ps) y 160 mg EAG/ 100 g de ps respectivamente. Es importante resaltar que el contenido de polifenoles en la pitaya es comparable con la cantidad reportada en frutas que son fuente de dichos compuestos funcionales como moras y arándanos (García-Cruz *et al.*, 2013).

En otro estudio sobre pitaya de mayo variedad naranja, proveniente de Puebla, se determinó la concentración total de BET, BC y BX, siendo de 234.59 mg/100 g ps, 207.78 mg/ 100g peso seco, y 26.81 mg/100 g ps, respectivamente. Además, los investigadores reportaron que los frutos presentaron una capacidad antioxidante de 48.80  $\mu$ mol Equivalente trolox/ g ps (Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2017).

Se han identificado y cuantificado las betalaínas de frutos de pitayas de mayo de las variedades roja y naranja, mediante las técnicas de HPLC y espectrometría de masas de extractos metanólicos acidificados (1% (v/v) ácido trifluoroacético (TFA)). Los resultados arrojaron que el perfil en ambas variedades es similar, siendo la indicaxantina (77.59%), la gomprenina (18.62 %), la filocactina (3.50 %), la 2-descarboxibetanina (0.29 %), y sus isómeros las BX predominantes. Así mismo, reportaron que la cantidad de BX fue mayor que de BC en las variedades naranja y roja. Igualmente, fue establecido el perfil de compuestos fenólicos, los cuales corresponden principalmente a derivados de hidroxicinamoilo, flavonoles y flavononas. En el Cuadro 2 se resumen las betalaínas y compuestos fenólicos detectados y cuantificados (García-Cruz *et al.*, 2017).

**Cuadro 2.** Identificación y cuantificación de betalaínas y compuestos fenólicos por HPLC-DAD-MS en pitaya de mayo naranja y roja. Tomado de García-Cruz *et al.* (2017).

Compuesto	$\lambda_{\max}$ (nm)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	MS <sup>2</sup> (m/z)	Pitaya de mayo	Pitaya de mayo
				naranja	roja
Concentración de compuestos [ $\mu\text{g/g}$ peso seco]					
<b>Betacianinas</b>					
Gomprenina I	536	551	389	Trazas	3276.1 $\pm$ 9.2
Isogomprenina I	538	551	389	36.9 $\pm$ 7.4	972.6 $\pm$ 69.3
2-descarboxi- betanina	498	507	345	Trazas	65.7 $\pm$ 26.2
Filocactina	536	637	593, 551, 389	109.1 $\pm$ 0.3	798.4 $\pm$ 57.6
Isofilocactina	538	637	593, 551, 389	16.1 $\pm$ 0.7	190.6 $\pm$ 7.02
Derivado de betanidina	514	651	389	Trazas	55.7 $\pm$ 18.4
<b>Total de betacianinas</b>				162.1 $\pm$ 7.0	5423.4 $\pm$ 135.3
<b>Betaxantinas</b>					
Isoindicaxantina	478	309	263,235	1158.6 $\pm$ 147.3	1143.4 $\pm$ 148.4
Indicaxantina	478	309	263,235	20894.8 $\pm$ 181.8	16563.3 $\pm$ 979.7
<b>Total de betaxantinas</b>				22053.5 $\pm$ 329.1	17706.4 $\pm$ 1128.1
<b>Derivados de hidroxicinamoil</b>					
Cafeoil hexósido	316	341	179,135	17.5 $\pm$ 2.3	35.4 $\pm$ 3.6
Feruloil hexósido	316	517	193,149	8.8 $\pm$ 1.1	nd

Ácido p-cumaroil quínico	300	337	191,173,163,145	7.5 ± 0.1	12.1 ± 0.1
<b>Flavonoles</b>					
Quercetina-3-O- rutinósido	352	609	301	4.2 ± 0.2	71.5 ± 1.9
Isoramnetina hexósido	356	623	315	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
Isoramnetina 3- O-glucósido	356	623	315	1.3 ± 0.0	nd
<b>Flavononol</b>					
Taxifolina	296	507	303	5.3 ± 0.6	nd
<b>Compuestos fenólicos totales</b>				53.8 ± 2.9	75.6 ± 1.6

nd: No detectado

## 2.2 Jiotilla

La jiotilla es el fruto del cactus arborecente *Escontria chiotilla*, el cual puede medir entre 7 y 8 m de altura, tiene ramas de color verde oscuro, crece de forma silvestre en zonas áridas y semiáridas del territorio mexicano, dentro de la Mixteca Baja Oaxaqueña, Guerrero, Michoacán y sur de Puebla (Soriano-Santos *et al.*, 2007). Es un fruto con importancia cultural y económica en estas regiones, aunque es poco conocido en otras entidades del país (Ruiz Huerta *et al.*, 2015). La floración se da entre abril y junio y la producción de mayo a agosto (Oaxaca-Villa *et al.*, 2006).

Los frutos son no climatéricos, son de color rojo opaco en el exterior, con diámetro ecuatorial de  $2.81 \pm 0.29$  cm, diámetro polar de  $3.48 \pm 0.36$  cm, un peso de  $18.7 \pm 3.12$  g, con pulpa comestible de coloración roja, con sabor dulce; contiene numerosas semillas de color negro (Ruiz Huerta *et al.*, 2015; Sandate-Flores *et al.*, 2020). En el Cuadro 3 se presenta la caracterización fisicoquímica reportada de frutos de jiotilla de Tlacolula, Oaxaca.

**Cuadro 3.** Composición química y análisis proximal de jiotilla *Escontria chiotilla*. Tomado de: Sandate-Flores *et al.* (2020).

	Variable	Jiotilla
Caracterización química	Sólidos solubles totales (°Brix)	7.4
	pH	4.17
Análisis proximal	Humedad (%)	85.21 ± 0.54
	Carbohidratos (%)	12.75 ± 0.19
	Proteína (%)	1.03 ± 0.02
	Fibra cruda (%)	1.31 ± 0.04
	Cenizas (%)	0.53 ± 0.02
	Extracto etéreo (%)	0.48 ± 0.01

### 2.2.1 Compuestos bioactivos en jiotilla

En una caracterización parcial realizada por Soriano-Santos *et al.* (2007), del fruto de jiotilla de color rojo, reportaron que los pigmentos pertenecen a la familia química de las betalaínas, de las cuales el contenido de betacianinas de fue de 8.9 mg /100 g de pulpa y 119 mg /kg de pulpa de betaxantinas en extractos crudos del fruto; en la fracción de betacianinas fue identificada la betanina, en la fracción de betaxantinas fueron identificadas vulgaxantina e indicaxantina. En el jugo clarificado de frutos de jiotilla, Sandate-Flores *et al.*, (2020), reportaron 2.93 ± 0.04 mg /g peso seco (ps) de contenido de betacianinas, 2.52 ± 0.35 mg/g ps de betaxantinas y 195.39 ± 7.82 mg EAG /100 g peso fresco (pf); los investigadores identificaron y cuantificaron el ácido gálico (1.02 ± 0.01 mg /100 g pf) y el ácido cafeico (0.08 ± 0.00/ 100 g pf).

### 2.3 Betalaínas

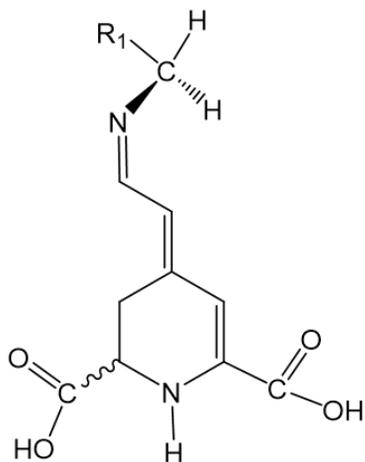
Las betalaínas son producto del metabolismo secundario de las plantas, son pigmentos heterocíclicos, hidrosolubles, sintetizados a partir del aminoácido tirosina. Este tipo de compuestos absorben fuertemente la luz y de esa manera pueden ser identificadas por

espectrofotometría. Las betalaínas se dividen en dos grupos: las betaxantinas que proporcionan coloraciones amarillas (Fig. 1) y las betacianinas que brindan tonalidades rojas (Fig. 2) (Herbach *et al.*, 2006; Franco- Zavaleta *et al.*, 2009; Gandía-Herrero *et al.*, 2013; Vergara Hinostroza, 2013; Corzo-Rios *et al.*, 2016).

Las betaxantinas, son productos de la condensación del ácido betalámico y aminoácidos o compuestos aminados, dependiendo del compuesto aminado, la máxima absorbancia de este tipo de betalaínas se encuentra entre 460-480 nm (Gandía-Herrero y Garcia-Carmona, 2013). Entre las betaxantinas más comunes se encuentran la vulgaxantina presente principalmente en la raíz del betabel (*Beta vulgaris*) (Lee *et al.*, 2014), y la indicaxantina (prolina-betaxantina) pigmento predominante en frutos de *Opuntia ficus indica* amarilla (García-Cayuela *et al.*, 2019; Carreón-Hidalgo *et al.*, 2022).

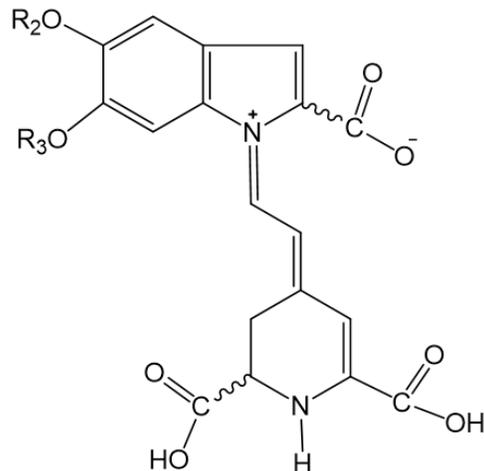
Por otro lado, las betacianinas se caracterizan por su coloración rojo violeta (griego: kyaneos= azul), son compuestos derivados de la condensación del ácido betalámico y ciclo-3-(3,4-dihidroxifenilalanina), la presencia de este último compuesto proporciona un fuerte efecto batocrómico, desplazando la longitud de onda de máxima absorbancia entre 50 a 70 nm. Las betacianinas pueden encontrarse en forma mono o diglicosiladas y aciladas en la posición 5-O ó 6-O (Herbach *et al.*, 2006; Khan y Giridhar, 2015).

En cuanto a su estructura, las betaxantinas son más reactivas que las betacianinas, se ha reportado que las betacianinas son más estables que las betaxantinas, además, su estabilidad está dada por el número y tipo de sustituyentes (glucósidos, acilos) (Azeredo, 2009).



R<sub>1</sub>: Aminas o aminoácidos

**Figura 1.** Estructura química de las betaxantinas.



R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>: Acilo o glucósido

**Figura 2.** Estructura química de las betacianinas.

En la familia de las cactáceas, la betanina y su isómero la isobetanina son las betacianinas más abundantes en frutos de diferentes cactáceas como *O. ficus indica* (Cejudo-Bastante *et al.*, 2014), *O. joconostle* (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2013), *Hylocereus polyrhizus* (Faridah *et al.*, 2015). Se ha reportado que, las betaxantinas son más difíciles de aislar, la primera fue identificada como indicaxantina por Piatelli y Minale (1964), la cual fue aislada a partir de frutos del cactus *Opuntia ficus-indica* (Franco- Zavaleta *et al.*, 2009).

Las betalaínas han sido reconocidas por las actividades biológicas que presentan, tales como actividad antioxidante, antiinflamatoria, hepatoprotectora, anticancerígena (Carreón-Hidalgo *et al.*, 2022).

La capacidad antioxidante de las betalaínas se atribuye al grupo fenólico y al grupo aminocíclico presente en su estructura, por lo cual podría donar átomos de hidrógeno y/o electrones a radicales libres (Vergara Hinostroza, 2013). En comparación con las betaxantinas, las betacianinas pueden donar más fácilmente un electrón del grupo hidroxilo del fenol y los radicales de betacianina pueden estabilizarse por deslocalización de electrones del anillo aromático (Escribano *et al.*, 1998). Otro factor que afecta a la actividad de ambos tipos de betalaínas son los sustituyentes. La actividad de las betalaínas aumenta con el número de sustituyentes hidroxilo y dependiendo de la posición en la que se

encuentren (Gandía-Herrero, *et al.*, 2009). En las betacianinas la glicosilación reduce la actividad antioxidante (Vergara Hinostroza, 2013).

Se ha demostrado que las betalaínas además de eliminar directamente los radicales libres, pueden actuar indirectamente activando mecanismos de defensa antioxidantes. La administración oral de betalaínas del betabel mejora la actividad de sistemas antioxidantes enzimáticos como el superóxido dismutasa y el glutatión peroxidasa en el hígado, bazo y riñón en ratas; las betalaínas, pueden crear condiciones celulares favorables para contrarrestar el estrés oxidante (Cai *et al.*, 2003; Stintzing *et al.*, 2005; Wroblewska *et al.*, 2011; Gengatharan *et al.*, 2015).

### **2.3.1 Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas**

La condensación del ácido betalámico con compuestos amino (betaxantinas) o ciclo-Dopa (betacianinas) proporcionan diferente grado de estabilidad a las estructuras de estos pigmentos (Herbach *et al.*, 2006; Vergara Hinostroza, 2013). El ácido betalámico y el ciclo-Dopa son compuestos estables en ausencia de oxígeno, sin embargo, su estabilidad varía en función del pH. Se ha reportado que el ácido betalámico es más estable a pH neutro, mientras que el ciclo-Dopa es más estable a pH ácido (Huang y Elbe, 1987). La termoestabilidad del ácido betalámico y el ciclo-Dopa depende del pH y la ausencia de oxígeno (Huang y Elbe, 1987).

Se ha reportado una mayor estabilidad de las betacianinas a temperatura ambiente en comparación con las betaxantinas. Los principales factores que influyen en la estabilidad de las betalaínas son la temperatura, el pH, la actividad del agua, la luz, la presencia o ausencia de oxígeno y de metales (Herbach *et al.*, 2006; Vergara Hinostroza, 2013; Yen-Ming y Lee-Fong, 2015).

**- Temperatura:** Puede considerarse como el factor más importante en la estabilidad de las betalaínas durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos; se ha establecido que el aumento de la temperatura acelera la tasa de degradación de las betalaínas, con lo cual se produce una reducción del color característico de este pigmento. Betalaínas de frutos de *Opuntia ficus-indica* disminuyen hasta en un 90% en un rango de temperatura de 50-90 °C (Carreón-Hidalgo, *et al.*, 2023). Para su conservación se han reportado temperatura de almacenamiento de 4°C (Castellar, *et al.*, 2003).

**-pH:** Las betalaínas son estables en un rango de pH de 3 a 7, valores fuera de este rango conducen a la pérdida del color. Además, se ha determinado que el rango de pH al que son

estables este grupo de compuestos varía de acuerdo con el tipo de betalaina y la presencia o ausencia de oxígeno. Así por ejemplo, la betanina procedente del betabel es estable a pH entre 4 a 6, sin embargo, en condiciones aerobias el rango de pH en que se mantiene estable se encuentra entre 5.5 y 5.8, mientras que, en ausencia de oxígeno el rango de pH en que es estable se encuentra entre 4 y 5.

**-Luz:** Las betalaínas son más estables en condiciones de oscuridad. Por efecto de la luz se ha reportado la degradación en 15.6% de la betanina, este efecto es dependiente de la presencia de oxígeno, en que se ha reportado una degradación del 28%. Por otro lado, en zumos de jugo de pitaya, compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico inhiben la degradación ocasionada por la luz.

**-Oxígeno:** Las betalaínas de betabel, reaccionan con el oxígeno molecular, causando el oscurecimiento del producto y pérdida del pigmento.

**-Metales catiónicos:** La presencia de cationes metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), aceleran la degradación de la betanina, sin embargo, se ha establecido que la degradación depende de la composición de la matriz de procedencia.

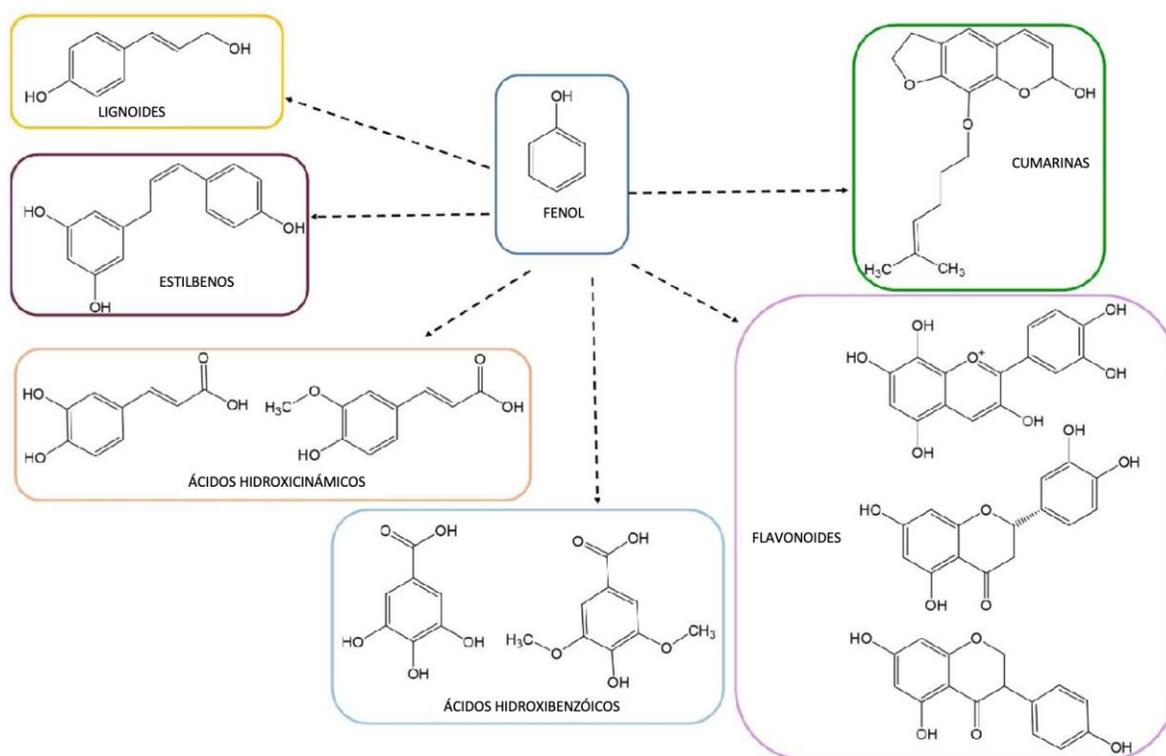
**-Actividad de Enzimas:** Las betacianinas son más propensas a la degradación por peroxidasas que las betaxantinas, mientras que estas últimas son más susceptibles a la oxidación química por peróxido de hidrógeno.

La degradación de las betalaínas por acción de los factores mencionados puede ocurrir por varias vías tales como la isomerización, desglicosilación, hidrólisis, descarboxilación y la dehidrogenación.

## 2.4 Compuestos fenólicos

Son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son metabolitos secundarios derivados de vías metabólicas de las plantas como la vía de las pentosas fosfato, del shikimato y fenilpropanoide (Ajila *et al.*, 2011). A este tipo de compuestos se les han atribuido diferentes efectos tales como aportar color, sabor y olor a las plantas para atraer polinizadores; desempeñan un papel importante en la protección de la planta frente a los depredadores, y como fitoalexinas y sustancias alelopáticas, así como proteger a la planta de la radiación UV. También actúan como señales químicas en la floración, la regulación del crecimiento y la polinización de las plantas; en los procesos de simbiosis vegetal, pueden actuar como antioxidantes e inactivar el centro activo de numerosas enzimas, (Dicko *et al.*, 2006; Hounsome *et al.*, 2008; Piñol *et al.*, 2013).

Los compuestos fenólicos se caracterizan por poseer en su estructura uno o más anillos aromáticos o fenólicos, con uno o más grupos hidroxilo; de acuerdo con su estructura, se clasifican en flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, ligninas, lignoides, y lignanos (Fig. 3) (Hounsome *et al.*, 2008; Khoddami *et al.*, 2013). Dada la diversidad de estructuras químicas dentro de este grupo, no existe una metodología única de extracción. Por lo tanto, es necesario desarrollar un método óptimo y apropiado para la extracción, purificación y caracterización adecuada de los compuestos fenólicos presentes en la planta analizada (Ajila *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Clasificación de los compuestos fenólicos (Elaboración propia a partir de datos de Granato *et al.*, 2016)

Se ha reportado que los compuestos fenólicos inhiben la peroxidación lipídica, eliminan radicales libres, quelan iones de hierro y cobre (Heim *et al.*, 2002). Además, tienen efectos benéficos en la salud, al actuar como antioxidantes, antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antitrombóticos, cardioprotectores y vasodilatadores (Oroian *et al.*, 2015). Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos se deben principalmente a que actúan como agentes reductores, donantes de hidrógeno y extintores de oxígeno singlete (Rice-Evans *et al.*, 1996; Ajila *et al.*, 2011; Espin *et al.*, 2016).

## 2.5 Métodos de extracción de compuestos bioactivos

En las últimas décadas se han desarrollado diversos métodos para el análisis de compuestos con actividad funcional como los compuestos fenólicos y pigmentos antioxidantes. Sin embargo, antes de proceder a la identificación y cuantificación de estos compuestos bioactivos, es necesario realizar el proceso de extracción de los compuestos de la matriz originaria. Entre las técnicas empleadas se encuentran las tradicionales o convencionales de maceración o reflujo con el uso de diferentes disolventes. Recientemente, se han incluido técnicas emergentes o no convencionales como la extracción asistida por ultrasonido, por microondas, por campos eléctricos, por enzimas, por fluidos supercríticos o por combinaciones de estas (Azmir *et al.*, 2013; Oroian *et al.*, 2015).

**Extracción con disolventes:** Es una operación de separación en la que se aplica un disolvente para extraer y separar un componente deseado (solute), en función de su solubilidad, la separación ocurre por la interacción entre las moléculas del disolvente y las del soluto. Durante el proceso existen dos parámetros importantes que son, primero el factor de separación (equilibrio químico entre las fases sólidas y el disolvente), segundo, la fuerza para la extracción del disolvente la cual es definida como la diferencia de la concentración del soluto entre las dos fases. Entre los disolventes, el etanol es uno de los más empleados para la extracción de antioxidantes hidrofílicos debido a su bajo costo, reutilizable, no tóxico, es reconocido como seguro y los extractos pueden usarse en la industria alimentaria. El uso combinado de disolventes orgánicos y agua puede facilitar la extracción de compuestos, además, el aumento de la temperatura puede mejorar la extracción de los antioxidantes con disolventes dado que el coeficiente de difusión es más alto (Oroian *et al.*, 2015). Las ventajas de este método de extracción incluyen el uso de equipos simples y que el disolvente puede ser reutilizado. Entre las desventajas del uso de disolventes están su baja selectividad, baja eficiencia de extracción, largos tiempos de extracción, las altas temperaturas en el caso de uso de soxhlet que pueden degradar compuestos termolábiles, generan contaminación ambiental por los residuos de disolventes y podrían requerirse varios procesos de extracción (Wang *et al.*, 2013).

El uso de este método de extracción implica considerar varios parámetros que pueden afectar su rendimiento tales como el tiempo requerido para dicho proceso, la temperatura, la relación disolvente / muestra, el número de extracciones, así como el tipo de disolvente.

También tienen influencia sobre el proceso de extracción el tipo y composición de la matriz y los compuestos bioactivos de interés (Khoddami *et al.*, 2013).

**Extracción asistida por ultrasonido (UAE):** Es una de las técnicas más empleadas en la industria de la extracción para mejorar los fenómenos de transferencia de masas; la tasa de transferencia aumenta por acción de la cavitación, las burbujas formadas en el líquido colisionan generando una presión que causa la ruptura del tejido vegetal, mejorando la liberación de los componentes intracelulares (Goula, 2013). Los factores a considerar durante la extracción asistida con ultrasonido son la amplitud, el tiempo de extracción, la temperatura generada y la relación disolvente/material (Prakash y Priya, 2016). Entre las ventajas del uso de esta metodología están: tiempos cortos de extracción de extracción, bajo volumen disolvente requerido, se puede llevar a cabo a bajas temperaturas evitando así el daño térmico a los compuestos termolábiles (Goula, 2013).

**Extracción asistida por microondas (MAE):** Es una técnica que implica la extracción de compuestos funcionales con base en el calentamiento obtenido de la fricción molecular debida a la alineación de iones y dipolos al campo eléctrico oscilante de las microondas. Se emplea una frecuencia de 2.45 GHz que permite un calentamiento efectivo sin inducir reacciones químicas, mediante el uso de recipientes cerrados, acorta el tiempo y aumenta la eficiencia de extracción, además, es una técnica reproducible, emplea bajos volúmenes de disolventes y requiere menores niveles de energía (Ballard *et al.*, 2010; Mosquera *et al.*, Hernandez, 2012). La extracción de los metabolitos secundarios por esta técnica es el resultado de la ruptura de las paredes celulares lo que proporciona una mayor liberación de los compuestos intracelulares. Mediante el uso de MAE se han obtenido mayores rendimientos y disminución en los tiempos de extracción de betalaínas del betabel, sin embargo, dada la naturaleza termolábil de este tipo de compuestos, las betalaínas pueden degradarse en tiempos prolongados (mayor a 100 s) (Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

## **2.6 Especies reactivas de oxígeno, radicales libres y estrés oxidante**

### **2.6.1 Especies reactivas de oxígeno y radicales libres**

Los organismos aerobios generan como parte de su metabolismo las especies reactivas de oxígeno (EROS), entre las que se encuentran algunos radicales libres (RL) y precursores de radicales libres. Los radicales libres, son especies químicas que contienen un electrón desapareado en su orbital más externo, confiriéndoles inestabilidad, haciéndolos reaccionar con otras moléculas para alcanzar su estabilidad para tomar o ceder un electrón, lo que ocasiona cambios en la composición, estructura o función de las moléculas alteradas. En

el Cuadro 4 se presentan las principales EROS (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2004; Konigsberg, 2008; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014).

**Cuadro 4.** Especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno

TIPO	TIPO DE EROS	VIDA MEDIA (s)	SÍMBOLO
Derivados del oxígeno	Radical superóxido	$10^{-4}$	$O_2^{\cdot}$
	Radical hidroxilo	$10^{-9}$	$\cdot OH$
	Peróxido de hidrógeno	estable	$H_2O_2$
	Radical peroxilo	$\sim 1$	$ROO^{\cdot}$
	Hidroperóxido	Estable	$ROOH$
	Oxígeno singulete	$10^{-6}$	$^1O_2$
	Ozono	$\sim 1$	$O_3$
Derivados del nitrógeno	Óxido nítrico	$\sim 1$	$NO^{\cdot}$
	Peroxinitrito	$10^{-3}$	$ONOO^{\cdot}$
	Dióxido de nitrógeno	$\sim 1$	$NO_2$

Fuente: Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2004; Konigsberg, 2008; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014.

Las EROS son producidas por el metabolismo celular aeróbico, el oxígeno ( $O_2$ ) es un elemento esencial para la función de los organismos aerobios pues juega un papel crucial en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa en donde se produce adenosina trifosfato (ATP) requerido para las funciones celulares. Durante este proceso se forman EROS como productos intermedios. Se sugiere que el 0.1-0.5% del  $O_2$  que respiramos se fuga para generar el radical superóxido  $O_2^{\cdot}$  (Konigsberg, 2008; Lushchak, 2014). Así la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias, es la principal fuente de EROS, además, existen otras reacciones de oxidorreducción en distintos compartimentos celulares, las cuales están involucradas en procesos fisiológicos en los que también se producen EROS tales como la detoxificación de xenobióticos por la familia de los citocromos P450, el metabolismo de ácidos nucleicos mediante la xantina oxidasa, la respuesta inmunitaria contra infecciones durante el fenómeno de fagocitosis y la subsecuente activación de la NADPH oxidasa (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2015).

Los organismos aerobios han desarrollado mecanismos de defensa para contender con las EROS que son los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Lobo, *et al.*, 2010). Los sistemas antioxidantes enzimáticos son endógenos, entre estos se encuentran las enzimas glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa (Pietta, 2000). Los sistemas antioxidantes no enzimáticos pueden ser endógenos como la vitamina A, el ácido úrico, el glutatión, cofactores como CQ10, entre otros (Carocho y Ferreira, 2013) y exógenos como la vitamina C, compuestos fenólicos, betalaínas, carotenoides, estos se adquieren mediante la dieta (Pietta, 2000; Kanner *et al.*, 2001; Orian y Escriche, 2015).

El balance oxidante de la célula es fundamental para la regulación metabólica por lo tanto un desbalance entre las EROS y los sistemas antioxidantes, la sobreproducción de EROS y/o por una disminución de la capacidad protectora antioxidante, se induce un estrés oxidante que ha estado implicado en diversas patologías como enfermedades cardiovasculares, cáncer, trastornos neurológicos, diabetes (Valko *et al.*, 2007; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014).

Las EROS pueden reaccionar químicamente con las principales biomoléculas de la célula como son lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, generando un daño en su estructura y funciones metabólicas (Gutiérrez-Salinas y Morales-Gonzalez, 2004; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014; Schieber y Chandel, 2014). Sin embargo, en bajas concentraciones algunas EROS funcionan como moléculas de señalización importantes en diversos procesos fisiológicos como la secreción de insulina, producción de hormonas de crecimiento, citocinas, la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción o regulación de los transportadores y canales de iones en mamíferos (Bartosz, 2009). En las plantas las EROS también son importantes reguladores de su germinación, desarrollo y crecimiento de las hojas, de la raíz y pelos radicales (Tripathi y Oelmüller, 2012; Li *et al.*, 2023)

### **2.6.2 Efectos de EROS en biomoléculas**

Como se mencionó, las EROS pueden reaccionar con moléculas orgánicas que contienen enlaces dobles como lípidos insaturados, los anillos aromáticos de aminoácidos y las bases nitrogenadas, siendo el radical  $\text{OH}\cdot$  el principal responsable del daño a la mayoría de biomoléculas (Konigsberg, 2008; Pisoschi y Pop, 2015). Este radical es el más reactivo que se conoce, además, puede reaccionar de manera rápida e inespecífica con las bases nitrogenadas del ADN y ARN; con proteínas, lípidos y carbohidratos. Su capacidad de daño

celular también es debido que las células no tienen un sistema enzimático para contrarrestar este radical (Constanza y Muñoz Ariza, 2012).

**Lípidos:** Las EROS producen lipoperoxidación o peroxidación lipídica de los ácidos grasos de las membranas biológicas (membrana celular, membranas mitocondriales, membranas del retículo endoplásmico, entre otras). La lipoperoxidación ocurre cuando el ácido graso insaturado de un fosfolípido que forma parte de la membrana es atacado por un radical libre con lo cual los carbonos adyacentes a las insaturaciones son sensibles de ser atacados, el RL extrae un hidrógeno completo de ese carbono, produciendo un radical lipídico que por posteriores arreglos en la membrana y ataque de oxígeno singulete formarán subsecuentemente más radicales lipídicos, propagando con ello el daño, el cual finalmente causa cambios en la fluidez y permeabilidad de las membranas, este proceso tiene como producto final al malondialdehído (MDA) (Zorrilla-García, 2002; Konigsberg, 2008; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014).

**Proteínas:** Son las biomoléculas más susceptibles de sufrir oxidación (Pisoschi y Pop, 2015), el daño oxidante a las proteínas incluye fenómenos de nitración, carbonilación, oxidación, ruptura y entrelazamiento. La modificación oxidante de las proteínas incrementa su sensibilidad a la proteólisis y cambios conformacionales que dan por resultado la pérdida de su función (Calderón-Salinas *et al.*, 2013). El mecanismo por el cual ocurre el daño a proteínas se da de manera similar al del daño a los lípidos, La acción de las EROS sobre las proteínas se ejerce principalmente sobre los enlaces insaturados de los aminoácidos con anillos aromáticos y en los grupos tiol, por lo que las proteínas ricas en aminoácidos como triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína, pueden sufrir modificaciones estructurales (Zorrilla-García, 2002). Durante la oxidación de proteínas puede darse la formación de grupos carbonilos que puede estar ligada a la transformación de un residuo de aminoácido en otro y a la desaminación de los aminoácidos. Además, las EROS pueden alterar la proteína a través del entrecruzamiento intra- e intermolecular por la oxidación de cisteínas, lo que promueve la formación de puentes disulfuro donde no deberían existir, modificando la conformación tridimensional de las proteínas, promoviendo su agregación y/o disminuyendo su funcionalidad. La constante oxidación de las proteínas puede conducir al desdoblamiento o plegamiento defectuoso de las proteínas, así como a la formación de oligómeros tóxicos de proteínas. La presencia de iones metálicos en las proteínas puede catalizar la descomposición del  $H_2O_2$  e iniciar una cadena de reacciones

de radicales libres, proceso denominado oxidación de proteínas catalizadas por metales (Konigsberg, 2008).

**Ácidos nucleicos:** Los efectos observados de las EROS sobre los ácidos nucleicos, son debidos a fenómenos de hidroxilación de las bases nitrogenadas, a la escisión de hebras de ADN y a la formación de uniones cruzadas, lo que ocasiona alteraciones en los procesos de la replicación, transcripción y traducción (Zorrilla-García, 2002).

El radical  $\text{OH}\cdot$  es el principal responsable de los daños al ADN, los cuales pueden ocurrir sobre las bases púricas y pirimídicas, sobre los azúcares o en ambos compuestos; la guanina es la purina más susceptible a procesos oxidantes. El  $\text{OH}\cdot$  se une directamente a la base nitrogenada formando un aducto, cuya producción induce alteraciones en los puentes de hidrógeno que estabilizan la complementación de la doble cadena del ADN, por lo que durante la replicación la ADN-polimerasa puede presentar errores y generar transversiones y translocaciones. Además, los aductos generan mutaciones puntuales en el ADN. También se ocasionan daños en los azúcares, dando como resultado la escisión de una o ambas cadenas del ADN. Asimismo, se ha reportado que el daño oxidativo del ADN, ocasiona el decremento de la capacidad de los mecanismos de reparación (Konigsberg, 2008).

### **2.6.3 Protección de los antioxidantes a biomoléculas**

Las especies reactivas de oxígeno se forman naturalmente en los procesos metabólicos de la célula y ésta cuenta con mecanismos de protección que previenen su formación o detoxifican las EROS, los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Un antioxidante no enzimático es una molécula capaz de prevenir o evitar la oxidación de otra, ya sea por interacción y estabilización de las especies reactivas o por la transformación a otras estructuras más estables y de baja reactividad (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014).

Los sistemas no enzimáticos tales como la vitamina E y C, el glutatión reducido, el ácido úrico, los carotenoides, los compuestos fenólicos y las betalainas, juegan un papel importante, considerando que algunos actúan neutralizando o disminuyendo la reactividad de las especies reactivas de oxígeno (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014), y mediante la inducción de la actividad de factores que regulan la expresión de genes que codifican para enzimas relacionadas con la respuesta al estrés oxidante (Khan, 2016).

Se conoce que las betalaínas tienen actividad antioxidante *in vitro* inhibiendo los radicales 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) y el ácido 2,2'- [3- etil benzotiazolin-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>) (Koss -Mikołajczyk *et al.*, 2019), además de modular la expresión génica *in vivo* a través de la inducción de factores de transcripción como el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Krajka -Kuźniak *et al.*, 2013; Shunan *et al.*, 2021). Este factor de transcripción está implicado en la modulación de mecanismos antioxidantes como la regulación de la expresión génica de las enzimas hemo oxigenasa-1 (HO-1), NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión S-transferasas (GST), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT); así como en la regulación de genes relacionados con la respuesta al estrés oxidante (Wang *et al.*, 2010; Krajka -Kuźniak *et al.*, 2013; Shunan *et al.*, 2021).

Entre los sistemas enzimáticos están la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, el glutatión peroxidasa (GPx), las cuales actúan de forma sincronizada, la SOD se encarga de la dismutación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , una vez obtenida esta última especie, la catalasa interviene y se encarga de la dismutación y peroxidación de 2 moléculas de  $H_2O_2$  para producir oxígeno y agua. Mientras que la GPx elimina hidroperóxidos y peróxidos orgánicos (Zorrilla-García, 2002; Konigsberg, 2008; Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2014).

## **2.7 Cuantificación de la capacidad antioxidante *in vitro***

Además de los nutrientes esenciales y de los micronutrientes como minerales, las frutas y hortalizas aportan fibras, vitaminas y otros compuestos funcionales tales como los antioxidantes (compuestos fenólicos, betalaínas, carotenoides, entre otros), a los cuales se les han atribuido efectos benéficos en la prevención de diferentes enfermedades que derivan del daño que las EROS ocasionan a las diferentes biomoléculas (Kuskoski *et al.*, 2005).

La determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*, se divide en: métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno y en métodos basados en la transferencia de un solo electrón. Aunque el resultado final es similar, la cinética y el potencial de las reacciones es distinto.

Los métodos basados en transferencia de átomos de hidrógeno se fundamentan en una cinética de competencia en el que el antioxidante y el sustrato por los radicales peróxido generados térmicamente de la descomposición de compuestos azoicos (Huang *et al.*, 2005); la reactividad de los métodos está determinada por la energía de disociación del enlace y el potencial de ionización del antioxidante. Estos métodos son independientes del

disolvente y del pH, y se llevan a cabo en segundos o minutos. Sin embargo, la presencia de agentes reductores como los metales puede conducir a resultados con falsos positivos debido a una reactividad errónea por la presencia y actividad de los metales en el medio (Prior *et al.*, 2005). Dentro de estos métodos se incluyen: ORAC (Capacidad para Absorber Radical Oxígeno), TRAP (Parámetro Antioxidante para Atrapar Radicales Totales), entre otros.

Los métodos basados en la transferencia de un electrón detectan la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio en el color del radical cromóforo se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes en la muestra (Huang *et al.*, 2005). La reactividad se basa principalmente en la desprotonación y el potencial de ionización (PI) del compuesto antioxidante, por lo que dependen del pH, en general, los valores del PI disminuyen al aumentar el pH lo que refleja una mayor desprotonación (Prior *et al.*, 2005). Estas reacciones pueden requerir más tiempo para completarse. Entre estos métodos se encuentran: FRAP (Parámetro Antioxidante del Ion Hierro), CUPRAC (Ensayo de reducción del cobre), entre otros.

Aunque los ensayos de ABTS (ácido 2,2'- [3- etil benzotiazolin-6-sulfónico]), y DPPH<sup>•</sup> (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), se clasifican generalmente en la transferencia de un solo electrón, ambos pueden neutralizarse por reducción directa a través de la transferencia de un electrón o a través de transferencia de átomos de hidrógeno (Prior *et al.*, 2005).

El ensayo de ABTS se basa en la capacidad de los antioxidantes para eliminar el anión radical de larga duración ABTS<sup>-•</sup>. En este ensayo, el ABTS es oxidado por radicales peroxilo u otros oxidantes a su catión radical, ABTS<sup>+•</sup>, que se colorea azul intenso, y en el método se mide como la capacidad de los compuestos para disminuir el color reaccionando directamente con el radical ABTS<sup>+•</sup> (Prior *et al.*, 2005). Este radical es generado tras una reacción química con dióxido de manganeso o persulfato de potasio o bien en una reacción enzimática con peroxidasas. El método puede medir la actividad de compuestos de naturaleza lipofílica e hidrofílica. El ABTS presenta espectros de máxima absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm y es efectivo en un amplio rango de pH, la determinación de la capacidad antioxidante por este método se realiza a 734 nm (Kuskoski *et al.*, 2005).

El ensayo de DPPH se basa en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes frente al DPPH<sup>•</sup>, medido por la pérdida del color morado del DPPH a 515 nm (Prior *et al.*, 2005). Este radical puede obtenerse directamente sin una preparación previa y sólo se

disuelve en medios orgánicos como el metanol, acetona, etanol. El DPPH es sensible a algunas bases de Lewis, además, puede haber interferencias en la absorbancia del producto de esta reacción con las absorbancias de los pigmentos antioxidantes de interés, considerando que el pico de máxima absorbancia del DPPH se encuentra a 515 nm (Sagar *et al.*, 2011).

## **2.8 Determinación de la actividad funcional de los antioxidantes con *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico de estudio**

Para actuar en los organismos los compuestos funcionales deben ser absorbidos, transportados, distribuidos y retenidos en los fluidos, células y tejidos. Los métodos de determinación de la actividad implican ensayos a través de la administración de los compuestos funcionales a modelos animales en un régimen de dosificación específico (Oroian y Escriche, 2015).

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un modelo animal ampliamente utilizado en investigación biomédica y toxicológica. Además, ha sido empleado para examinar los efectos benéficos de medicamentos, extractos o compuestos bioactivos contra el estrés oxidante o en estudios de la prolongación de la esperanza de vida. Lo anterior debido a su corto periodo de vida media, su simplicidad morfológica, la facilidad en su mantenimiento y su manipulación genética (Gruber *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013).

*C. elegans* es un nematodo que habita en el suelo, tiene un tamaño pequeño (1 mm de longitud), es transparente durante todas las etapas de desarrollo, con una vida media de 20 días bajo condiciones de laboratorio, en dicha condición los nematodos son predominantemente hermafroditas autofertilizantes (>99%), las poblaciones se mantienen efectivamente isogénicas. Los gusanos se desarrollan a través de cuatro etapas larvianas (L1-L4). La etapa L1 dura alrededor de 16 horas y cada una de las siguientes etapas (L2 a L4) dura 12 horas cada una, 12 horas después de alcanzar L4, los hermafroditas adultos comienzan a producir progenie por un periodo de 2- 3 días (Gruber *et al.*, 2009; Lapierre *et al.*, 2012). Los hermafroditas adultos contienen 959 células somáticas, de las cuales 302 son neuronas; además, se conoce el linaje celular completo, incluidas las células que presentan apoptosis durante el desarrollo. Las cepas pueden conservarse criogénicamente. El genoma de *C. elegans* ha sido completamente secuenciado, se sabe que contiene aproximadamente 18000 genes, muchos de los cuales tienen homólogos en humanos (Gruber *et al.*, 2009).

*C. elegans*, se ha empleado para comprobar el efecto de diferentes compuestos en su vida media, y se han reportado varios compuestos que la han extendido. Sin embargo, para la interpretación de los efectos del compuesto de estudio es importante investigar la vía metabólica o el gen o genes específico(s) que afectan, lo cual puede lograrse empleando genes reporteros, mutantes o cepas knockout. Además, es necesario realizar estudios de dosis-respuesta para poder establecer la concentración en la cual los compuestos o mezclas de compuestos estudiados presentan el máximo efecto (Gruber *et al.*, 2009).

Se ha reportado que el extracto rico en flavonoides de frutos de *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle ha prolongado en un 14.94% el periodo de vida y la resistencia al estrés oxidante por la inducción del sistema de defensa antioxidante, sin causar efectos adversos en las funciones fisiológicas de fertilidad y movilidad en *C. elegans*. El tratamiento con el extracto aumentó la actividad de enzimas antioxidantes endógenas y redujo la acumulación de especies reactivas de oxígeno y el malondialdehído (Chen *et al.*, 2019). Gómez-Linton *et al.* (2021) evaluaron la capacidad de un extracto de semillas de *Bixa Orellana* para modular el periodo de vida, la resistencia al estrés oxidante y los mecanismos implicados en los efectos. De acuerdo con sus resultados, el extracto lipofílico de las semillas aumentó la vida media en un 35% y la vida máxima en un 27% así como la resistencia contra el estrés oxidante inducido con peróxido de hidrógeno y el estrés térmico (35°C) sin afectar la fertilidad. Los efectos del extracto fueron dependiente de la vía señalización de insulina/factor de crecimiento insulina-1.

Guerrero-Rubio *et al.* (2019) estudiaron el efecto del pretratamiento con betalaínas puras (betanina, indicaxantina, indolina-betacianina, feniletilamina-betaxantina) y extractos obtenidos de frutos de las variedades roja y amarilla de *O. ficus indica* en el periodo de vida y la respuesta al estrés oxidante inducido por juglona en *C. elegans*. Los resultados reportados, indicaron que las betalaínas puras mostraron que una concentración de 9.4 µM de indicaxantina disminuyó la expresión de la proteína de choque térmico HSP-16.2, que se expresa en respuesta al estrés térmico o al estrés oxidante. El pretratamiento con 50 µM de esta betaxantina aumentó la vida media de los nematodos en un 32.42%, mientras que la betanina no tuvo ningún efecto respecto al control. Además, Una concentración del 0.5% p/v del extracto de la variedad amarilla de *O. ficus indica* aumentó la vida media del nematodo en un 21.06%, mientras que el extracto de la variedad roja no tuvo ningún efecto significativo. Finalmente, las concentraciones de betalaínas que aumentan el periodo de

vida de *C. elegans* son mucho más bajas que las que requieren otras moléculas antioxidantes como catequina, miricetina, quercetina y kaempferol para incrementarla.

A pesar de que muchos compuestos han sido reportados por tener actividad antioxidante *in vitro*, no es claro si los resultados obtenidos sobre la capacidad antioxidante *in vitro* reflejan fielmente lo que sucede en modelos *in vivo*, pues muchos antioxidantes muestran una limitada actividad antioxidante *in vivo* (Gruber *et al.*,2009; Pun *et al.*, 2010).

### 3. Justificación

Las frutas y hortalizas son fuente de gran cantidad de compuestos funcionales los cuales son de interés para la industrias cosmética, farmacológica y de alimentos, sin embargo, no existen métodos de extracción estándar que garanticen la obtención óptima de los compuestos debido que diferentes factores como la naturaleza de los mismos, la matriz que los contienen, entre otros, que afectan el proceso, por lo que es importante establecer el método de extracción y las condiciones adecuadas que mejoren el proceso.

La pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) y la jiotilla (*Escontria chiotilla*) son frutos endémicos de México que proporcionan además de nutrientes, compuestos tales como betalaínas y compuestos fenólicos. Una alternativa para incrementar el aprovechamiento de estos frutos consiste en la extracción y caracterización de los compuestos funcionales.

Por lo anterior, es importante establecer las condiciones óptimas de extracción de los compuestos funcionales como las betalaínas y compuestos fenólicos de frutos de pitaya de mayo y jiotilla, empleando tecnologías convencionales y no convencionales, además de caracterizar los extractos y evaluar su actividad funcional en un modelo *in vivo*. Por las características de *C. elegans*, se propone este modelo para evaluar el efecto de los extractos de los frutos de jiotilla.

#### 4. Hipótesis

El uso de tecnologías de extracción no convencionales como ultrasonido y microondas aumentará el rendimiento de compuestos funcionales (betalaínas y compuestos fenólicos) de la pitaya de mayo y jiotilla, lo que se reflejará en una mayor capacidad antioxidante *in vitro*.

El tratamiento con extracto de jiotilla mejorará la resistencia del nematodo *Caenorhabditis elegans* sometido a estrés oxidante, estrés térmico y radiación ultravioleta, sin afectar las funciones fisiológicas de fertilidad y de movilidad.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la extracción por tecnologías no convencionales en el contenido de compuestos funcionales y capacidad antioxidante *in vitro* obtenidos de frutos de pitaya de mayo y jiotilla, así como el efecto en la resistencia al estrés en *C. elegans*.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 1.** Realizar la caracterización fisicoquímica de los frutos de pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) y jiotilla (*Escontria chiotilla*).
- 2.** Obtener compuestos funcionales de frutos de pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) y jiotilla (*Escontria chiotilla*) por métodos de extracción convencionales y no convencionales (ultrasonido y/o microondas).
- 3.** Identificar y cuantificar los compuestos funcionales presentes en los frutos de pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) y jiotilla (*Escontria chiotilla*).
- 4.** Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos obtenidos por métodos convencionales y no convencionales de frutos de pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) y jiotilla (*Escontria chiotilla*).
- 5.** Evaluar el efecto del extracto de frutos de jiotilla (*Escontria chiotilla*) en la resistencia a distintos tipos de estrés y funciones fisiológicas como fertilidad y movilidad en el modelo de *C. elegans*.

## 6. Metodología

### 6.1 Material biológico

Los frutos de *Stenocereus pruinosus* y *Escontria chiotilla* fueron recolectados el mes de mayo de 2018 en estado de madurez de consumo, en el municipio de Santiago Chazumba (18° 16' 24" N; 97° 70' 93" W), Oaxaca. Posteriormente, los frutos se desinfectaron con agua clorada a 100 ppm y seleccionaron de acuerdo a la ausencia de defectos físicos y uniformidad en el color. Se formaron tres grupos cada uno con 24 frutos, se retiró la cáscara manualmente y la pulpa se homogenizó. Finalmente, la pulpa con la semilla de cada grupo fue congelada y conservada a -70°C hasta su uso.

### 6.2 Caracterización fisicoquímica de los frutos

#### 6.2.1 Determinación de acidez titulable

La determinación de la acidez titulable del fruto se realizó por valoración con NaOH 0.1N hasta obtener un pH de 8.1-8.3 (Thakur *et al.*, 2006). Para obtener el porcentaje de acidez titulable se utilizó la ecuación:

$$\% \text{ acidez titulable } \left( \frac{\text{g ácido}}{100\text{mL de jugo}} \right) = \frac{V_{\text{NaOH}} * C_{\text{NaOH}} * Eq. \text{ácido predominante} * 100}{V_{\text{jugo}}} \quad (1)$$

Donde;

$V_{\text{NaOH}}$  = Volumen (mL) de NaOH

$C_{\text{NaOH}}$  = Normalidad (meq/mL) de NaOH

$Eq. \text{ácido predominante}$  = Miliequivalentes del ácido cítrico: 0.064 g/meq, miliequivalentes del ácido málico: 0.067 g/meq.

$V_{\text{jugo}}$  = Volumen (mL) del jugo

#### 6.2.2 Determinación de pH

Para las mediciones de pH, se mezcló 1 mL de jugo de fruta con 20 mL de agua destilada y se midió el pH de la mezcla con un potenciómetro (Oakton pH 700, Oakton Instruments P.O. Vernon Hills, IL, USA).

#### 6.2.3 Determinación de sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales (SST) son expresados en °Brix y fueron medidos empleando un refractómetro portátil de mano (RFB-91 ATC). Se aplicó una gota del jugo de la pulpa

sobre el refractómetro y se registró el valor marcado en la escala (Rosas-Benítez *et al.*, 2016).

#### **6.2.4 Determinación de contenido de humedad**

El contenido de humedad se determinó según Bourhia *et al.* (2019); se pesaron 2 g de muestra y se introdujeron en un horno (Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, IL, USA modelo 3608) a 50 °C hasta alcanzar un peso constante. La humedad se calculó como la diferencia del peso inicial del fruto y el peso seco. Se expresó en porcentaje.

### **6.3 Extracción de compuestos funcionales**

#### **6.3.1 Extracción convencional de compuestos fenólicos y betalainas de frutos de pitaya de mayo.**

##### *- Efecto del manejo de la muestra (fresca y liofilizada) y tipo de disolvente*

Con la finalidad de obtener el mayor contenido de los compuestos funcionales presentes en los frutos de pitaya de mayo se evaluó inicialmente la extracción convencional. Se realizaron dos experimentos independientes completamente al azar, en el primer experimento se evaluó el efecto del manejo de la muestra (X: Fresca, liofilizada) y en el segundo experimento se evaluó el efecto del tipo de disolvente (X: metanol 80% (v/v) y etanol 50% (v/v)). Los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos fueron la base para decidir la condición de la muestra y el disolvente a usar para el desarrollo de los ensayos posteriores.

La extracción se realizó siguiendo la metodología propuesta por García-Cruz *et al.*, (2013) con algunas modificaciones, se pesaron 2 g de muestra congelada (pf) se dejaron en agitación con 20 mL de disolvente por 20 min. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 12 096 g durante 10 min, el sobrenadante se recuperó y el pellet fue empleado para una segunda extracción idéntica a la primera. Finalmente, los sobrenadantes se unieron y se aforaron a 50 mL. Los extractos fueron almacenados a -70 °C hasta su análisis.

##### **- Optimización del proceso de extracción convencional en frutos de pitaya de mayo**

Se realizó un experimento empleando el modelo Box- Behnken con tres factores: tiempo de extracción ( $X_1$ : 10, 15, 20 min), relación peso: volumen ( $X_2$ : 1:2.5, 1:6.25, 1:10 p: v), y concentración de etanol ( $X_3$ : 30, 60, 90% (v/v)). La extracción se realizó variando el tiempo de extracción, el volumen y la concentración de disolvente de acuerdo con los niveles de

cada factor correspondiente para cada corrida experimental. Los gramos de muestra congelada, se dejaron en agitación con el disolvente según el tiempo correspondiente. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 12 096 g durante 10 min, el sobrenadante se recuperó y el pellet fue empleado para una segunda extracción idéntica a la primera.

De acuerdo con el modelo y el número de factores se llevaron a cabo 15 corridas experimentales, las cuales se indican a continuación:

Corrida	X <sub>1</sub> Tiempo (min)	X <sub>2</sub> Relación (p:v)	X <sub>3</sub> Etanol (% v/v)
1	10	1:2.5	60
2	20	1:2.5	60
3	10	1:10	60
4	20	1:10	60
5	10	1:6.25	30
6	20	1:6.25	30
7	10	1:6.25	90
8	20	1:6.25	90
9	15	1:2.5	30
10	15	1:10	30
11	15	1:2.5	90
12	15	1:10	90
13	15	1:6.25	60
14	15	1:6.25	60
15	15	1:6.25	60

Debido a que no se había evaluado el efecto del número de extracciones se decidió probar este factor en un experimento adicional empleando extracción convencional.

- **Efecto del número de extracciones:** Una vez obtenidos los niveles óptimos de los factores tiempo de extracción, concentración de disolvente y relación peso: volumen (p:v) se procedió a evaluar por medio de un experimento completamente al azar el efecto del número de extracciones: una, dos y tres.

Se pesó 1 g de muestra congelada y se dejó en agitación con 6.25 mL de etanol 30% (v/v) por 10 minutos. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 12 096 g durante 10 min, el sobrenadante se recuperó. Para los ensayos con dos y tres extracciones, el pellet fue empleado para una segunda y una tercera extracción idéntica a la primera. El sobrenadante se aforó de acuerdo al número de extracciones, a 10 mL cuando solo hubo una y a 25 mL con dos y tres.

Los niveles óptimos obtenidos de todos los factores evaluados en la extracción convencional fueron fijados para los experimentos de la extracción asistida por ultrasonido y asistida con ultrasonido-microondas.

### **6.3.2 Extracción convencional de compuestos fenólicos y betalainas de frutos de jiotilla**

#### **- Efecto del tipo de disolvente y del número de extracciones.**

Con la finalidad de obtener el mayor contenido de los compuestos funcionales presentes en los frutos de jiotilla se evaluó inicialmente la extracción convencional. Se realizaron dos experimentos independientes cada uno con un diseño completamente al azar.

En el primer experimento se comparó el efecto del tipo de solvente (X: metanol 80% (v/v), etanol 50% (v/v), agua). La extracción se realizó siguiendo la metodología propuesta por García-Cruz *et al.*, (2013) con algunas modificaciones, se pesaron 2 g de muestra congelada se dejaron en agitación con 20 mL de disolvente por 20 min. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 12 096 g durante 10 min, el sobrenadante se recuperó y el pellet fue empleado para una segunda extracción idéntica a la primera. Finalmente, los sobrenadantes se unieron y se aforaron a 50 mL. Los extractos fueron almacenados a -70 °C hasta su análisis.

En el segundo experimento se evaluó el efecto del número de extracciones (X: una, dos y tres extracciones). Se pesaron 2 g de muestra y se dejaron en agitación con 20 mL de etanol 50% (v/v) por 10 min. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 12 096 g durante 10 min, el sobrenadante se recuperó y aforó. Para los ensayos con dos y tres extracciones, el pellet fue empleado para una segunda y una tercera extracción idéntica a la primera.

Con los resultados obtenidos se fijaron algunas condiciones experimentales tales como el tipo de disolvente y número de extracciones.

#### **- Efecto del tiempo de extracción, concentración de disolvente y la relación peso: volumen**

Se realizó un experimento factorial  $2^3$  en el que se evaluó el efecto del tiempo de extracción ( $X_1$ : 10, 20 min), concentración de disolvente ( $X_2$ : 30, 60% (v/v)) y relación peso: volumen ( $X_3$ : 1:5, 1:10 p:v). Lo anterior, con la finalidad de identificar los factores estadísticamente significativos y que deberían ser tenidos en cuenta en el experimento de optimización. Para la extracción, los gramos de muestra se dejaron en agitación con el disolvente según el

tiempo correspondiente. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 12096 g durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y el pellet fue empleado para una segunda extracción idéntica a la primera. Para cada corrida experimental se varió el tiempo de extracción, el volumen y la concentración de disolvente de acuerdo con los niveles de cada factor correspondiente.

**- Optimización del proceso de extracción convencional empleando el modelo Diseño Central Compuesto**

Debido a que todos los factores evaluados en el diseño factorial  $2^3$  resultaron ser estadísticamente significativos, se emplearon los datos experimentales y se completó con los tratamientos complementarios para obtener un experimento de optimización múltiple empleando un modelo central compuesto (DCC), este modelo es un factorial  $2^k$  con su origen en el centro, además tiene  $2k$  corridas axiales o puntos estrella con los cuales se generan los términos cuadráticos. Se evaluó el efecto del tiempo de extracción ( $X_1$ : 6.5, 10, 15, 20, 23.4 min), concentración de disolvente ( $X_2$ : 19.8, 30, 45, 60, 70.2% (v/v)) y relación peso: volumen ( $X_3$ : 1:3.3, 1:5, 1:7.5, 1:10, 1:11.7 p: v).

De acuerdo con el modelo y el número de factores se llevaron a cabo 16 corridas experimentales, las cuales se indican a continuación:

Corrida	$X_1$ tiempo (min)	$X_2$ Etanol (% v/v)	$X_3$ Relación (p:v)
1	20	60	1:10
2	15	45	1:7.5
3	6.5	45	1:7.5
4	15	45	1:3.2
5	10	30	1:10
6	15	70	1:7.5
7	20	30	1:5
8	23.4	45	1:7.5
9	20	30	1:10
10	15	45	1:7.5
11	15	20	1:7.5
12	15	45	1:11.7
13	10	30	1:5
14	10	60	1:10
15	20	60	1:5
16	10	60	1:5

### 6.3.3 Extracción no convencional de compuestos fenólicos y betalaínas de frutos de pitaya de mayo y jiotilla.

#### 6.3.3.1 Extracción asistida con ultrasonido

De acuerdo con las ventajas que proporciona este método de extracción, se realizó un experimento con un diseño completamente al azar en el cual se evaluó el tiempo de extracción (X: 1, 3 min) empleando un equipo (SONICS vibra cell TM, 20 kHz, model VCX130PB) manteniendo una amplitud fija (80%) con una frecuencia de 20 kHz.

#### 6.3.3.2 Extracción asistida con ultrasonido-microondas

Para la evaluación de la extracción con ultrasonido-microondas se empleó un equipo CW-2000A (Ultrasonic-Microwave Cooperative 34 Extractor/Reactor). Se realizó un experimento factorial 2<sup>2</sup> de dos factores con dos niveles cada uno, los factores fueron el tiempo de extracción (X<sub>1</sub>: 5, 10 min) y la potencia del equipo (X<sub>2</sub>: 600, 800 W).

## 6.4 Caracterización de los extractos

### 6.4.1 Determinación del contenido de betalaínas

La determinación del contenido de betalaínas se realizó a través de análisis espectrofotométrico, siguiendo la metodología propuesta por Castellanos-Santiago y Yahia (2008). Para esta determinación se tomaron alícuotas del jugo empleado para la caracterización inicial de los frutos o extracto y la absorbancia de las muestras fue leída a 480 y 535 nm. La cuantificación de betaxantinas y betacianinas se evaluaron como equivalentes de indicaxantina y betanina, respectivamente, mediante la ecuación:

$$BC \text{ o } BX \left( \frac{mg}{100 g \text{ pf}} \right) = \frac{A * DF * MW * V}{\epsilon * l * W} * 100 \quad (2)$$

Betalainas= betacianinas + betaxantinas

Donde;

*BC o BX* : Son betacianinas o betaxantinas.

*A*: Es el valor de máxima absorbancia a 483 y 538 nm

*DF*: Es el factor de dilución

*MW* es el peso molecular (indicaxantina: 308 g/mol y betanina: 550g/mol)

$\epsilon$ : Es el coeficiente de extinción molar

indicaxantina: 48,000 Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> y betanina:60,000 Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>

*l*: longitud del paso óptico (1 cm)

*V*: Volumen de solución

*W*: Peso de pulpa

#### **6.4.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales**

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) se realizó empleando la técnica propuesta por Singleton *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Se tomaron 200  $\mu$ L del extracto, se mezclaron con 1000  $\mu$ L de la solución de Folin-Ciocalteu y se incubó durante 1 min la reacción, se adicionaron 800  $\mu$ L de una solución de carbonato de sodio (7.5 % (m/v)), posteriormente, se dejó en la oscuridad durante 90 min y finalmente, se determinó la absorbancia a 765 nm. Se realizó una curva estándar con ácido gálico para la cuantificación (25 a 100  $\mu$ g/mL). El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó como mg de ácido gálico (EAG)/100 g de peso fresco.

#### **6.4.3 Semisíntesis y purificación de betaxantinas**

La semisíntesis de BX se realizó siguiendo la metodología de Castellanos-Santiago y Yahia (2008) con algunas modificaciones. Se sintetizaron la vulgaxantina I y la indicaxantina con el objetivo de utilizarlas para identificar estas BX en el extracto de pulpa de jiotilla. Se mezclaron 10 mg de betanina con 1 mL de hidróxido de amonio (3 N) se agitó en vórtex hasta su completa disolución, se midió la formación de ácido betalámico mediante la absorbancia de la mezcla a 420 nm durante 45 min a temperatura ambiente. Para la semisíntesis de la vulgaxantina I, el ácido betalámico resultante se mezcló con glutamina en una proporción molar de 1:10, respectivamente. Se siguió la absorbancia a 483 nm de 20 a 60 min. El producto de la reacción se concentró utilizando un evaporador rotatorio (BÜCHI R-200, Baño de Calentamiento B-490 y Bomba de Vacío V-100 de BÜCHI) a 30 °C y el residuo sólido se resuspendió en 1 mL de agua. A continuación se purificaron las betaxantinas en una columna de vidrio (1 cm de diámetro interior  $\times$  46 cm de longitud) utilizando 3 g de fase inversa C18 (7 cm de altura). La columna se activó primero eluyendo con 5 volúmenes de metanol, seguido de 5 volúmenes de agua acidificada con ácido trifluoroacético (TFA) concentrado (pH 2). Se añadió el producto de la reacción, la vulgaxantina I, y se eluyó con 2 volúmenes de metanol en la columna. En este paso, se controló el pH del eluyente para asegurarse de que oscilaba entre 6 y 7. Se utilizó el mismo procedimiento para la semisíntesis de indicaxantina, pero utilizando L-prolina como aminoácido.

#### **6.4.4 Identificación de betalaínas y compuestos fenólicos mediante HPLC**

Con la finalidad de caracterizar las betalaínas y compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos de pitaya de mayo y jiotilla, en colaboración con el Laboratorio de

Biomacromoléculas 2 del Instituto de Química de la UNAM se realizó el análisis por HPLC de los extractos obtenidos por extracción convencional.

Para la identificación de betalaínas y compuestos fenólicos de los extractos, se utilizó un equipo de HPLC con una columna Zorbax Eclipse XDB (4.6 mm x 250 mm, 5 µm) y un detector UV/Vis.

El análisis de betalaínas por HPLC se realizó siguiendo la metodología propuesta por García-Cruz *et al.*, (2017) con algunas modificaciones. Las condiciones de la fase móvil fueron A (agua acidificada con 0.1% (v/v) de ácido fórmico) y B (acetonitrilo acidificado con 0.1% (v/v) de ácido fórmico). El gradiente de elución consistió en: 0-10% B (0-25 min), 10-15% B (25-34 min), 15-18% B (34-43 min), 18-50% B (43-60 min), a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. La identificación de BX en los extractos se hizo a 480 nm utilizando la vulgaxantina I, la indicaxantina y la isoindicaxantina obtenidas por síntesis química como estándares, y a 535 nm para la detección de BC, utilizando un estándar comercial de betanina y su isómero la isobetanina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

El análisis de compuestos fenólicos por HPLC se realizó siguiendo la metodología propuesta por Ramirez-Lopez y DeWitt (2014) con algunas modificaciones. Las condiciones de la fase móvil fueron A (agua acidificada con 0.1% (v/v) de ácido fórmico) y B (acetonitrilo acidificado con 0.1% (v/v) de ácido fórmico) con la siguiente elución en gradiente: 8-15% B (0-5 min), 15-60% B (5-45 min), 60% B (45-55 min) y regreso a las condiciones iniciales 8% B (55- 60 min), a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min. La identificación de los compuestos fenólicos de los extractos se realizó a 280 y 370 nm, utilizando como estándares de compuestos fenólicos que han sido reportado en la familia de las cactáceas como el kaempferol, la quercetina, la rutina, la isorhamnetina, la miricetina, la naringenina, la taxifolina, la catequina, la epicatequina y los ácidos fenólicos ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico y ácido gálico (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

#### **6.4.5 Determinación de capacidad antioxidante *in vitro***

La determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* se realizó empleando los métodos de ABTS y DPPH, a continuación se describen cada uno de estos.

#### **6.4.5.1 Capacidad antioxidante por ABTS (ácido 2,2'- [3- etil benzotiazolin-6-sulfónico])**

La evaluación de la capacidad antioxidante empleando el radical ABTS se realizó siguiendo la metodología propuesta por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. La generación del radical ABTS<sup>+</sup> se obtuvo mediante la reacción de persulfato de potasio 2.45 mM con una solución 7 mM de ABTS por 16 h en la oscuridad. Una vez formado el radical se ajustó la absorbancia de la solución a  $0.7 \pm 0.01$  a 734 nm. El ensayo consistió en colocar 100  $\mu$ L de la muestra con 1000  $\mu$ L del radical ABTS<sup>+</sup> dejando reaccionar por 10 min, posteriormente se evaluó el cambio de la absorbancia a 734 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu$ mol equivalentes de Trolox / g pf.

#### **6.4.5.2 Capacidad antioxidante por DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)**

Para la evaluación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH se siguió la metodología reportada por Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución 1mg/mL del radical DPPH. Posteriormente, se ajustó a  $1.1 \pm 0.01$  la absorbancia de la solución con metanol. Para el ensayo se colocaron 50  $\mu$ L de la muestra y 950  $\mu$ L de la solución ajustada de DPPH. Después de 30 min en oscuridad se evaluó el cambio en la absorbancia a 515 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu$ mol equivalentes de Trolox / g pf.

### **6.5 Efecto del extracto de frutos de jiotilla en *C. elegans***

#### **6.5.1 Manipulación y mantenimiento de *C. elegans***

La cepa nativa Bristol N2 del nematodo *C. elegans* se obtuvo del Centro de Genética de Caenorhabditis (CGC, Universidad de Minnesota, Minneapolis, Estados Unidos). Los gusanos se mantuvieron a 20°C en placas de Petri de 35 mm que contenían 3 mL medio sólido de crecimiento de nematodos (NGM), utilizando *E. coli* OP50 inactiva como fuente de alimento. Se utilizaron gusanos sincronizados en todos los ensayos de resistencia a estrés, fertilidad, periodo de vida y movilidad. Treinta gusanos adultos (tercer día de vida, adultos jóvenes), se transfirieron a placas de Petri que contenían NGM y *E. coli* OP50. Los gusanos se retiraron después de 4 h y sólo se dejaron en la placa los huevos sincronizados.

#### **6.5.2 Ensayo de resistencia al estrés oxidante**

El ensayo de resistencia a estrés oxidante se realizó siguiendo la metodología reportada por Gómez-Linton *et al.* (2021) con algunas modificaciones. Veintidós gusanos adultos jóvenes fueron transferidos a placas Petri con NGM, *E. coli* OP50 inactiva y 100  $\mu$ L de tratamiento que corresponde al extracto optimizado y obtenido con metodología

convencional. Se evaluaron cuatro concentraciones del extracto etanólico de jiotilla (0.05, 1, 2 y 3.43 mg de extracto seco/ mL), un control negativo (agua) y una solución de betanina de 300  $\mu$ M (0.17 mg/mL), la concentración de betanina se fijó con base a estudios previos de Guerrero-Rubio *et al.* (2019). Los gusanos se trataron durante 48 h y luego se transfirieron a nuevas placas con NGM y peróxido de hidrógeno 1.5 mM como inductor del estrés oxidante. Los gusanos se mantuvieron a 20°C durante 4 h y a continuación se determinó el número de gusanos muertos. Se realizaron cuatro experimentos independientes para cada tratamiento.

### **6.5.3 Ensayo de resistencia al estrés térmico**

Se transfirieron 22 gusanos adultos jóvenes a placas Petri con NGM, *E. coli* OP50 inactiva y 100  $\mu$ L de tratamiento. Se probaron cuatro concentraciones de extracto etanólico de jiotilla (0.05, 1, 2 y 3.43 mg de extracto seco/mL), un control negativo (agua) y una solución de betanina de 300  $\mu$ M (0.17 mg/mL). Los gusanos se trataron durante 48 h a 20°C y a continuación se sometieron a estrés térmico a 35°C, de acuerdo con la metodología propuesta por Gómez-Linton *et al.* (2021). Los gusanos que permanecieron vivos después de seis h fueron monitoreados cada hora hasta que todos murieron. Se realizaron cuatro experimentos independientes.

### **6.5.4 Ensayo de resistencia al estrés por radiación ultravioleta**

El ensayo se realizó siguiendo la metodología reportada por Gómez-Linton *et al.* (2021) con algunas modificaciones. Veintidós gusanos adultos jóvenes se transfirieron a placas Petri con NGM, *E. coli* OP50 inactiva y 100  $\mu$ L de tratamiento. Se probaron cuatro concentraciones de extracto etanólico de jiotilla (0.05, 1, 2 y 3.43 mg de extracto seco/mL), un control negativo (agua) y una solución de betanina de 300  $\mu$ M (0.17 mg/mL). Los gusanos se trataron durante 48 h a 20°C y luego se sometieron a radiación UV durante 2.9 min (UVC a 254 nm, 100  $\mu$ J/cm<sup>2</sup>) utilizando una cámara de radiación (Crosslinker UVC-500, Hoefer, Massachusetts, EE. UU.). Después del estrés, los nematodos se incubaron a 20°C durante 24 h y, transcurrido este tiempo, se realizó una determinación contando los nematodos que sobrevivieron. Se realizaron cuatro experimentos independientes.

### **6.5.5 Ensayo de fertilidad**

Para el ensayo de fertilidad se colocó un nematodo en cajas Petri que contenían NGM, *E. coli* OP50 inactiva y 100  $\mu$ L de tratamiento. Se probaron las dos concentraciones de extracto etanólico de jiotilla que habían tenido efecto en los ensayos de resistencia a distintos tipos de estrés (2 y 3.43 mg de extracto seco/mL), un control negativo (agua) y una solución de

betanina de 300  $\mu\text{M}$ . Los nematodos se mantuvieron a 20 °C y se transfirieron cada día a cajas nuevas durante los primeros 7 d de la edad adulta. Se contó la progenie producida cuando las larvas alcanzaron la etapa L3.

#### **6.5.6 Ensayo de periodo de vida y toxicidad**

El ensayo de periodo de vida se realizó siguiendo la metodología propuesta por Hong Fang *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Veinticinco gusanos en etapa L4 fueron transferidos a placas de Petri con NGM, *E. coli* OP50 inactiva y 100  $\mu\text{L}$  de tratamiento. Para el experimento se evaluaron tres concentraciones del extracto etanólico de jiotilla (2; 3.43 y 10 mg/mL), un control negativo (agua) y una solución de betanina de 300  $\mu\text{M}$ . Los gusanos se transfirieron diariamente a placas nuevas durante los primeros 6 d y en días alternos hasta terminar el experimento (aproximadamente 30 d totales). La viabilidad de los nematodos se comprobó diariamente y los nematodos se consideraron muertos cuando no se observó prácticamente ninguna reacción a un ligero toque, a continuación se determinó el número de gusanos muertos. Los experimentos se realizaron a 20 °C. Se realizaron cuatro experimentos independientes para cada tratamiento.

#### **6.5.7 Ensayo de movilidad**

El ensayo de movilidad se realizó siguiendo la metodología propuesta por Chen *et al.* (2019) con algunas modificaciones. El ensayo fue similar a los ensayos del periodo de vida, veinticinco gusanos en etapa L4 fueron transferidos a placas de Petri con NGM, *E. coli* OP50 inactiva y 100  $\mu\text{L}$  de tratamiento. Se determinó la movilidad en los días 1, 6, 10, 14, 17 y 22 d. El movimiento se clasificó como "A" (movimiento sinusoidal, simétrico y espontáneo), "B" (movimiento menos suave y descoordinado), o "C" (balanceo sólo de la cabeza o la cola). Los experimentos se realizaron a 20 °C. Se realizaron cuatro experimentos independientes para cada tratamiento.

### **6.6 Análisis estadístico**

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, excepto los ensayos *in vivo*, que se realizaron por cuadruplicado. Los resultados de los análisis fisicoquímicos, la evaluación de los factores en el proceso de extracción y la comparación de los resultados entre los métodos de extracción se presentaron como media  $\pm$  desviación estándar y se analizaron utilizando el software estadístico NCSS 12 (2018) (Kaysville, Utah, EE. UU.) mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con un  $\alpha < 0,05$ . El análisis de datos para la optimización se realizó con el programa estadístico R (R Core Team, 2020), y el paquete 'desirability'

(Kuhn, 2016). Para el análisis en el nematodo *C. elegans* se realizó una prueba t utilizando Prism, Graphpad 5.1 Software (Inc., San Diego, CA, USA) con un  $\alpha < 0,05$ .

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización físicoquímica de los frutos de pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*) y jiotilla (*Escontria chiotilla*)

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de la caracterización físicoquímica de los frutos de pitaya de mayo y jiotilla provenientes del Estado de Oaxaca. De acuerdo con los resultados la pitaya de mayo tiene un mayor pH y porcentaje de humedad en comparación con la jiotilla, mientras que, la pitaya de mayo tiene un menor porcentaje de contenido de sólidos solubles totales y acidez titulable que la jiotilla. Los parámetros físicoquímicos obtenidos para los frutos de jiotilla se encuentran entre los valores reportados para frutos de la misma especie proveniente del estado de Puebla (Sandate-Flores *et al.*, 2020). Mientras que para el caso de pitaya de mayo todos los valores son ligeramente inferiores a los reportados en frutos de la misma especie variedades roja y naranja originarias de Puebla, los investigadores reportaron un rango de sólidos solubles totales entre 9-11, una acidez titulable entre 0.14-0.17% y un pH entre 5.7- 5.8 (García-Cruz *et al.*, 2016).

El contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante *in vitro* de los frutos de jiotilla y pitaya de mayo se presentan en el Cuadro 5. Se observó que tanto la pitaya de mayo como la jiotilla tienen mayor contenido de betaxantinas respecto a las betacianinas. Resultados similares han sido reportados anteriormente por Soriano-Santos *et al.* (2007), quienes determinaron que el jugo de jiotilla del Estado de Oaxaca presentó 60% de contenido de betaxantinas y 40% de betacianinas. Además, como se observa en el Cuadro 5, el contenido de todos los compuestos funcionales, así como la capacidad antioxidante resultó ser mayor en los frutos de jiotilla en comparación con la pitaya de mayo debido a su mayor contenido de compuestos antioxidantes. El contenido de betalaínas totales y compuestos fenólicos totales en ambas especies fue mayor al reportado en frutos de *Stenocereus stellatus* variedades blanca, morada y naranja del Estado de Oaxaca (Cervantes Arista *et al.*, 2020).

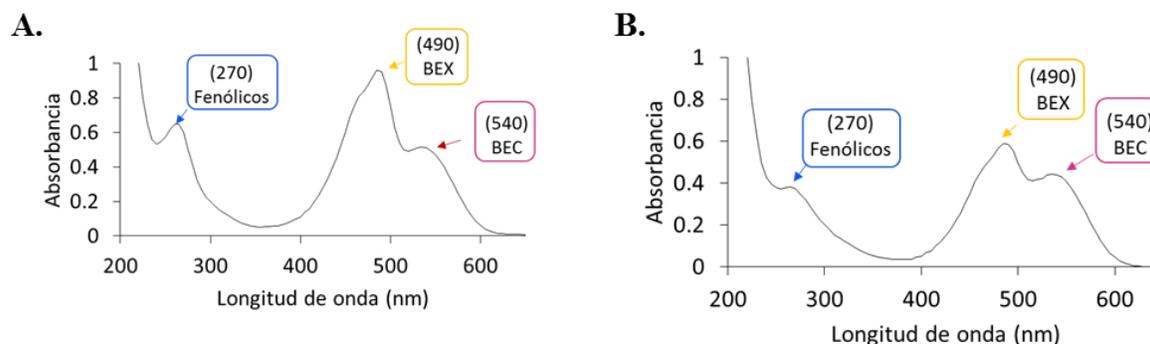
**Cuadro 5.** Caracterización físico-química de los frutos de pitaya de mayo y jiotilla.

	Pitaya de mayo	Jiotilla
pH	5.02 ± 0.03	3.86 ± 0.04
°Brix	8.03± 0.15	13.83 ± 0.29
% Acidez titulable	0.08 ± 0.002	0.58 ± 0.007
%Humedad	85.9 ± 0.01	79.8 ± 0.01
Betacianinas [mg betanina/ 100 g pf]	7.00 ± 0.26	20.72 ± 1.24
Betaxantinas [mg indicaxantina/ 100 g pf]	14.67 ± 0.27	25.44 ± 1.46
Betalaínas totales [mg /100 g pf]	21.68 ± 0.48	46.17 ± 2.69
Compuestos fenólicos totales [mg EAG/100 g pf]	19.05 ± 1.58	41.97 ± 1.94
Capacidad antioxidante (ABTS) [μmol equivalente Trolox / g pf]	1.06 ± 0.05	5.42 ± 0.45
Capacidad antioxidante (DPPH) [μmol equivalente Trolox / g pf]	0.016 ± 0.001	0.211 ± 0.025

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

Además, para identificar la presencia de los compuestos de interés, se obtuvieron los barridos espectrales del jugo de los frutos de pitaya de mayo y jiotilla (Fig. 4). En los barridos espectrales de ambos frutos se identificaron tres picos de máxima absorbancia, el primero en la región ultravioleta a 270 nm, el segundo a 490 nm y el tercero a 535 nm, de acuerdo con la literatura corresponden a compuestos fenólicos (270nm), betaxantinas (490nm) y betacianinas (540nm), respectivamente (Ajila *et al.*, 2011; Herbach *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Barrido espectral de: **A)** pitaya de mayo (*Stenocercus pruinosus*) y **B)** jiotilla (*Escontria chiotilla*). Longitudes de onda analizadas 200- 650 nm.

A continuación se presentan primero los resultados de los experimentos realizados para la evaluación de los métodos de extracción de betalaínas y compuestos fenólicos de pitaya de mayo y subsecuentemente los de jiotilla.

## 7.2 Evaluación de los métodos de extracción en la obtención de compuestos funcionales de pitaya de mayo (*Stenocercus pruinosus*)

### Evaluación del proceso de extracción convencional.

En la primera etapa se evaluó el proceso de extracción convencional en la obtención de los compuestos funcionales de pitaya de mayo.

#### -Efecto del estado de la materia prima: pulpa fresca y liofilizada de frutos de pitaya de mayo

La comparación de los resultados del proceso de extracción a partir de pulpa de pitaya fresca y liofilizada (Cuadro 6) mostró que el extracto con la muestra fresca presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos. Lo anterior pudo deberse a que se observó que la pulpa fresca del fruto tiene un tamaño de partículas pequeño que facilitó el contacto con el disolvente y la extracción de los compuestos funcionales; por el contrario, la pulpa liofilizada presentaba aglomerados producidos por la pérdida del agua y un contenido concentrado de azúcares en la matriz que dificultan el proceso de extracción. Por lo tanto, en experimentos posteriores de extracción se continuó empleando pulpa fresca de pitaya de mayo.

**Cuadro 6.** Contenido de betalainas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de pulpa fresca y liofilizada de frutos de pitaya de mayo.

	<b>Pulpa Fresca</b>	<b>Pulpa Liofilizada</b>
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	17.43 ± 1.88 <sup>a</sup>	17.48 ± 1.94 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	27.47 ± 1.49 <sup>a</sup>	27.12 ± 4.35 <sup>a</sup>
Betalainas [mg /100 g pf]	44.91 ± 3.35 <sup>a</sup>	44.60 ± 6.38 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	<b>73.47 ± 1.21 <sup>a</sup></b>	63.31 ± 2.14 <sup>b</sup>
Capacidad antioxidante (ABTS) [µmol equivalente Trolox / g pf]	3.48 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.04 ± 0.12 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [µmol equivalente Trolox /g pf]	2.24 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.13 <sup>b</sup>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

#### **- Efecto del tipo de disolvente en la extracción de compuestos funcionales de frutos de pitaya de mayo**

Al comparar el efecto del tipo de disolvente (Cuadro 7), se observó que la extracción con etanol 50 % (v/v) presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos que correlacionó con el incremento de la capacidad antioxidante. Por otra parte, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el contenido de betaxantinas y betalainas totales entre los extractos obtenidos con las soluciones de metanol 80% (v/v), etanol 50% (v/v) y agua. El contenido de betacianinas y betaxantinas, así como la capacidad antioxidante fueron mayores a las reportadas en la literatura en otros frutos de cactáceas como *Myrtillocactu geometrizans* de Guanajuato, México (Herrera-Hernández *et al.*, 2011). De acuerdo con los reportes de la literatura la extracción de los compuestos fenólicos y las betalainas se ve mejorada con soluciones acuosas y se disminuye su rendimiento al emplear solventes

puros como el etanol, lo anterior debido a la polaridad de los solventes y la afinidad de esta con la polaridad de los compuestos (de Souza *et al.*, 2015).

**Cuadro 7.** Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en extractos de pitaya de mayo. Efecto del tipo de disolvente metanol 80% (v/v) y etanol 50% (v/v) y agua.

	<b>Metanol 80% (v/v)</b>	<b>Etanol 50% (v/v)</b>	<b>Agua</b>
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	20.23 ± 1.92 <sup>ab</sup>	19.21 ± 1.20 <sup>b</sup>	23.12 ± 1.24 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	32.35 ± 2.09 <sup>a</sup>	29.39 ± 3.30 <sup>a</sup>	29.68 ± 1.36 <sup>a</sup>
Betalaínas [mg /100 g pf]	52.58 ± 3.7 <sup>a</sup>	48.61 ± 3.98 <sup>a</sup>	52.79 ± 2.25 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	58.23 ± 4.3 <sup>b</sup>	<b>70.61 ± 3.39<sup>a</sup></b>	55.38 ± 3.38 <sup>b</sup>
Capacidad antioxidante (ABTS) [μmol equivalente Trolox / g pf]	2.22 ± 0.16 <sup>c</sup>	<b>3.75 ± 0.07<sup>a</sup></b>	3.33 ± 0.18 <sup>b</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [μmol equivalente Trolox /g pf]	0.64 ± 0.09 <sup>c</sup>	<b>2.49 ± 0.36<sup>a</sup></b>	1.27 ± 0.14 <sup>b</sup>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

**- Optimización. Metodología de superficie de respuesta, diseño Box Benhken para la extracción de compuestos funcionales de frutos de pitaya de mayo**

Los resultados del contenido de betalaínas, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante de extractos de frutos de pitaya de mayo de los 15 tratamientos del diseño Box Benhken de superficie de respuesta se presentan en el Cuadro 8.

**Cuadro 8.** Método de superficie de respuesta (RSM) y resultados de BX, BC, BET, CFT y capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH.

Tratamiento	X <sub>1</sub> tiempo (min)	X <sub>2</sub> Ratio (m:v)	X <sub>3</sub> EtOH (% v/v)	BX	BC	BET	CFT	Capacidad antioxidante	
								ABTS	DPPH
1	10	1:2.5	60	36.60	17.42	54.02	46.87	3.44	1.39
2	20	1:2.5	60	35.59	17.45	53.04	50.22	4.019	1.36
3	10	1:10	60	38.58	17.33	55.91	60.69	3.60	0.99
4	20	1:10	60	41.69	17.87	59.57	56.39	3.212	1.06
5	10	1:6.25	30	37.46	19.16	56.62	59.48	5.51	1.30
6	20	1:6.25	30	40.01	20.35	60.36	59.62	5.13	1.29
7	10	1:6.25	90	37.42	14.74	52.56	53.49	4.36	1.19
8	20	1:6.25	90	37.92	16.62	54.54	51.59	3.67	1.24
9	15	1:2.5	30	37.50	19.28	56.78	51.89	4.11	1.10
10	15	1:10	30	40.14	20.37	60.50	61.64	3.61	0.65
11	15	1:2.5	90	32.48	14.78	47.26	41.24	3.59	1.13
12	15	1:10	90	33.59	12.71	43.80	45.89	2.94	0.46
13	15	1:6.25	60	36.53	15.97	52.49	50.69	3.95	1.52
14	15	1:6.25	60	39.79	20.28	60.07	57.49	5.14	1.53
15	15	1:6.25	60	39.78	19.88	59.67	56.43	4.85	1.58

BX:mg indicaxantina / 100 g pf

BC: mg betanina/ 100 g pf

BET: mg / 100 g pf

CFT: mg EAG/ 100 g pf

ABTS:  $\mu$ mol equivalente Trolox /g pf

DPPH:  $\mu$ mol equivalente Trolox /g pf

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

Los modelos estadísticos obtenidos para los contenidos de las betalaínas, betaxantinas, betacianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se presentan en el Cuadro 9. Los modelos presentaron coeficientes de determinación con valores de 0.76, 0.71, 0.79, 0.88, 0.76 y 0.85 respectivamente. Lo que significa que los modelos explican entre un 71 y 88% a las variables respuesta estudiadas.

**Cuadro 9.** Modelos matemáticos para la optimización de la extracción convencional de betalaínas, betaxantinas, betacianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en frutos de pitaya de mayo.

<b>Variable respuesta</b>	<b>Modelo</b>	<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>
Betacianinas	$Y=57.41+1.05X_1+1.08X_2-4.51X_3+1.16X_1X_2-0.44X_1X_3-1.79X_2X_3+1.08X_1^2-2.86X_2^2-2.47X_3^2$	0.76
Betaxantinas	$Y=39.22+0.64X_1+1.47X_2-1.71X_3+1.03X_1X_2-1.49X_2^2-1.41X_3^2$	0.71
Betalaínas	$Y=18.63-0.08X_2-2.54X_3-0.79X_2X_3-1.06X_2^2-0.85X_3^2$	0.79
Compuestos fenólicos	$Y = 54.87-0.34X_1+4.29X_2-5.05X_3 -1.91X_1X_2-+2.36X_1^2-3.52X_2^2$	0.88
Capacidad antioxidante (ABTS)	$Y= 4.65-0.11X_1-0.22X_2-0.48X_3-0.24X_1X_2-1.09X_2^2$	0.76
Capacidad antioxidante (DPPH)	$Y=1.54+0.01X_1-0.23X_2-0.04X_3+ 0.02X_1X_2+0.02X_1X_3-0.05X_2X_3+0.04X_1^2-0.38X_2^2-0.32X_3^2$	0.85

### **Optimización múltiple en la extracción de compuestos funcionales en frutos de pitaya de mayo**

Una vez obtenidos los modelos para cada una de las variables respuesta (betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante) se realizó un proceso de optimización múltiple. El punto óptimo para la extracción del mayor contenido tanto de compuestos funcionales como de capacidad antioxidante se obtuvo con dos extracciones seguidas, cada una con un tiempo de 10 min, con etanol 30% (v/v) y con una relación 1:6.25 m: v. A continuación se presentan los valores teóricos y experimentales en las condiciones óptimas. Como se observa en el Cuadro 10, el punto óptimo obtenido mediante la optimización múltiple se verificó de forma experimental, resultando en valores teóricos que quedan en el rango de los valores experimentales.

**Cuadro 10.** Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en las condiciones óptimas del proceso de extracción convencional en frutos de pitaya de mayo.

	<b>Valores teóricos</b>	<b>Valores experimentales</b>
Betacianinas	19.86	20.27 ± 1.45
[mg betanina/100 g pf]		
Betaxantinas	39.76	39.09 ± 2.22
[mg indicaxantina/100 g pf]		
Betalaínas	59.38	59.46 ± 3.47
[mg /100 g pf]		
Compuestos fenólicos	60.01	58.54 ± 1.70
[mg EAG/100 g pf]		
Capacidad antioxidante (ABTS)	5.05	4.52 ± 0.42
[μmol equivalente Trolox / g pf]		
Capacidad antioxidante (DPPH)	1.47	1.93 ± 0.18
[μmol equivalente Trolox /g pf]		

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

### **Efecto del número de extracciones.**

Los resultados del efecto del número de extracciones se presentan en el Cuadro 11. De acuerdo con los resultados, se confirmó que dos etapas de extracción consecutivas permiten obtener 15.21% más del contenido de betacianinas ( $19.85 \pm 0.99$  mg betanina/100 g pf), 13.85% más de betalaínas ( $56.96 \pm 3.54$  mg/100 g pf), 19.99% más de compuestos fenólicos ( $60.97 \pm 4.74$  mg EAG/100 g pf) y capacidad antioxidante  $5.95 \pm 0.24$   $\mu$ mol equivalente Trolox /g pf y  $2.61 \pm 0.08$   $\mu$ mol equivalente Trolox /g pf por ABTS y DPPH respectivamente. Por otro lado, no hubo diferencia estadísticamente significativa en el contenido de betacianinas, betaxantina, betalaínas y compuestos fenólicos al incrementar a tres el número de extracciones.

Estos resultados podrían sugerir que durante la primera etapa de extracción pudo haberse saturado el disolvente y la renovación de este en la segunda etapa permitió obtener la totalidad de los betalaínas y compuestos fenólicos que estaban disponibles para ser extraídos en las condiciones de temperatura ambiente en la que se llevó a cabo el proceso. Realizar una triple extracción no condujo a mejorar resultados y por el contrario si incrementó el consumo de energía y disolvente, por lo que emplear dos etapas de extracción convencional consecutivas resultó ser el número adecuado para favorecer la transferencia de masa, garantizar la extracción de los compuestos funcionales y hacer el mejor uso de recursos energéticos y reactivos.

**Cuadro 11.** Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en extractos de pitaya de mayo obtenidos con extracción convencional, evaluación del efecto del número de extracciones.

	UNA	DOS	TRES
	EXTRACCIÓN	EXTRACCIONES	EXTRACCIONES
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	17.23 ± 0.62 <sup>b</sup>	<b>19.85 ± 0.99<sup>a</sup></b>	19.78 ± 0.82 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	32.81 ± 2.04 <sup>a</sup>	37.10 ± 2.79 <sup>a</sup>	36.17 ± 2.08 <sup>a</sup>
Betalaínas [mg /100 g pf]	50.03 ± 1.98 <sup>b</sup>	<b>56.96 ± 3.54<sup>a</sup></b>	<b>55.95 ± 3.12<sup>ab</sup></b>
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	50.81 ± 2.48 <sup>b</sup>	<b>60.97 ± 4.74<sup>a</sup></b>	<b>57.64 ± 2.06<sup>ab</sup></b>
Capacidad antioxidante (ABTS) [μmol equivalente Trolox / g pf]	5.65 ± 0.51 <sup>a</sup>	<b>5.95 ± 0.24<sup>a</sup></b>	3.55 ± 0.31 <sup>b</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [μmol equivalente Trolox /g pf]	2.16 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.61 ± 0.08 <sup>b</sup>	<b>3.04 ± 0.31<sup>a</sup></b>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

## **Evaluación del proceso de extracción no convencional en pitaya de mayo.**

### **- Extracción asistida con ultrasonido en sonda de compuestos funcionales de frutos de pitaya de mayo**

En la extracción asistida con ultrasonido mediante la aplicación continua de sonicación con sonotrodo, se realizó un único experimento con un diseño completamente al azar variando un único factor: el tiempo de extracción (1 y 3 min, en los que los extractos alcanzaron temperaturas finales de 37 y 47°C, respectivamente). De acuerdo con los resultados (Cuadro 12), se obtuvo 13.50% mayor contenido de compuestos fenólicos por efecto del ultrasonido, mientras que esta tecnología de extracción no mejoró el contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas ni la capacidad antioxidante de los extractos. El incremento de la temperatura en combinación con el proceso de cavitación producido por la sonicación con sonotrodo contribuyó a romper la membrana mejorando la extracción de los compuestos fenólicos. Además, las temperaturas alcanzadas no afectaron la extracción de compuestos termolábiles como las betalaínas.

Los resultados obtenidos para todas las variables respuesta son similares a los reportados por García-Cruz *et al.* (2016), quienes realizaron un proceso de extracción consecutiva con sonicación en baño y con maceración/ agitación, con metanol 80% como disolvente. En sus resultados determinaron un contenido de compuestos fenólicos de  $53.6 \pm 6.9$  y  $42.2 \pm 6.9$  mg EAG / 100 g pf en pitaya de mayo roja y naranja; un contenido total de betalaínas de  $55.9 \pm 6.5$  y  $42.4 \pm 4.8$  mg/ 100 g pf y actividad antioxidante por ABTS de  $4.9 \pm 0.28$  y  $3.46 \pm 0.47$   $\mu$ mol equivalente Trolox / g pf para los frutos de pitaya roja y naranja, respectivamente. Así, mismo se ha reportado los compuestos fenólicos son compuestos termoestables, su estabilidad puede diferir en relación con su concentración, estructura química, localización en la célula, estado de oxidación e interacción con otros componentes de la matriz, así como el tratamiento térmico aplicado (Van Boekel *et al.*, 2010)

**Cuadro 12.** Contenido de compuestos funcionales y capacidad antioxidante mediante extracción asistida por ultrasonido con sonda en frutos de pitaya de mayo.

	<b>Sin ultrasonido</b>	<b>1 minuto</b> UE sonda <b>(37°C)</b>	<b>3 minutos</b> UE sonda <b>(47°C)</b>
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	20.16 ± 2.39 <sup>a</sup>	19.81 ± 1.49 <sup>a</sup>	18.09 ± 0.96 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	39.72 ± 2.68 <sup>a</sup>	40.68 ± 2.97 <sup>a</sup>	39.76 ± 1.77 <sup>a</sup>
Betalaínas [mg /100 g pf]	59.88 ± 4.89 <sup>a</sup>	60.49 ± 4.39 <sup>a</sup>	57.86 ± 2.69 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	54.98 ± 2.69 <sup>b</sup>	<b>63.56 ± 1.28<sup>a</sup></b>	58.54 ± 4.52 <sup>ab</sup>
Capacidad antioxidante (ABTS) [µmol equivalente Trolox / g pf]	5.31 ± 0.09 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.58 <sup>a</sup>	6.08 ± 0.21 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [µmol equivalente Trolox /g pf]	1.81 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.14 <sup>a</sup>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

### **- Extracción asistida con ultrasonido-microondas de compuestos funcionales en frutos de pitaya de mayo**

Para la evaluación de la extracción asistida con ultrasonido-microondas, se realizó un diseño factorial  $2^2$  en el que se evaluó el efecto de los factores: tiempo de extracción y potencia del equipo. Como se puede observar en el Cuadro 13, hubo efecto de la potencia y el tiempo de exposición en la extracción de los compuestos funcionales y la capacidad antioxidante. El tratamiento con 600 W por 5 min presentó el mayor contenido de los compuestos funcionales y de capacidad antioxidante; sin embargo, el incremento en el tiempo y la potencia del equipo afectaron la extracción de las betalaínas, los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante.

Se ha reportado que el incremento en el contenido de betalaínas y compuestos fenólicos con la extracción asistida por microondas puede ser explicado debido a que el agua presente en la muestra y expuesta al microondas absorbe la energía que el equipo emite y subsecuentemente se convierte en calor, provocando la evaporación del agua la cual genera una presión en el interior que conlleva a la ruptura celular, facilitando la lixiviación de los compuestos activos en el disolvente circundante y mejorando el rendimiento de la extracción (Ballard *et al.*, 2010). Sin embargo, Barbero *et al.*, 2006 reportaron que el incremento en el tiempo de extracción con microondas puede provocar la degradación de algunos compuestos. En particular algunos disolventes como etanol, agua y metanol pueden calentarse en tiempos prolongados de exposición afectando los compuestos termolábiles como las betalaínas y los ácidos orgánicos. La disminución en el contenido de las betaxantinas, las betalaínas, los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante observada en los extractos de la pitaya de mayo sometidos a un mayor tiempo y potencia del microondas pudo deberse a un calentamiento del etanol 30 % (v/v) lo que indujo la degradación de estos compuestos.

**Cuadro 13.** Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en frutos de pitaya de mayo obtenidos por extracción asistida con ultrasonido- microondas.

	600W, 5min	600W, 10min	800W, 5 min	800W, 10 min
Betacianinas	22.19 ± 0.80 <sup>a</sup>	21.28 ± 1.84 <sup>a</sup>	20.69 ± 1.64 <sup>a</sup>	19.47 ± 1.01 <sup>a</sup>
[mg betanina/100 g pf]				
Betaxantinas	44.12 ± 2.47 <sup>a</sup>	42.29 ± 3.01 <sup>ab</sup>	38.20 ± 0.85 <sup>b</sup>	38.64 ± 3.41 <sup>b</sup>
[mg indicaxantina/100 g pf]				
Betalaínas	66.32 ± 3.19 <sup>a</sup>	63.57 ± 1.81 <sup>ab</sup>	58.89 ± 1.24 <sup>ab</sup>	58.12 ± 4.43 <sup>b</sup>
[mg /100 g pf]				
Compuestos fenólicos	65.76 ± 4.74 <sup>a</sup>	63.40 ± 3.26 <sup>ab</sup>	57.28 ± 2.74 <sup>b</sup>	56.24 ± 2.14 <sup>b</sup>
[mg EAG/100 g pf]				
Capacidad antioxidante (ABTS)	3.79 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.74 ± 0.017 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.15 <sup>b</sup>	3.33 ± 0.24 <sup>b</sup>
[µmol equivalente Trolox / g pf]				

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

### Comparación de los procesos de extracción convencional, extracción asistida con ultrasonido y extracción con ultrasonido/microondas en la obtención de compuestos funcionales de frutos de pitaya de mayo

Se realizó la comparación de los procesos de extracción convencional, extracción asistida con ultrasonido y extracción con ultrasonido/microondas con las mejores condiciones obtenidas para cada uno de estos métodos (Cuadro 14). Los resultados mostraron que la aplicación de ultrasonido (UAE) y ultrasonido-microondas (UMAE) no logró mejorar la extracción de las betalaínas ni de los compuestos fenólicos, por el contrario, la extracción con UMAE disminuyó la capacidad antioxidante, probablemente debido a la degradación de algunos compuestos funcionales con actividad antioxidante.

**Cuadro 14.** Comparación del contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en los procesos de extracción convencional, extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por ultrasonido/microondas en frutos de pitaya de mayo.

	Convencional (10 min, doble extracción)	Ultrasonido (1 min. 20 kHz)	Ultrasonido/ microondas (600W.5min)
Betacianinas [mg betanina/ 100 g pf]	19.85 ± 0.99 <sup>a</sup>	19.81 ± 1.49 <sup>a</sup>	22.19 ± 0.80 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	37.10 ± 2.79 <sup>a</sup>	40.68 ± 2.97 <sup>a</sup>	44.12 ± 2.47 <sup>a</sup>
Betalaínas [mg /100 g pf]	56.96 ± 3.54 <sup>a</sup>	60.49 ± 4.39 <sup>a</sup>	66.32 ± 3.19 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	60.97 ± 4.74 <sup>a</sup>	63.56 ± 1.28 <sup>a</sup>	65.76 ± 4.74 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (ABTS) [µmol equivalente Trolox / g pf]	5.95 ± 0.24 <sup>a</sup>	5.85 ± 0.58 <sup>a</sup>	3.79 ± 0.12 <sup>b</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [µmol equivalente Trolox / g pf]	2.61 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.16 <sup>b</sup>	

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

De acuerdo con los resultados obtenidos, el mejor método de extracción de las betalainas y los compuestos fenólicos de frutos de pitaya de mayo fue la extracción convencional (dos etapas de extracción, cada una con una relación m:v 1:6.25, tiempo de 10 min y concentración de solvente 30% (v/v), esto debido a que es un método de fácil acceso, equipo sencillo, bajo consumo de disolvente que además permite obtener el mayor contenido de los compuestos funcionales, sin afectar la capacidad antioxidante.

### **7.3 Evaluación de los métodos de extracción en la obtención de compuestos funcionales de jiotilla**

#### **Evaluación del proceso de extracción convencional**

##### **- Efecto del tipo de disolvente en la extracción de compuestos funcionales en frutos de jiotilla**

En el Cuadro 15 se presenta el contenido de betacianinas, bexantinas, betalainas, compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de jiotilla obtenidos con metanol 80% (v/v), etanol 50% (v/v) y agua. Como se observa, hay un mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en el extracto con etanol 50 %v/v. El aumento en la extracción de los compuestos fenólicos incrementó la capacidad antioxidante *in vitro*. El contenido de betacianinas y betaxantinas obtenido fue mayor al reportado previamente en frutos de jiotilla procedentes de otra localidad del estado de Oaxaca (Soriano-Santos *et al.*, 2007). Así mismo, la cantidad de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante fue mayor que el reportado por Albano *et al.* en 2015 en frutos de *O. ficus indica* morada y amarilla.

**Cuadro 15.** Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en extractos de jiotilla obtenidos por extracción convencional con metanol 80% (v/v), etanol 50% (v/v) y agua.

	Metanol 80 % (v/v)	Etanol 50 % (v/v)	Agua
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	39.44 ± 1.79 <sup>a</sup>	38.55 ± 1.44 <sup>a</sup>	38.28 ± 0.88 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	52.49 ± 0.78 <sup>a</sup>	49.24 ± 1.58 <sup>ab</sup>	48.96 ± 1.61 <sup>b</sup>
Betalaínas totales [mg /100 g gf]	91.93 ± 2.41 <sup>a</sup>	87.79 ± 2.99 <sup>a</sup>	87.23 ± 2.23 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos totales [mg EAG/100 g pf]	142.32 ± 13.83 <sup>b</sup>	<b>172.58 ± 3.76 <sup>a</sup></b>	120.07 ± 0.62 <sup>c</sup>
Capacidad antioxidante (ABTS) [µmol equivalente Trolox / g pf]	8.91 ± 0.49 <sup>b</sup>	<b>10.94 ± 0.35 <sup>a</sup></b>	7.05 ± 0.77 <sup>c</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [µmol equivalente Trolox / g pf]	6.42 ± 0.39 <sup>b</sup>	<b>8.14 ± 0.25 <sup>a</sup></b>	2.97 ± 0.24 <sup>c</sup>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

#### - Efecto del número de extracciones en compuestos funcionales en frutos de jiotilla

En el Cuadro 16 se muestran los resultados obtenidos del efecto del número de extracciones una, dos o tres consecutivas de 20 min cada una. Empleando etanol 50% (v/v) con una relación 1:10 p: v. Los resultados son similares a los observado en frutos de pitaya, con dos etapas consecutivas de extracción se obtuvo el 15.73% y 27.98% más de betalaínas y compuestos fenólicos totales, así como un incremento en 29.98% y 17.12% en la capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH, respectivamente. Mientras que, con tres extracciones consecutivas, no se observó un incremento estadísticamente significativo en el contenido de compuestos funcionales ni en la actividad antioxidante y sería mayor el tiempo empleado y el gasto de disolvente, por lo que se seleccionó la doble extracción para experimentos posteriores.

**Cuadro 16.** Contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en extractos de jiotilla obtenidos con extracción convencional, evaluación del efecto del número de extracciones.

	<b>Una</b>	<b>Dos</b>	<b>Tres</b>
	<b>extracción</b>	<b>extracciones</b>	<b>extracciones</b>
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	31.75 ± 1.07 <sup>a</sup>	<b>38.15 ± 3.7<sup>a</sup></b>	37.23 ± 2.016 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	41.35 ± 1.91 <sup>b</sup>	<b>48.59 ± 0.27<sup>a</sup></b>	47.61 ± 1.51 <sup>a</sup>
Betalaínas totales [mg /100 g gf]	73.10 ± 2.59 <sup>b</sup>	<b>86.75 ± 4.05<sup>a</sup></b>	84.84 ± 1.43 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos totales [mg EAG/100 g pf]	109.42 ± 5.09 <sup>b</sup>	<b>151.94 ± 10.47<sup>a</sup></b>	160.86 ± 10.70 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (ABTS) [μmol equivalente Trolox / g pf]	7.03 ± 0.56 <sup>b</sup>	<b>10.04 ± 0.56<sup>a</sup></b>	10.43 ± 1.00 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [μmol equivalente Trolox / g pf]	4.89 ± 0.50 <sup>b</sup>	<b>5.94 ± 0.35<sup>a</sup></b>	5.61 ± 0.31 <sup>ab</sup>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

#### **- Optimización. Metodología de superficie de respuesta, Diseño Central Compuesto en la extracción de compuestos funcionales en frutos de jiotilla**

Con los resultados anteriores se fijaron algunas condiciones experimentales tales como el número de extracciones (dos), el tipo de disolvente (etanol 50% (v/v)) y luego de haber realizado un experimento factorial 2<sup>3</sup> en el que todos los factores resultaron ser estadísticamente significativos, se procedió a completar el experimento factorial con puntos centrales y axiales, obteniendo así un experimento de optimización de tipo central compuesto (DCC). Los resultados de los 16 tratamientos se presentan en el Cuadro 17. Se observa que el incremento en el tiempo de extracción (X<sub>1</sub>) y en la relación p:v, (X<sub>2</sub>) mejoran la extracción de los compuestos funcionales y la capacidad antioxidante.

**Cuadro 17.** Método de superficie de respuesta (RSM) y resultados de BX, BC, BET, CFT y capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH.

Tto	X <sub>1</sub> tiempo (min)	X <sub>2</sub> EtOH (% v/v)	X <sub>3</sub> Relación (p:v)	BX	BC	BET	CFT	Capacidad antioxidante	
								ABTS	DPPH
1	40	60	1:20	51.91	41.05	92.96	124.27	6.95	5.01
2	30	45	1:16	48.80	37.14	85.94	106.89	5.90	4.79
3	13.2	45	1:16	48.55	38.82	87.36	103.13	6.22	4.23
4	30	45	1:6	44.08	32.87	76.95	95.49	5.95	3.82
5	20	30	1:20	52.97	42.85	95.82	120.60	7.42	4.82
6	30	70	1:16	49.75	38.37	88.13	119.29	5.01	5.43
7	40	30	1:10	45.59	35.56	81.15	103.58	5.70	3.92
8	46.8	45	1:16	49.89	39.47	89.36	130.25	8.83	4.83
9	40	30	1:20	52.09	41.64	93.73	125.03	7.11	5.03
10	30	45	1:16	48.10	38.67	86.77	115.96	6.50	5.03
11	30	20	1:16	48.99	38.48	87.48	104.97	7.79	4.24
12	30	45	1:24	50.04	39.61	89.65	116.49	6.75	5.76
13	20	30	1:10	43.98	33.14	77.11	100.62	5.30	3.48
14	20	60	1:20	51.00	39.18	90.18	122.11	7.40	3.69
15	40	60	1:10	40.60	35.36	75.96	108.88	5.58	4.24
16	20	60	1:10	42.28	31.17	73.45	100.80	5.47	3.77

BX:mg indicaxantina / 100 g pf

BC: mg betanina/ 100 g pf

BET: mg / 100 g pf

CFT: mg EAG/ 100 g pf

ABTS:  $\mu$ mol equivalente Trolox /g pf

DPPH:  $\mu$ mol equivalente Trolox /g pf

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

En el Cuadro 18 se muestran los modelos obtenidos para las variables respuesta, además, se presentan los coeficientes de determinación de las betalainas ( $R^2=0.74$ ), betaxantinas ( $R^2=0.61$ ), betacianinas ( $R^2=0.74$ ), compuestos fenólicos ( $R^2=0.51$ ) y los modelos de los métodos empleados para determinación de la capacidad antioxidante ABTS ( $R^2=0.39$ ) y DPPH ( $R^2=0.65$ ).

**Cuadro 18.** Modelos matemáticos para la optimización de la extracción convencional de betalaínas, betaxantinas, betacianinas, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante en frutos de jiotilla.

Variable respuesta	Modelo	Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>
Betacianinas	$Y=38.09+0.68X_1-0.55X_2+3.26X_3+0.61X_1X_2-0.74X_1X_3-0.26X_2X_3+0.44X_1^2+0.08X_2^2-1.02X_3^2$	0.74
Betaxantinas	$Y=48.87+0.15X_1-0.65X_2+3.67X_3-0.19X_1X_2+0.01X_1X_3+0.57X_2X_3-0.04X_1^2+0.04X_2^2-1.12X_3^2$	0.61
Betalaínas	$Y=86.96+0.84X_1-1.19X_2+6.92X_3+0.42X_1X_3^2-0.73X_1X_3+0.3X_2X_3+0.4X_1^2-2.23X_3^2$	0.74
Compuestos fenólicos	$Y=110.81+4.67X_1+2.21X_2+8.99X_3+0.36X_1X_2-0.56X_1X_3+3.27X_1^2+0.97X_2^2-2.21X_3^2$	0.51
Capacidad antioxidante (ABTS)	$Y=6.47+0.29X_1-0.34X_2+0.66X_3-0.06X_1X_2-0.16X_1X_3-0.03X_2X_3+0.39X_1^2-0.17X_2^2-0.19X_3^2$	0.39
Capacidad antioxidante (DPPH)	$Y=5.06+0.27X_1+0.09X_2+0.49X_3+0.14X_1X_2-0.22X_2X_3-0.34X_1^2-0.19X_2^2-0.21X_3^2$	0.65

### Optimización múltiple en la extracción de compuestos funcionales en frutos de jiotilla

Después de obtener los mejores modelos matemáticos para cada variable respuesta, se realizó un proceso de optimización múltiple con el objetivo de encontrar las condiciones en el que se optimicen todas las variables de respuesta. Se determinó que las condiciones óptimas de extracción convencional consistían en un proceso de 20 minutos, con etanol al 37.5% (v/v) y una relación 1:10 p: v. En estas condiciones se calcularon los valores teóricos y se corroboraron con los valores experimentales, resultando en un valor similar. Se obtuvo un contenido de BC(40.34 ± 0.69 mg betanina /100 g pf), BX(50.21 ± 0.44 mg indicaxantina/ 100 g pf), BET (90.97 ± 0.88 mg / 100 g pf), compuestos fenólicos totales (129.12 ± 14.21

mg EAG/ 100 g pf) y de capacidad antioxidante *in vitro* por ABTS ( $8.42 \pm 0.74$   $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox/ g pf) y DPPH ( $6.33 \pm 0.42$   $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox/ g pf) (Cuadro 19).

El contenido de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales obtenidas en este trabajo en los frutos de jiotilla fue mayor a lo reportado en distintos trabajos con frutos de *O. ficus-indica*. En 2012 y 2013 Maran y Manikandan optimizaron el proceso de extracción de betacianinas y betaxantinas de frutos de *Opuntia ficus-indica* procedentes de la India, estos investigadores obtuvieron 13.44 mg/ 100 g peso fresco de betacianinas y 24.29 mg/ 100 g peso fresco de betaxantinas (Prakash Maran, Manikandan y Mekala, 2013).

**Cuadro 19.** Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en condiciones óptimas del proceso de extracción convencional en frutos de jiotilla.

	Valores teóricos	Valores experimentales
Betacianinas	40.82	$40.34 \pm 0.69$
[mg betanina/100 g pf]		
Betaxantinas	51.69	$50.21 \pm 0.44$
[mg indicaxantina/100 g pf]		
Betalaínas	92.52	$90.97 \pm 0.88$
[mg /100 g pf]		
Compuestos fenólicos	$124.33 \pm 0.88$	$129.12 \pm 14.21$
[mg EAG/100 g pf]		
Capacidad antioxidante (ABTS)	7.63	$8.42 \pm 0.74$
[ $\mu\text{mol}$ equivalente Trolox / g pf]		
Capacidad antioxidante (DPPH)	5.30	$6.33 \pm 0.42$
[ $\mu\text{mol}$ equivalente Trolox /g pf]		

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

## **Evaluación del proceso de extracción no convencional en la obtención de compuestos funcionales en frutos de jiotilla**

### **- Extracción asistida por ultrasonido en la obtención de compuestos funcionales en frutos de jiotilla**

Los factores optimizados en el proceso de extracción convencional se fijaron para evaluar el efecto de la extracción asistida por ultrasonido. Esta extracción no convencional se realizó mediante la aplicación continua de sonicación con sonotrodo, sin control con baño de frío de la temperatura, evaluando el efecto del tiempo de extracción (1 y 3 minutos). De acuerdo con los resultados (Cuadro 20), se observó un incremento en 50.11% el contenido de compuestos fenólicos totales respecto a la extracción sin sonicación, además, este aumento correlacionó con un incremento la capacidad antioxidante en los extractos por efecto de la aplicación de ultrasonido. El extracto con mayor contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se obtuvo con el tratamiento de tres minutos de ultrasonido.

El contenido de compuestos fenólicos obtenidos fue similar al reportado en frutos de la misma especie originarios del estado de Puebla (Sandate-Flores *et al.*, 2020). Mientras que, el contenido de betalaínas obtenido en este estudio fue mayor al reportado en frutos de *Stenocereus pruinosus* amarilla ( $42.46 \pm 4.84$  mg/ 100 g pf) y *Stenocereus pruinosus* roja ( $55.9 \pm 6.5$  mg/ 100 g pf) obtenidos mediante una extracción consecutiva de maceración con agitación y baño de ultrasonido (García-Cruz *et al.*, 2016). La temperatura alcanzada al final del proceso de sonicación contribuyó a mejorar la extracción de los compuestos fenólicos y no afectó la estabilidad de compuestos termolábiles como las betalaínas.

**Cuadro 20.** Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en extractos de frutos de jiotilla obtenidos con ultrasonido.

	Sin ultrasonido	1 minuto UE sonda (37°C)	3 minutos UE sonda (47°C)
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	31.53 ± 1.93 <sup>a</sup>	31.86 ± 2.52 <sup>a</sup>	32.02 ± 1.074 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	38.55 ± 2.86 <sup>a</sup>	40.36 ± 3.04 <sup>a</sup>	42.00 ± 3.70 <sup>a</sup>
Betalaínas [mg /100 g pf]	70.08 ± 4.77 <sup>a</sup>	72.23 ± 5.52 <sup>a</sup>	74.02 ± 6.02 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	97.62 ± 15.24 <sup>b</sup>	113.80 ± 35.60 <sup>b</sup>	<b>195.67 ± 17.28<sup>a</sup></b>
Capacidad antioxidante (ABTS) [μmol equivalente Trolox / g pf]	6.63 ± 0.38 <sup>b</sup>	8.04 ± 1.22 <sup>b</sup>	<b>11.33 ± 0.82<sup>a</sup></b>
Capacidad antioxidante (DPPH) [μmol equivalente Trolox /g pf]	3.24 ± 0.46 <sup>b</sup>	3.65 ± 0.68 <sup>b</sup>	<b>5.20 ± 0.39<sup>a</sup></b>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

**- Extracción asistida por ultrasonido/ microondas en la obtención de compuestos funcionales de frutos de jiotilla.**

Para la evaluación de la extracción asistida por ultrasonido- microondas se empleó etanol 37.5%, con una relación 1:10 m: v. En el Cuadro 21 se presentan los resultados del experimento factorial 2<sup>2</sup> (dos factores con dos niveles cada uno), los factores considerados fueron la potencia del equipo (600 W y 800 W) y tiempo de extracción (5 min y 10 min). De acuerdo con los resultados no existe diferencia estadísticamente significativa en el contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales y compuestos fenólicos totales entre los tratamientos evaluados.

Por otra parte, la capacidad antioxidante *in vitro* determinada por el método de ABTS, mostró un decremento en el tratamiento con 600 W por 10 min ( $5.22 \pm 0.54$   $\mu$ mol equivalente Trolox / g pf). De acuerdo con Roriz *et al.* (2017) el tiempo es uno de los factores más importantes en la extracción asistida por microondas considerando que si la muestra es expuesta un menor tiempo del requerido puede no extraerse los compuestos, por el contrario la sobreexposición puede inducir la degradación de los compuestos de interés, además, se conoce que el tiempo correlaciona con la potencia del equipo afectando positiva o negativamente el proceso de extracción, comprometiendo así las variables respuestas (contenido de compuestos funcionales).

De manera similar se ha reportado que la extracción de betalaínas de la cáscara de frutos de la pitahaya disminuyó con tiempos de tratamiento mayores a 8 min con una potencia de 100W a 35°C (Thirugnanasambandham y Sivakumar, 2017). Chung-hung *et al.* (2011), indicaron que el uso de altas potencias pueden conducir a una baja extracción por la degradación de los componentes termosensibles, lo que podría sugerir que las condiciones de extracción ensayadas 600W y 800W de potencia del microondas y 5 y 10 min de tiempo de exposición de los extractos de los frutos de jiotilla probadas en este trabajo, podrían estar afectando la estabilidad de los compuestos funcionales y con ello la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos.

**Cuadro 21.** Contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en frutos de jiotilla obtenidos por extracción asistida con ultrasonido- microondas

	600W, 5min	600W, 10min	800W, 5 min	800W, 10 min
Betacianinas [mg betanina/100 g pf]	33.33 ± 0.77 <sup>a</sup>	32.82 ± 0.11 <sup>a</sup>	31.39 ± 0.32 <sup>a</sup>	32.22 ± 1.56 <sup>a</sup>
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	44.14 ± 0.49 <sup>a</sup>	42.42 ± 1.17 <sup>a</sup>	41.82 ± 0.01 <sup>a</sup>	41.81 ± 1.11 <sup>a</sup>
Betalaínas [mg /100 g pf]	77.47 ± 1.26 <sup>a</sup>	75.24 ± 1.20 <sup>a</sup>	73.21 ± 0.33 <sup>a</sup>	74.03 ± 2.68 <sup>a</sup>
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	111.44 ± 3.58 <sup>a</sup>	108.65 ± 1.99 <sup>a</sup>	101.09 ± 8.63 <sup>a</sup>	105.26 ± 6.08 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (ABTS) [μmol equivalente Trolox / g pf]	6.74 ± 0.15 <sup>a</sup>	5.22 ± 0.54 <sup>b</sup>	6.47 ± 0.27 <sup>ab</sup>	6.81 ± 0.36 <sup>a</sup>
Capacidad antioxidante (DPPH) [μmol equivalente Trolox /g pf]	2.84 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.07 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.93 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.08 ± 0.08 <sup>a</sup>

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

### **Comparación de los procesos de extracción convencional y no convencional de compuestos funcionales de frutos de jiotilla**

Parte del objetivo del presente proyecto fue comparar el contenido de los compuestos funcionales y la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante tecnología de extracción convencional y no convencional. Por lo anterior, en el siguiente cuadro se presentan los resultados de las mejores condiciones encontradas en cada uno de los procesos.

Como se observa en el Cuadro 22, el extracto obtenido con el método convencional presentó un contenido significativamente mayor de betacianinas ( $40.34 \pm 0.69$  mg betanina/100 g peso fresco), betaxantinas ( $50.21 \pm 0.44$  mg indicaxantina /100 g peso fresco) y betalaínas ( $90.97 \pm 0.88$  mg /100 g peso fresco). Mientras que la aplicación del ultrasonido incrementó el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* en el extracto de jiotilla.

**Cuadro 22.** Comparación del contenido de betacianinas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de jiotilla en los procesos de extracción convencional, extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por ultrasonido/microondas.

	Convencional (20 min, doble extracción)	Ultrasonido (3 min. 20 kHz)	Ultrasonido/ microondas (600W.5min)
Betacianinas [mg betanina/ 100 g pf]	$40.34 \pm 0.69^a$	$32.02 \pm 2.31^b$	$32.23 \pm 1.99^b$
Betaxantinas [mg indicaxantina/100 g pf]	$50.22 \pm 0.44^a$	$42.00 \pm 3.71^b$	$43.14 \pm 1.77^b$
Betalaínas [mg /100 g pf]	$90.56 \pm 0.88^a$	$74.02 \pm 6.01^b$	$75.36 \pm 3.75^b$
Compuestos fenólicos [mg EAG/100 g pf]	$129.12 \pm 14.21^b$	$195.67 \pm 17.28^a$	$109.35 \pm 4.42^b$
Capacidad antioxidante (ABTS) [μmol equivalente Trolox / g pf]	$8.42 \pm 0.74^b$	$11.33 \pm 0.82^a$	$7.52 \pm 1.20^b$
Capacidad antioxidante (DPPH) [μmol equivalente Trolox / g pf]	$6.34 \pm 0.42$	$5.20 \pm 0.39$	$3.28 \pm 0.39$

pf: Peso fresco

EAG: Equivalentes de ácido gálico

#### **7.4 Identificación por HPLC de betalaínas presentes en los extractos de frutos de pitaya de mayo y jiotilla**

La identificación de las betalaínas por HPLC se realizó comparando los tiempos de retención (tr) de un estándar comercial de betanina (Anexo 4) y de las BX semisintetizadas (vulgaxantina I, indicaxantina e isoindicaxantina; Anexo 5).

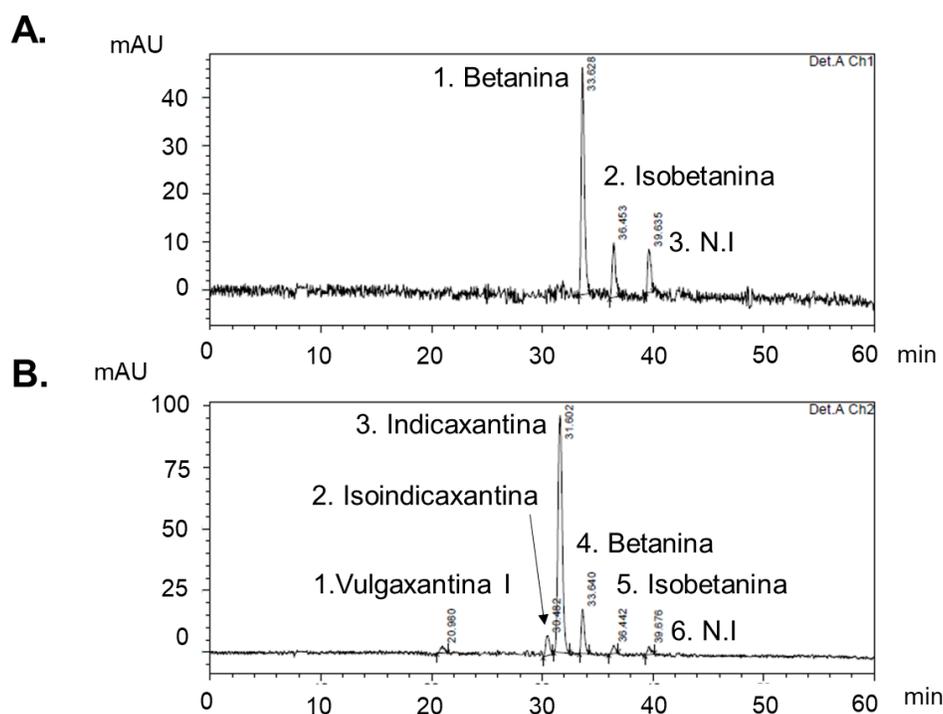
De acuerdo con los cromatogramas obtenidos del estándar de betanina e isobetanina (Anexo 4), ambas betacianinas absorben a las longitudes de onda 535 nm (Anexo 5 A) y 480 nm (Anexo 5 B). La betanina e isobetanina presentaron en ambas longitudes de onda tiempos de retención de 34.27 y 37.04 min, respectivamente.

Como fue descrito en la sección 6.4.4 se sintetizó en el laboratorio las betaxantinas: indicaxantina, isoindicaxantina y vulgaxantina I debido que estas han sido identificadas en diferentes frutos de cactáceas como *O. ficus-indica* (Cejudo-Bastante *et al.*, 2014), *O. dillenii* (Ker Gawl) Haw (Betancourt *et al.*, 2017), *S. stellatus*, y *S. pruinosus* (García-Cruz *et al.*, 2017). Con los cromatogramas obtenidos (Anexo 5) a 480 nm para Isoindicaxantina e indicaxantina (Anexo 5A) y vulgaxantina I (Anexo 5B) se obtuvieron los tiempos de retención 31.82, 32.95 y 22.56 minutos respectivamente y estos tiempos de retención son similares a los reportados en la literatura.

Para la identificación de BC del extracto de pitaya de mayo obtenido de forma convencional (maceración con agitación) (Figura 5A) se obtuvo el cromatograma a 535 nm, el cual mostró tres picos que corresponden: el primero a betanina (tr: 33.63 min), el segundo a isobetanina (tr: 36.45 min) y el tercero no fue identificado, siendo la betanina la BC mayoritaria en el extracto con un porcentaje de área de 69.06%, mientras que la isobetanina corresponde a un 17.41% del total de picos. La betanina y su isómero la isobetanina son las betacianinas más abundantes en frutos de diferentes cactáceas como *O. ficus indica* (Cejudo-Bastante *et al.*, 2014) y *O. joconostle* (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2013).

Por otro lado, en el análisis de BX, el cromatograma a 480 nm del extracto de pitaya de mayo obtenido de forma convencional (maceración con agitación) (Figura 5B) presentó seis picos de los cuales, el primero corresponde a vulgaxantina I (tr: 20.98 min), el segundo a

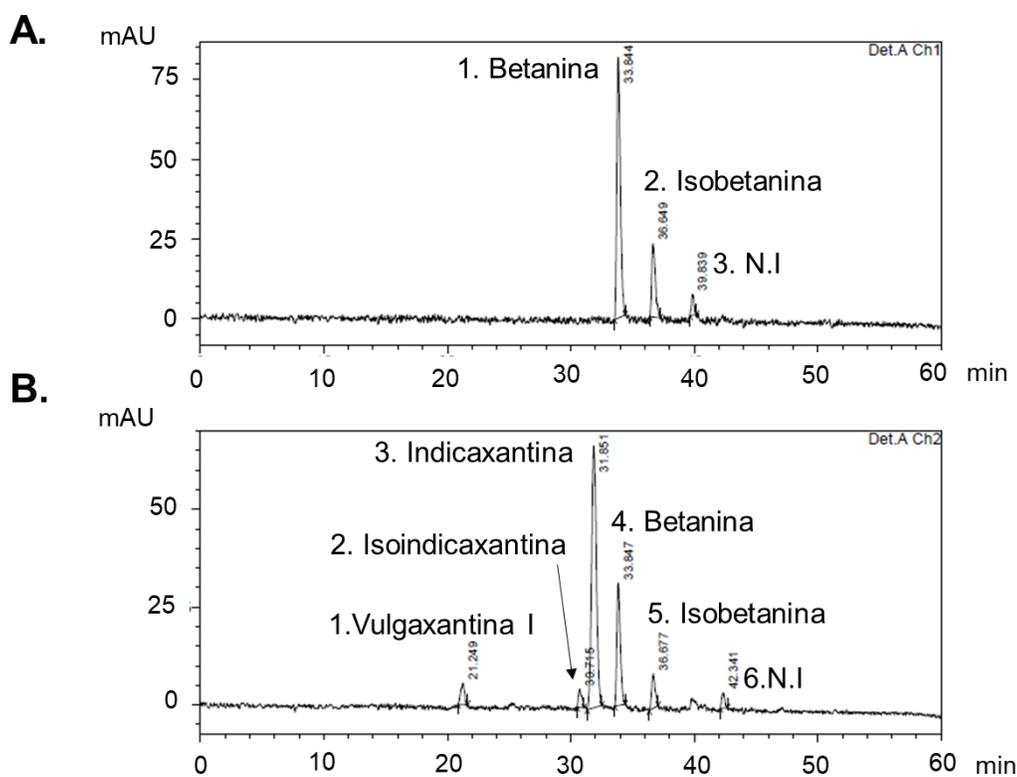
isoindicaxantina (tr: 30.48 min), el tercero a indicaxantina (tr: 31.60 min), los picos cuatro y cinco corresponden a betanina e isobetanina que como se mencionó previamente absorben en ambas longitudes de onda, el pico seis no pudo ser identificado. La betaxantina mayoritaria fue la indicaxantina con 77.46% del total del área, seguida de la isoindicaxantina (5.78 % del área) y la vulgaxantina I (2.08 % del área). En frutos de pitaya de mayo del estado de Puebla se ha identificado a la indicaxantina e isoindicaxantina, siendo la indicaxantina la betaxantina mayoritaria con un porcentaje entre 93.54% - 94.75% en variedades rojas y naranja, respectivamente (García-Cruz *et al.*, 2017). En extractos de frutos de *O. ficus indica* de coloración roja de origen Italiano la indicaxantina y la vulgaxantina correspondieron al 85.59% del total de betaxantinas (Koss-Mikołajczyk *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Perfil de betalainas de HPLC del extracto de pitaya de mayo [1 mg/mL]. A)  $\lambda=535$  nm y B) 480 nm. N.I: Compuesto no identificado

El análisis de BC del extracto de jiotilla obtenido de forma convencional (maceración con agitación), mostró tres señales (Figura 6A) que corresponden a betanina (tr: 33.84 min), isobetanina (tr: 36.65 min) y un tercer compuesto no identificado. El área porcentual de los picos 1, 2 y 3 fue del 73.91%, 21.68% y 4.39%, respectivamente. Por otro lado, el análisis

de BX a 480 nm (figura 6B) mostró seis señales correspondientes a vulgaxantina I (tr: 21.25 min), isoindicaxantina (tr: 30.72 min) e indicaxantina (tr: 31.85 min). Las señales cuarta y quinta corresponden a betanina e isobetanina, mientras que la última pertenece a un compuesto no identificado. La indicaxantina fue la principal BX en el extracto etanólico de jiotilla, con un 63.07% del área total, seguido de la vulgaxantina I y la isoindicaxantina, que representaron el 3.91% y el 3.13% del área, respectivamente. El área restante correspondió a la betanina (21.54%) y a la isobetanina (6.02%). El orden de elución de la BX vulgaxantina I e indicaxantina corresponde al reportado previamente para el extracto etanólico de jiotilla procedente del estado de otra localidad de Oaxaca por Soriano-Santo *et al.* (2007). También se ha identificado isoindicaxantina en extractos metanólicos de *S. pruinosus* y *S. stellatus* (García-Cruz *et al.*, 2017).

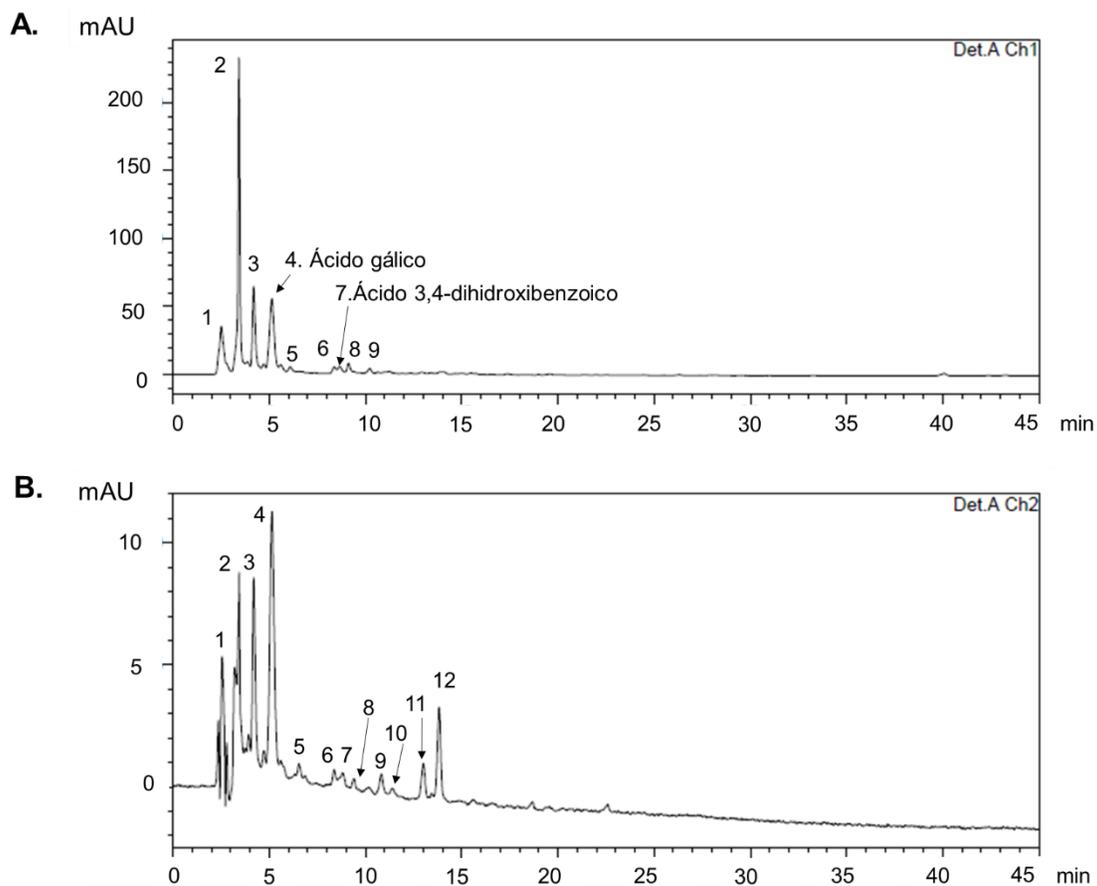


**Figura 6.** Perfil de betalinas por HPLC del extracto de jiotilla [1 mg/mL]. A)  $\lambda=535$  nm y B) 480 nm. N.I.: Compuesto no identificado

## 7.5 Identificación y cuantificación por HPLC de compuestos fenólicos presentes en los extractos de frutos de pitaya de mayo y jiotilla

La identificación de los compuestos fenólicos de los extractos obtenido de forma convencional (maceración con agitación) de pitaya y jiotilla por HPLC se realizó comparando los tiempos de retención (tr) de los estándares comerciales de algunos de los compuestos fenólicos que han sido reportados en frutos de cactáceas tales como el ácido trans-ferúlico, naringenina, isoramnetina 3-rutinósido, kaempferol, taxifolina, isoramnetina, miricetina, rutina, quercetina, ácido *p* cumárico ácido cafeico, ácido gálico, catequina, eqpicatequina y ácido 3,4-dihidroxibenzoico (Anexo 5).

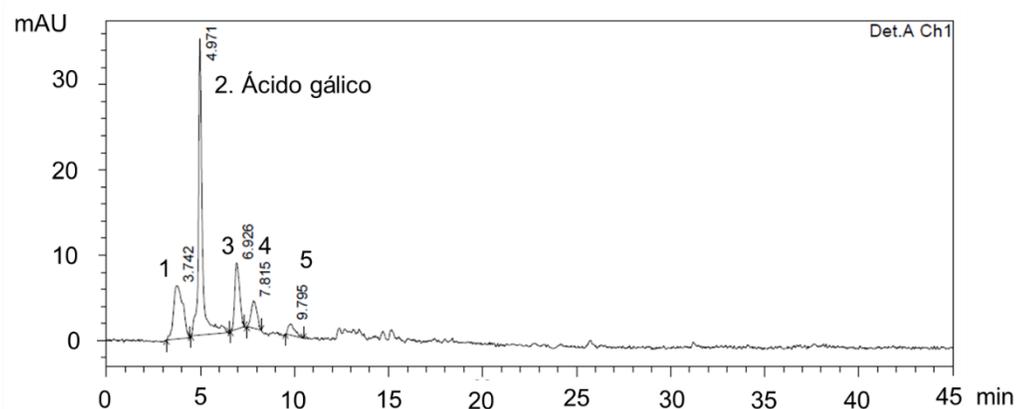
El análisis por HPLC del extracto convencional de pitaya de mayo 10 mg/mL presentó a 280 nm (Figura 7A) nueve picos, el pico 4 podría corresponder al ácido gálico (tr: 5.13 min) que representó el 21.16% del área total y el pico 7 al ácido 3,4-dihidroxibenzoico (tr: 8.65 min) que correspondió al 0.90% del área total, los picos restantes no fueron identificados. El cromatograma a 370 nm (Figura 7B) presentó 12 picos de los cuales ninguno correspondió a los estándares que se analizaron. El ácido gálico ha sido reportado en extractos de frutos de *S. thurberi* (Castro-Enríquez *et al.*, 2020) y en diferentes especies de *Myrtillocactus* (Guzmán-Maldonado *et al.*, 2010). El ácido gálico y el ácido 3,4-hidroxibenzoico también han sido reportados en frutos de *O. robusta* y *O. ficus-barbarica* (Kivrak *et al.*, 2018).



**Figura 7.** Perfil de compuestos fenólicos por HPLC del extracto de pitaya de mayo [10 mg/mL]. A.  $\lambda=280$  nm. B.  $\lambda=370$  nm.

El análisis por HPLC de los compuestos fenólicos del extracto convencional de jiotilla (Figura 8) mostró la presencia de cinco picos. El pico principal se identificó como ácido gálico (tr: 4.97 min), que representaba el 51.53% del área. Los picos restantes no pudieron identificarse y requerirían más estudios metabolómicos para ser caracterizados. Los picos podrían corresponder probablemente a compuestos fenólicos glicosilados, cumarinas, saponinas, alcaloides, ácidos orgánicos y azúcares solubles reportados en frutos de otras cactáceas (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2020). Sandate-Flores *et al.* (2020) identificaron ácido gálico y ácido cafeico en frutos de jiotilla de la región de los Valles Centrales de Oaxaca, en su estudio, se determinó que el contenido de ácido gálico fue el más alto, con  $1.02 \pm 0.01$  mg/100 g pf, mientras que el contenido del ácido cafeico fue de  $0.08 \pm 0.00$  mg/100 g pf. Esta concentración tan baja de ácido cafeico podría explicar por qué el ácido cafeico no pudo detectarse en este trabajo, en las condiciones aplicadas. Explicaciones posibles para la no detección del ácido cafeico son que probablemente no estaba en forma libre o que las

condiciones ambientales en las que se cultivaron los frutos de jiotilla en este estudio variaron la composición de los compuestos funcionales. Se ha reportado que las condiciones ambientales de los cultivos afectan la composición de los compuestos funcionales en los frutos (Gondim de Albuquerque *et al.*, 2021; Villa-Hernández *et al.*, 2017). El cromatograma a 370 nm no presentó picos, la intensidad de las absorbancias fue tan baja que interfieren con la línea base (cromatograma no presentado), debido que a la concentración inyectada del extracto no fue suficiente para detectar compuestos a esta longitud de onda.



**Figura 8.** Perfil de compuestos fenólicos por HPLC del extracto de jiotilla [1 mg/mL] a  $\lambda=280$  nm.

De acuerdo con los resultados obtenidos hasta el momento la jiotilla presentó 50, 66.7y 54.54% más de betacianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante *in vitro*, además, el análisis por HPLC mostró que el perfil cromatográfico de betalainas es similar en ambos frutos, siendo mayor el área bajo la curva de cada uno de los picos de los pigmentos en los extractos de jiotilla. El análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos permitió observar mayor área bajo la curva de los picos presentes en los extractos de jiotilla, aunado a lo anterior, hasta el momento no se han realizado estudios del efecto en modelo *in vivo* de extractos de frutos de jiotilla el cual por el alto contenido de betalainas podría ser una gran alternativa como fuente de estos pigmentos. Por lo anterior, se decidió emplear solo el extracto de jiotilla para evaluar su efecto en el modelo de *C. elegans*. A continuación se presentan los resultados del efecto del extracto de jiotilla en la resistencia al estrés oxidante, al estrés térmico y al estrés por radiación ultravioleta, así como los ensayos en el periodo de vida, fertilidad y movilidad.

## **7.6 Ensayos de actividad funcional del extracto de jiotilla en el nematodo de *C. elegans***

El nematodo *C. elegans* se ha convertido en un modelo experimental importante para evaluar la actividad funcional de extractos naturales, los cuales se ha reportado que aumentan la resistencia del nematodo a diferentes tipos de estrés (Lucanic *et al.*, 2013; Camboim Rockett *et al.*, 2020; Gómez-Linton *et al.*, 2021 a y b). La extensión de la vida media se ha asociado con el incremento a la resistencia al estrés (Lithgow y Walker, 2002; Guha *et al.*, 2013), debido a estos antecedentes, se procedió a evaluar el efecto del extracto de jiotilla obtenido convencionalmente por maceración con agitación sobre la resistencia de *C. elegans* al estrés oxidante, estrés con radiación ultravioleta y estrés térmico. Para los ensayos *in vivo* se decidió evaluar el efecto del extracto de jiotilla considerando que de acuerdo con los resultados obtenidos este fruto podría ser una fuente alternativa de betalaínas y compuestos.

### **7.6.1 Efecto del extracto de jiotilla en la resistencia de *C. elegans* al estrés oxidante**

El estrés oxidante se indujo en *C. elegans* mediante la exposición a peróxido de hidrógeno [1.5 mM] un compuesto precursor de radicales libres. Los resultados del ensayo mostraron que el tratamiento con 2 mg/mL de extracto etanólico de jiotilla aumentó la supervivencia de los nematodos en un 99% frente al estrés oxidante, en comparación con el control, mientras que el resto de tratamientos (0.05, 1 y 3.43 mg/mL de extracto) no mostraron un efecto significativo (Figura 9A). El incremento de supervivencia de *C. elegans* tratado con 2 mg/mL del extracto etanólico de jiotilla al estrés oxidante pudo deberse a que esta concentración permite alcanzar dianas tisulares específicas y mejorar la resistencia. Es importante considerar que los resultados pueden estar influenciado por el tipo de especie reactiva de oxígeno y la tasa de exposición al estrés (Martorell *et al.*, 2020)

Por otra parte, el tratamiento con el estándar de betanina comercial no tuvo efectos significativos de protección en comparación con el control sin betalaínas (Figura 9A). Estos resultados concuerdan con informes anteriores en los que la betanina no tuvo ningún efecto protector sobre los nematodos sometidos a estrés con el compuesto oxidante juglona, una naftoquinona que induce estrés oxidante formando el anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Leyva *et al.*, 2017; Guerrero-Rubio *et al.*, 2020).

### **7.6.2 Efecto del extracto de jiotilla en la resistencia de *C. elegans* con radiación ultravioleta**

A continuación, se probó el efecto del extracto de jiotilla en la resistencia de *C. elegans* a la radiación ultravioleta. El tratamiento con el extracto etanólico de jiotilla no tuvo efecto estadísticamente significativo respecto al control sobre la resistencia de *C. elegans* a la radiación UV (Figura 9B). Estos resultados son similares a los reportados por Guha y colaboradores (2013). De acuerdo con su investigación, el extracto de arándano no incrementó la resistencia al estrés con radiación UV. Estos resultados sugieren que la betanina, isobetanina, indicaxantina, isoindicaxantina y ácido gálico y/o la concentración de estos en el extracto podrían tener un menor efecto en la reducción de los efectos de fotoenvejecimiento (Guha *et al.*, 2013).

### **7.6.3 Efecto del extracto de jiotilla en la resistencia de *C. elegans* al estrés térmico**

El extracto de jiotilla a una concentración de 3.43 mg/ mL mostró un efecto protector frente al estrés térmico a 35°C en *C. elegans*, mientras que el resto de tratamientos (0.05, 1,2 mg/mL del extracto y 300 µM de betanina) no mostraron una diferencia estadísticamente significativa frente al control (Figura 9C). Los nematodos control tuvieron un tiempo de vida media de  $9.5 \pm 0.71$  h y un tiempo de vida máxima de  $11.8 \pm 0.84$  h. La concentración de 3,43 mg/mL de extracto etanólico de jiotilla aumentó el tiempo de supervivencia medio en un 23.15% y el tiempo de supervivencia máximo en un 22.03% en comparación con el control.

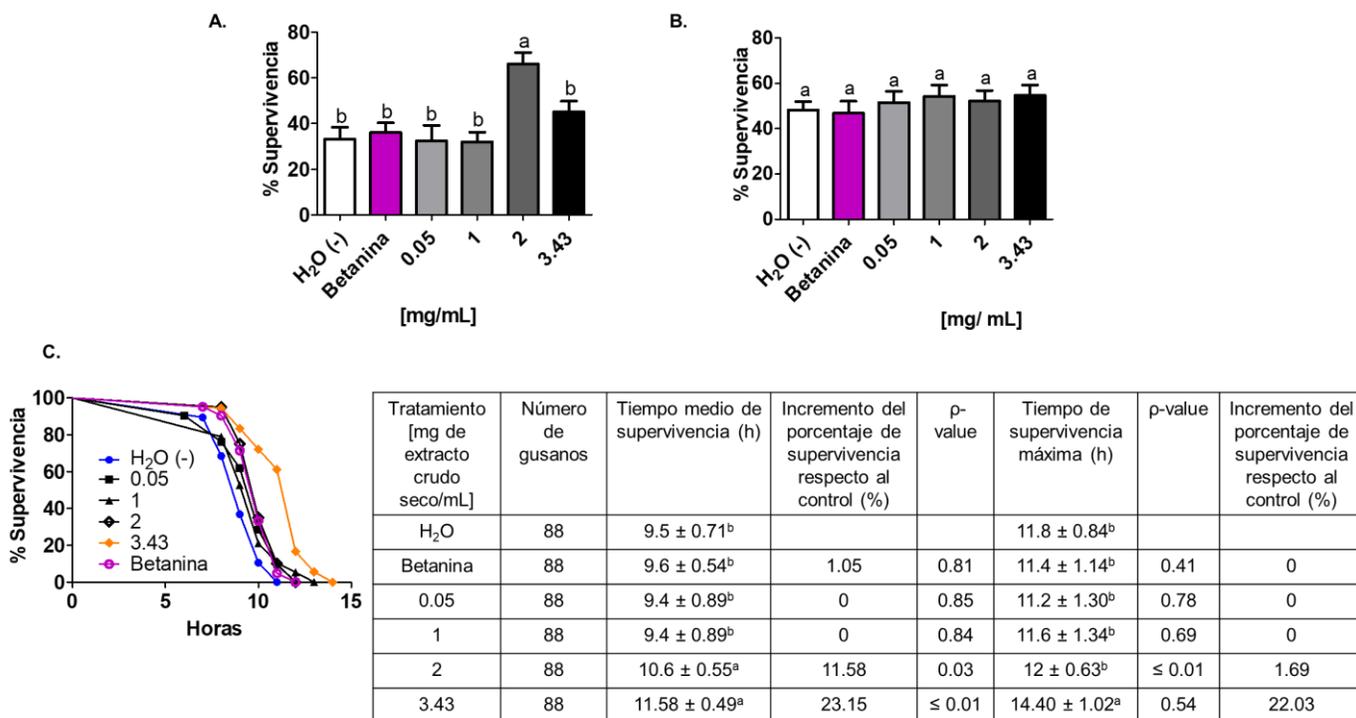
Aunque no hay estudios previos del efecto protector del extracto rico en betalaínas sobre la termotolerancia de *C. elegans*, el porcentaje de tiempo de vida media y máxima de *C. elegans* tratado con 3.43 mg/mL fue mayor que el informado en extractos de *Rubus idaeus* L. los cuales incrementaron entre 14-37% y 11-25% el tiempo de vida media y tiempo de vida máxima de la cepa nativa e *C. elegans* sometidos a estrés térmico. La actividad de los extractos se atribuyó a los compuestos fenólicos presentes en los extractos que incluyen el ácido elágico, el ácido salicílico, el ácido clorogénico, el ácido p-cumárico, la quercetrina, la catequina, la luteolina (Song *et al.*, 2020). Así mismo, Villa-Hernández *et al.* (2017) reportaron que los extractos hidrófilos de los genotipos Costeña Tierra Colorada y Jocote de *Spondias purpurea* L. mejoran la termotolerancia de la cepa nativa de *C. elegans*; los extractos que contienen como compuestos funcionales aumentaron el porcentaje de

supervivencia. Además, los autores encontraron una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la resistencia al estrés térmico de *C. elegans*.

El análisis por HPLC del extracto de jiotilla permitió identificar a las betalaínas betanina, isobetanina, vulgaxantina I, indicaxantina e isoindicaxantina como componentes principales de los extractos. La falta de efecto sobre la resistencia de los nematodos sometidos al estrés oxidante, al estrés térmico y al estrés con radiación UV tratados del estándar comercial de betanina que contiene tanto a la betanina como a su isomero isobetanina en *C. elegans* sugiere que las betacianinas del extracto etanólico de jiotilla no contribuyen al efecto protector del extracto en el aumento de la resistencia al estrés oxidante. El efecto protector del extracto etanólico de jiotilla sobre *C. elegans* en respuesta al estrés térmico y oxidante podría atribuirse a la presencia de vulgaxantina I, isoindicaxantina e indicaxantina en el extracto etanólico de jiotilla, teniendo en cuenta que se ha informado de que estas betaxantinas puras tienen un efecto antioxidante sobre el nematodo (Guerrero-Rubio *et al.*, 2020). Los compuestos fenólicos presentes en el extracto también podrían contribuir a esta protección, como se ha observado previamente para extractos de *Spondias purpurea*. Se ha reportado que un extracto metanólico de frutos de *Opuntia elata* compuesto por 96.1% de ácidos hidroxibenzoicos, 2.6% de flavonoles, 0.8% de ácidos hidroxicinámicos, y 0.5% de flavanonoles disminuye las especies reactivas de oxígeno en *C. elegans*. El efecto protector del extracto se asoció con la actividad antioxidante directa de los compuestos fenólicos debido a su estructura química, así como al efecto indirecto de estos antioxidantes mediado por la activación de mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante (Camboim Rockett *et al.*, 2020). Guerrero-Rubio *et al.* (2020) reportaron un efecto protector de las betaxantinas puras en *C. elegans*, encontrando en particular que la dopaxantina, la feniletilamina betaxantina y la indicaxantina aumentaron la vida útil de los gusanos sometidos a estrés oxidante inducido con juglona hasta en un 12.93%, 16.65% y 16.82%, respectivamente.

Además de su capacidad para neutralizar especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres, las betaxantinas y los compuestos fenólicos han demostrado modular la actividad de vías de señalización como la vía de la insulina/factor de crecimiento similar a la insulina y algunos factores de transcripción como DAF-16/FOXO y SKN-1/Nrf2 en *C. elegans*. Otras vías que pueden estar siendo moduladas son la vía mTor (Mamalian Target og Rapamicyn) y la autofagia (Lampierre y Hansen, 2012). Estos efectos han demostrado incrementar la

resistencia al estrés y la longevidad (Guerrero-Rubio *et al.*, 2020; Hesp *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2022).

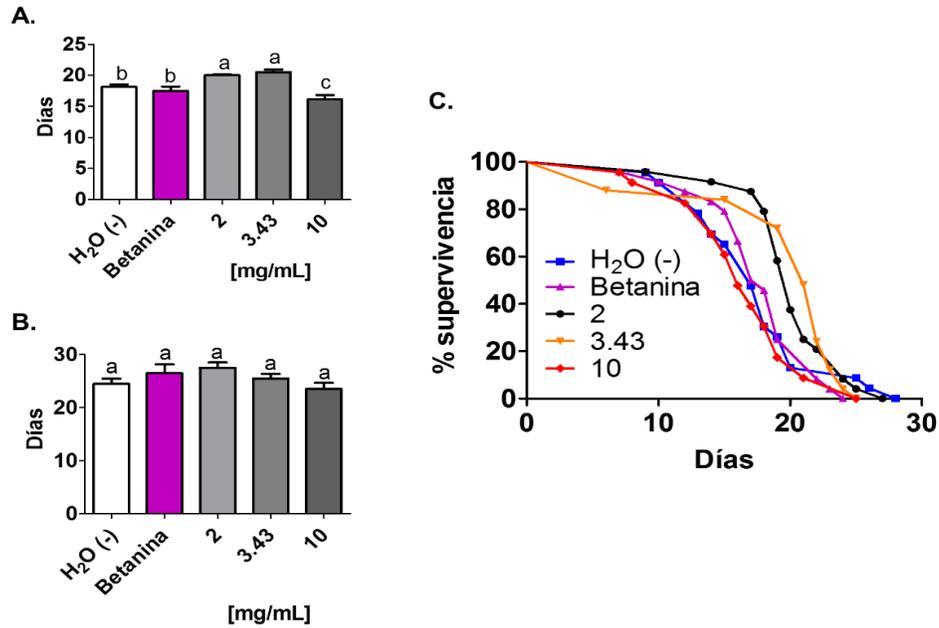


**Figura 9.** Efecto de tratamiento con extracto crudo convencional etanólico de jiotilla obtenido por maceración con agitación en *C. elegans* en respuesta al estrés. A. Estrés oxidante inducido por la aplicación de peróxido de hidrógeno 1.5 mM. B. Estrés con radiación ultravioleta. C. Estrés térmico a 35°C.

#### 7.6.4 Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en el periodo de vida de *C. elegans*

Para determinar el efecto del extracto de jiotilla en el periodo de vida, se dieron tratamientos a los nematodos con concentraciones de 2, 3.43 y 10 mg/mL del extracto etanólico de jiotilla a 20°C. Los resultados mostraron que las concentraciones de 2 y 3.43 mg/mL incrementaron 10.34% y 17.14% el tiempo de vida media, mientras que 10 mg/mL tuvo un efecto de disminución en la vida media de los nematodos (-19.38%) (Figura 10A). La concentración de betanina y las concentraciones de extracto probadas no presentaron efectos estadísticamente significativos en el periodo de vida máxima respecto al control en *C. elegans*. En conjunto estos resultados indican que el tratamiento con el extracto de jiotilla

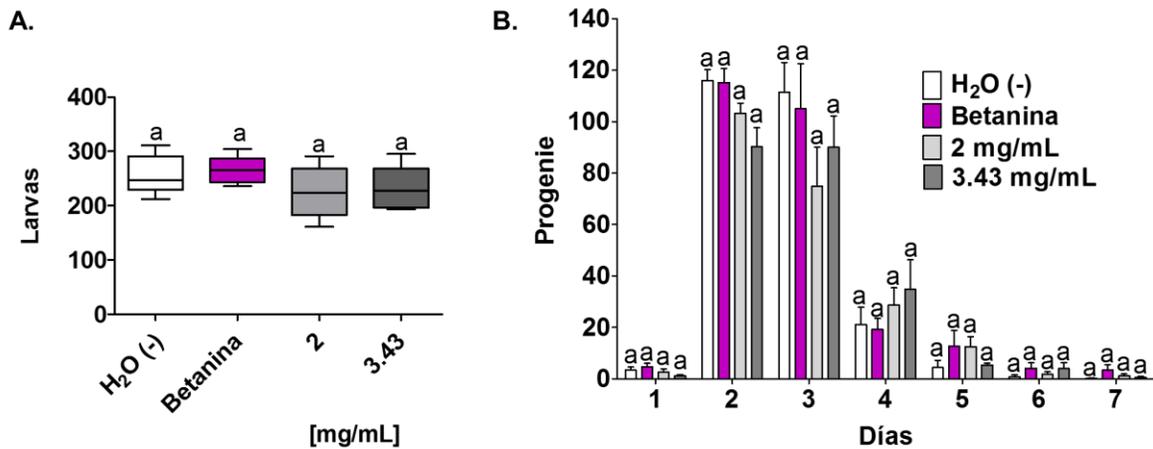
puede prolongar la vida media en forma dosis dependiente, la concentración de 10 mg/mL podría estar siendo tóxica para el periodo de vida del nematodo. Resultados similares han sido reportados con un extracto de manzana en concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL incrementaron la vida media en 18, 24 y 39%, respectivamente. El efecto se atribuyó a los compuestos fenólicos presentes (Vayndorf *et al.*, 2013). Asimismo, se ha informado un efecto dosis dependiente del extracto de arándano en la prolongación de la vida media en *C. elegans*, promoviendo con ello un envejecimiento más saludable (Vayndorf *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2021). La prolongación del periodo de vida del nematodo podría estar modulado por las vías de señalización moduladas por los factores de transcripción DAF-16 y OSR-1 implicados en las vías de señalización insulina/ factor de crecimiento similar a la insulina y MAP cinasas (Guha *et al.*, 2013). Las betalaínas, el ácido gálico y otros compuestos fenólicos presentes en el extracto de jiotilla podrían estar contribuyendo en el incremento del periodo de vida, pues se ha reportado que estos pueden modular la longevidad de *C. elegans* a través de la vía similar a insulina/IGF-1 (Guerrero-Rubio *et al.*, 2020; Nas *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). El posible efecto tóxico del tratamiento con 10 mg/mL al nematodo podría deberse a la disminución de los sistemas enzimáticos y afectaciones en el metabolismo del mismo. Miao *et al.* (2020) reportaron el efecto tóxico del extracto etanólico de *Peganum harmala L.* el cual afectó el periodo de vida de *C. elegans*, los investigadores determinaron que hubo una disminución en los niveles de expresión de genes como *sod-3* y *hsp-16.2* los cuales se encuentran asociados a la vía de señalización de insulina/ IGF-1 que juega un papel importante en el desarrollo, el metabolismo y el envejecimiento.



**Figura 10.** Efecto del tratamiento con extracto de jiotilla en *C. elegans*. A. Periodo de vida media. B. Periodo de vida máxima. C. Curvas de Kaplan-Meier de individuos sincronizados expuestos a agua (control), betanina, 2,3.43 y 10 mg/mL de extracto de jiotilla a 20°C en la cepa nativa N2.

### 7.6.5 Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en la fertilidad de *C. elegans*

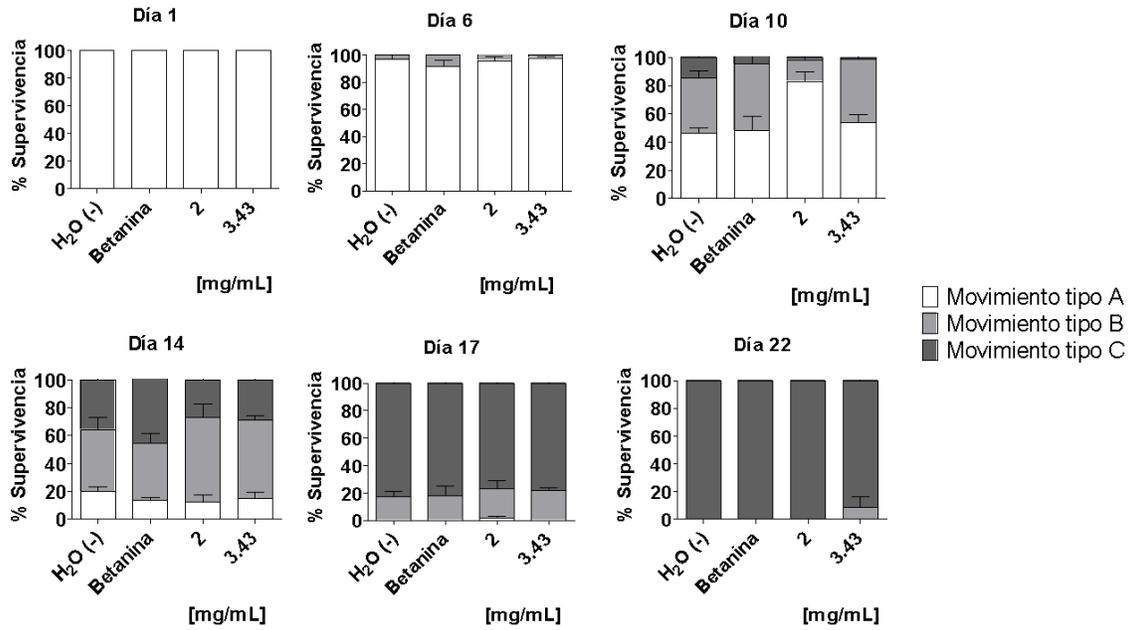
En el ensayo de fertilidad de los nematodos, se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la progenie total de *C. elegans* entre los tratamientos con distintas concentraciones del extracto de jiotilla, y de la betanina con respecto al control (H<sub>2</sub>O) (Figura 11A). La ovoposición se observó desde el primer día en etapa de adulto joven de los nematodos, hasta el día siete. Además, se observó un pico en el recuento de la progenie entre los días dos y tres, el cual descendió tercer día (Figura 11B). Este patrón se observó en todos los tratamientos incluyendo al control, lo que indica que el extracto de jiotilla y la betanina no afectan la función reproductiva de los nematodos. Este patrón donde se observa solo un pico en el periodo de reproducción ha sido informado en estudios previos, donde antocianinas como la feonidina-3- glucósido no afecta la función reproductiva de *C. elegans* (Nas *et al.*, 2021).



**Figura 11.** Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en la fertilidad de *C. elegans*

#### 7.6.6 Efecto del pretratamiento con extracto de jiotilla en la movilidad de *C. elegans*

La fertilidad y la movilidad son las funciones fisiológicas más susceptibles a factores ambientales (Chen *et al.*, 2019), por lo que se resalta la importancia del ensayo de movilidad. En el monitoreo del tipo de movimiento en los días 1, 6, 10, 14, 17 y 22 se observó que el movimiento sinusoidal (movimiento tipo A) disminuyó entre un 2-8% al día 6, al día 10 había disminuido entre un 46- 53%, al día 14 entre 79.85- 87%, al día 17 entre 98-100% respecto al día 1. Además, el movimiento sinusoidal disminuyó más rápido que el movimiento de balanceo de la cabeza (Movimiento tipo C). Los gusanos perdieron casi completamente la capacidad de su movimiento sinusoidal normal en los días 17 y 22, en su última etapa de vida. Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el tipo de movimiento de los tratamientos con el extracto o con betanina respecto al control en cada uno de los días evaluados (Figura 12), lo que indica que los extractos no afectaron la movilidad de *C. elegans*. También pudo observarse que a medida que los gusanos envejecían se volvían más lentos. Se ha reportado que un extracto de frutos de *Citrus medica L. var. sarcodactylis (Noot.) Swingle* en rico en flavonoides incrementan el periodo de vida, así como la resistencia a estrés térmico y oxidante sin afectar la movilidad (Chen *et al.*, 2019).



**Figura 12.** Efecto del tratamiento con extracto de jiotilla y betanina en la función de movilidad de *C. elegans* en los días 1, 6, 10, 14, 17 y 22. Movimiento tipo A (movimiento sinusoidal normal), movimiento tipo B (movimiento menos suave y descoordinado) y movimiento tipo C (balanceo sólo de la cabeza o la cola).

## 8. Conclusiones

1. Se observó que tanto los frutos de pitaya de mayo como los frutos de jiotilla tienen mayor contenido de betaxantinas que de betacianinas, lo que resulta de gran interés por la evidencia en la literatura de la mayor actividad biológica de las betaxantinas con respecto a las betacianinas.
2. El método de extracción afectó el contenido de compuestos funcionales y la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos de jiotilla y pitaya de mayo. La extracción con maceración presentó mayor cantidad de betalaínas y la de ultrasonido mayor contenido de compuestos fenólicos totales y mayor capacidad antioxidante en los extractos de jiotilla. Resulta conveniente emplear una extracción diferente de acuerdo con el compuesto de interés, siendo la extracción convencional el mejor método de extracción para la obtención de betalaínas y la extracción con ultrasonido para los compuestos fenólicos.
3. El contenido de betalaínas totales y compuestos fenólicos totales fue mayor en los frutos de jiotilla que en pitaya de mayo, lo cual se vio reflejado en una mayor capacidad antioxidante *in vitro*. Lo anterior debido a que existe una correlación positiva y fuerte entre los compuestos funcionales extraídos y la capacidad antioxidante *in vitro*.
4. Las condiciones óptimas para la extracción convencional de los compuestos funcionales de pitaya de mayo se obtuvieron con dos etapas de extracción, con etanol 30% (v/v), una relación 1:12.5 p: v y 10 min.
5. Las condiciones óptimas de extracción convencional para la obtención de betalaínas y compuestos fenólicos de jiotilla se obtuvieron con dos etapas de extracción, empleando etanol 37.5% (v/v), una relación 1:10 p: v y 20 min.
6. Los extractos etanólicos de jiotilla y de pitaya de mayo tienen un alto contenido de betacianinas y betaxantinas respecto a otros frutos de cactáceas como los de *Opuntia ficus indica* cuya caracterización y actividad funcional ha sido muy estudiada. Asimismo, el contenido de compuestos fenólicos es mayor en comparación con los reportados en frutos de *Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus*. Lo anterior indica que los frutos de jiotilla y pitaya de mayo podrían ser empleados como una fuente de este tipo de fitoquímicos, promoviendo su comercialización y aprovechamiento.

7. Se corroboró por HPLC la presencia de betacianinas como betanina, isobetanina y betaxantinas como vulgaxantina I, indicaxantina e isoindicaxantina en el extracto convencional de frutos de jiotilla y pitaya de mayo.
8. Se identificó por HPLC la presencia de ácido gálico como el compuesto fenólico mayoritario en el extracto convencional de jiotilla.
9. Se identificó por HPLC la presencia de ácido gálico y ácido 3,4-dihidroxibenzoico en el extracto convencional de pitaya de mayo.
10. Los resultados indican que el extracto etanólico de jiotilla es capaz de aumentar significativamente en 99% la resistencia al estrés oxidante y también protege ante un estrés térmico aumentando en 23.15% el tiempo de supervivencia media y en 22.03% el tiempo de supervivencia máxima de *C. elegans* en el último tipo de estrés. La actividad protectora ante el estrés oxidante y el estrés térmico del extracto etanólico de jiotilla se atribuye a las betaxantinas y los compuestos fenólicos presentes en el mismo. Hasta donde se tiene conocimiento estos son los primeros reportes del efecto protector del extracto de jiotilla en el modelo del nematodo *C. elegans* sometido a distintos tipos de estrés. Estos resultados se atribuyen principalmente a las betaxantinas y compuestos fenólicos presentes en el extracto.
11. Continuar con investigaciones sobre los efectos a la salud de los frutos de cactáceas y las actividades biológicas de sus componentes químicos contribuiría a poder desarrollar en el futuro suplementos que coadyuven en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas.

## 9. Perspectivas

- Con el objetivo de identificar los demás compuestos fenólicos presentes en el extracto y debido a la extensa clasificación que existe de estos, podría resultar de relevancia realizar un análisis con resonancia magnética nuclear de alta resolución y difracción de rayos X, a través de los cuales se pudiera elucidar las estructuras fenólicas.
- Para completar los resultados del presente proyecto, sería de interés poder evaluar el efecto del extracto etanólico de pitaya de mayo en la resistencia al estrés oxidante, al estrés térmico y al estrés por radiación con luz ultravioleta en *C. elegans*, así como el efecto del extracto en las funciones de fertilidad, periodo de vida y movilidad del nematodo.
- La evaluación del efecto de extractos vegetales en un modelo como *C. elegans* cuyo genoma ha sido completamente secuenciado y del cual se cuenta con mutante, permite una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que pudieran estar involucrados. Por lo anterior, sería de gran utilidad explorar a través del uso de mutantes del nematodo o con análisis metabolómico las vías de señalización que pudieran estar regulando por acción de extractos de frutos de jiotilla y pitaya de mayo.

## 10. Rererencias bibliográficas

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., Valéro, J. R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31, 227–249. doi:10.3109/07388551.2010.513677
- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A. Blando, F. (2015). Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from pulia (South Italy) genotypes. *Antioxidants*, 4, 269–280. doi:10.3390/antiox4020269
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014
- Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: Properties, Sources , Applications , and Stability – a Review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2365–2376. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01668.x.
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O’Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185–1192. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.063
- Barbero, G. F., Palma, M., Barroso, C. G. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 578(2), 227–233. doi:10.1016/j.aca.2006.06.074
- Bartosz G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochemical pharmacology*, 77(8), 1303-15. doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.009.
- Bourhia, M., Elmahdaoui, H., Ullah, R., Bari, A., Benbacer, L. (2019). Promising physical, physicochemical, and biochemical background contained in peels of prickly pear fruit growing under hard ecological conditions in the mediterranean countries. *BioMed Research International*, 9873146. doi:10.1155/2019/9873146
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5

- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. (2003). HPLC characterization of betalains from plants in the Amaranthaceae. *Journal of Chromatographic Science*, 43, 454–460. doi:10.1093/chromsci/43.9.454
- Calderón Salinas, J. V., Muñoz Reyes, E. G., Quintanar Escorza, M. A. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista de educación bioquímica*, 32, 53-66.
- Camboim Rockett, F., De Oliveira Schmidt, H., Schmidt, L., Rodrigues, E., Tischer, B., Ruffo de Oliveira, V., Lima da Silva, V., Rossini Augusti, P., Flôres, S.H., Rios, A. (2020). Phenolic compounds and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of *Butia* and *Opuntia* fruits. *Food Research International*, 137, 109740. doi:10.1016/j.foodres.2020.109740
- Cardoso-Ugarte, G. A., Sosa-Morales, M. E., Ballard, T., Liceaga, A., San Martín-González, M. F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT - Food Science and Technology*, 59, 276–282. doi:10.1016/j.lwt.2014.05.025
- Carocho M., Ferreira I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021.
- Carreón-Hidalgo, J. P., Franco-Vásquez, D. C., Gómez-Linton, D. R., Pérez-Flores, L. J. (2022). Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications. *Food Research International*, 151, 110821. doi:10.1016/j.foodres.2021.110821
- Carreón-Hidalgo, J. P., Román-Guerrero, A., Navarro-Ocaña, A., Gómez-Linton, D. R., Franco-Vásquez, D. C., Franco-Vásquez, A. M., Arreguín-Espinosa, R. (2023). Chemical characterization of yellow-orange and purple varieties of *Opuntia ficus-indica* fruits and thermal stability of their betalains. *Journal of Food Science*, 88(1):161-174. doi: 10.1111/1750-3841.16421.
- Castellar R., Obón J.M., Alacid M., Fernández-López J.A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. 51(9), 2772-2776. doi: 10.1021/jf021045h.
- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E. L. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural*

and *Food Chemistry*, 56, 5758–5764. doi: 10.1021/jf800362t.

- Castro-Enríquez, D. D., Montaña-Leyva, B., Del Toro-Sánchez, C. L., Juárez-Onofre, J. E., Carvajal-Millán, E., López-Ahumada, G., Rodríguez-Félix, F. (2020). Effect of ultrafiltration of pitaya extract (*Stenocereus thurberi*) on its phytochemical content, antioxidant capacity, and UPLC-DAD-MS Profile. *Molecules*, 25(2), 281, doi: 10.3390/molecules25020281.
- Cejudo-Bastante, M. J., Chaalal, M., Louaileche, H., Parrado, J., Heredia, F. J. (2014). Betalain profile, phenolic content, and color characterization of different parts and varieties of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 8491–8499. doi:10.1021/jf502465g
- Celli, G. B., Brooks, M. S. (2017). Impact of extraction and processing conditions on betalains and comparison of properties with anthocyanins — A current review. *Food Research International*, 100, 501–509. doi:10.1016/j.foodres.2016.08.034
- Cervantes Arista, C., Roman Guerrero, A., Oidor-Chan, V. H., Díaz de León Sánchez, F., Álvarez Ramírez, E. L., Pelayo Zaldívar, C., Sierra-Palacios, E. C., Mendoza Espinoza, J. A. (2020). Chemical characterization, antioxidant capacity, and anti-hyperglycemic effect of *Stenocereus stellatus* fruits from the arid Mixteca Baja region of Mexico. *Food Chemistry*, 328, 127076. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127076
- Chen, H., Wang, J., Liu, X., Zhou, A., Xiao, J., Huang, K., Chen, H., Cao, Y. (2019). Optimization in continuous phase-transition extraction of crude flavonoids from finger citron fruit and evaluation on their antiaging activities. *Food Science and Nutrition*, 8, 1636–1648. doi:10.1002/fsn3.1450
- Chung-Hung, C., Yusoff, R., Gek-Cheng, N., Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218, 6213–6225. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.040
- Corzo -Rios, L. J., Bautista -Ramírez, M. E., Gómez y Gómez, Y. M., Torres -Bustillos, L. G. (2016). Frutas cactáceas: compuestos bioactivos y sus propiedades nutraceuticas. In *Propiedades funcionales de hoy*, 35–65.
- de Souza, R.L.A., Santana, M.F.S., de Macedo, E.M.S., Sousa de Brito, E., Correia, R.T.P. (2015). Physicochemical, bioactive and functional evaluation of the exotic fruits *Opuntia ficus-indica* and *Pilosocereus pachycladus* Ritter from the Brazilian

- caatinga. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 7329–7336. doi:10.1007/s13197-015-1821-4
- Dicko, M. H., Gruppen, H., Traoré, A. S., Voragen, A. G. J., Van Berkel, W. J. H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1, 21–38. doi:10.1002/jsfa.885
- Esatbeyoglu, T., Wagner, A. E., Motafakkerzad, R., Nakajima, Y., Matsugo, S., Rimbach, G. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and Chemical Toxicology*, 73, 119–126. doi:10.1016/j.fct.2014.08.007
- Escribano, J., Pedreño, M.A., García-Carmona, F. and Muñoz, R. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochemical análisis*, 9, 124-127. doi:10.1002/(SICI)1099-1565(199805/06)9:3<124::AID-PCA401>3.0.CO;2-0
- Espin, S., Gonzalez-Manzano, S., Taco, V., Poveda, C., Ayuda-Durán, B., Gonzalez-Paramas, A.M., Santos-Buelga, C. (2016). Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, 194, 1073–1080. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.131
- Faridah, A., Holinesti, R., Syukri, D. (2015). Betalains from red pitaya peel (*Hylocereus polyrhizus*) extraction, spectrophotometric and HPLC-DAD identification, bioactivity and toxicity screening. *Pakistan Journal of Nutrition*, 14(12), 976–982. doi:10.3923/pjn.2015.976.982
- Fujihara, K., Shimoyama, T., Kawazu, R., Sasaki, H., Koyama, K., Takahashi, K., Kinoshita, K. (2021). Amyloid  $\beta$  aggregation inhibitory activity of triterpene saponins from the cactus *Stenocereus pruinosus*. *Journal of Natural Medicines*, 75(2), 284–298. doi:10.1007/s11418-020-01463-0
- Gandía-Herrero, F., Garcia-Carmona, F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Cell press*, 18 (6), 334-343. doi: 10.1016/j.tplants.2013.01.003
- Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F. (2009). The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *Journal of natural products*, 72(6), 1142-6. doi: 10.1021/np900131r.

- García-Cayuela, T., Gómez-Maqueo, A., Guajardo-Flores, D., Welti-Chanes, J., Cano, M. P. (2019). Characterization and quantification of individual betalain and phenolic compounds in Mexican and Spanish prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) tissues: A comparative study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 1–13. doi:10.1016/j.jfca.2018.11.002
- García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Valle-Guadarrama, S. (2012). Betalains, phenolic compounds and antioxidant activity in pitaya de mayo (*Stenocereus Griseus* H.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35, 1–5. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.108
- García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y. (2017). Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. Pruinusus* and *S. stellatus*). *Food Chemistry*, 234, 111–118. doi:10.1016/j.foodchem.2017.04.174
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., Joaquín-Cruz, E. (2013). physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 403–410. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0391-8>
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., Luna-Morales, C. C. (2016). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 69–76. doi:10.1016/j.postharvbio.2015.07.004
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Soto-Hernández, R. M., Guerra-Ramírez, D., Zuleta-Prada, H., Martínez-Damián, M. T., Ramírez-Valencia, Y. D. (2021). Separation of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Betaxanthins, Betacyanins, and Soluble Phenols Through Multistage Aqueous Two-phase Systems. *Food and Bioprocess Technology*, 14, 1791–1804. doi:10.1007/s11947-021-02676-1
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT- Food Science and Technology*, 64, 645–649. doi:10.1016/j.lwt.2015.06.052
- Gómez-Linton, D. R., Alavez, S., Navarro-Ocaña, A., Román-Guerrero, A., Pinzón-López, L., Pérez-Flores, L. J. (2021). Achiote (*Bixa orellana*) lipophilic wxtract, bixin, and  $\delta$  - tocotrienol effects on lifespan and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Planta*

*Medica*, 87, 368–374. doi:10.1055/a-1266-6674

- Gómez-Linton, D.R., Navarro-Ocaña, A., Román-Guerrero, A. Alavez S., Pinzón-López L., Mendoza-Espinoza J. A., Pérez-Flores L.J. (2021). Environmentally friendly achiote seed extracts with higher  $\delta$ -tocotrienol content have higher *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity than the conventional extract. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 2579–2588. doi:10.1007/s13197-020-04764-0
- Gondim de Albuquerque, J., Escalona-Buendía, H. E., Tribuzy de Magalhães Cordeiro, A. M., dos Santos Lima, M., de Souza Aquino, J., da Silva Vasconcelos, M. A. (2021). Ultrasound treatment for improving the bioactive compounds and quality properties of a Brazilian nopal (*Opuntia ficus-indica*) beverage during shelf-life. *LWT- Food Science and Technology*, 149, 111814. doi:10.1016/j.lwt.2021.111814
- Goula, A. M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil - Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117, 492–498. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.10.009
- Granato, D., Santos, J. S., Maciel, L. G., Nunes, D. S. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80, 266–279. doi:10.1016/j.trac.2016.03.010
- Gruber, J., Fang, L., Kumar, S., Halliwell, B. (2009). Deceptively simple but simply deceptive –*Caenorhabditis elegans* lifespan studies: Considerations for aging and antioxidant effects. *FEBS Letters*, 583, 3377–3387. doi:10.1016/j.febslet.2009.09.051
- Guerrero-Rubio, M. A., Hernández-García, S., Escribano, J., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., Gandía-Herrero, F. (2020). Betalain health-promoting effects after ingestion in *Caenorhabditis elegans* are mediated by DAF-16/FOXO and SKN-1/Nrf2 transcription factors. *Food Chemistry*, 330, 127228. doi:10.1016/j.foodchem.2020.127228
- Guerrero-Rubio, M. A., Hernández-García, S., García-Carmona, F., Gandía-Herrero, F. (2019). Extension of life-span using a RNAi model and *in vivo* antioxidant effect of *Opuntia* fruit extracts and pure betalains in *Caenorhabditis elegans*. *Food Chemistry*, 274, 840–847. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.067
- Guha, S., Cao, M., Kane, R. M., Savino, A. M., Zou, S., Dong, Y. (2013). The longevity effect

of cranberry extract in *Caenorhabditis elegans* is modulated by DAF-16 and OSR-1. *Age*, 35, 1559–1574. doi:10.1007/s11357-012-9459-x

- Gutiérrez-Salinas, J., Mondragón-Terán, P., García-Ortíz, L., Hernández-Rodríguez, S., Ramírez-García, S., Núñez-Ramos, N. R. (2014). Breve descripción de los mecanismos moleculares de daño celular provocado por los radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 19, 446–454.
- Gutiérrez-Salinas, J., Morales-Gonzalez, J. A. (2004). Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito, 20, 287–295.
- Guzmán-Maldonado, S. H., Herrera-Hernández, G., Hernández-López, D. Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, F., Brat, P. (2010). Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central Mexico. *Food Chemistry*, 121, 381–386. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.039
- Heim, K.E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- Herbach, K. M., Stintzing, F. C., Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71, 41–50. doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x
- Herrera-Hernández, M. G., Guevara-Lara, F., Reynoso-Camacho, R., Guzmán -Maldonado, S. H. (2011). Effects of maturity stage and storage on cactus berry (*Myrtillocactus geometrizans*) phenolics, vitamin C, betalains and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 129, 1744–1750. doi:10.1016/j.foodchem.2011.06.042
- Hesp, K., Smant, G., Kammenga, J. E. (2015). *Caenorhabditis elegans* DAF-16/FOXO transcription factor and its mammalian homologs associate with age-related disease. *Experimental Gerontology*, 72, 1–7. doi:10.1016/j.exger.2015.09.006
- Hong Fang, J., Zi-Heng, Z., Bei-Wei, B., Bao Jun, S., Cheng-Jie, S., Lei, C., Wei-Ming, Z. (2017). Adverse effects of hydroalcoholic extracts and the major components in the stems of *Impatiens balsamina* L. on *Caenorhabditis elegans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4245830. doi:10.1155/2017/4245830

- Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, 73, 48–65. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00716.x
- Huang, A.S. and Elbe, J.H.V. (1987). Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanine. *Journal of Food Science*, 52, 1689-1693. doi:10.1111/j.1365-2621.1987.tb05907.x
- Huang, D., Boxin, O. U., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856. doi:10.1021/jf030723c
- Kanner J, Harel S, Granit R. (2001). Betalains- a new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*. 49, 5178-85. doi: 10.1021/jf010456f.
- Khan, M. I. (2016). Plant Betalains: Safety, Antioxidant Activity, Clinical Efficacy, and Bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 316–330. doi:10.1111/1541-4337.12185
- Khan, M. I., Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry*, 117, 267–295. doi:10.1016/j.phytochem.2015.06.008
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, 2328–2375. doi:10.3390/molecules18022328
- Kivrak, Ş., Kivrak, İ., Karababa, E. (2018). Analytical evaluation of phenolic compounds and minerals of *Opuntia robusta* and *Opuntia ficus-barbarica* A. berger. *International Journal of Food Properties*, 21, 244–256. doi:10.1080/10942912.2018.1451342
- Konigsberg, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas 1ª edición (p. 636). Ed. Manual Moderno, México.
- Koss-Mikołajczyk, I. Kusznerewicz, B., Wiczowski, W., Sawicki, T., Bartoszek, A. (2019). The comparison of betalain composition and chosen biological activities for differently pigmented prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) and beetroot (*Beta vulgaris*) varieties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70, 442–452. doi:10.1080/09637486.2018.1529148
- Krajka -Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H., Baer-Dubowska, W. (2013). Betanin, a

- beetroot component, induces nuclear factor erythroid-2-related factor 2-mediated expression of detoxifying / antioxidant enzymes in human liver cell lines. *The British journal of nutrition*, 110, 2138–2149. doi:10.1017/S0007114513001645
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 726–732. doi:10.1590/S0101-20612005000400016
- Lapierre, L.R., Hansen, M. (2012). Lessons from *C. elegans*: Signaling pathways for longevity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23, 637–644. doi:10.1016/j.tem.2012.07.007
- Lee, E. J., Nguyen, C. T. T., Patil, B. S., Kim, J., Yoo, K. S. (2014). Betalain and betaine composition of greenhouse- or field-produced beetroot (*Beta vulgaris* L.) and inhibition of HepG2 cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1324–1331. doi:10.1021/jf404648u
- Leyva, E., Loredó-Carrillo, S.E., López, L.I., Escobedo-Avellaneda, E.G., Navarro-Tovar, G. (2017). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión bibliográfica. *Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 74, Num. 577, <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320755>
- Li, L., Li, L., Cui, S., Qian, D., Lyu, S., Liu, W., Botella, J.R., Li, H., Burritt, D.J., Lam-Son P.T., Li, W., Zhang, Y. (2023). PDC1 is activated by ABF4 and inhibits seed germination by promoting ROS accumulation in *Arabidopsis*. *Environmental and experimental botany*, 206, 105188. doi:10.1016/j.envexpbot.2022.105188
- Lithgow G.J., Walker G.A. (2002). Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan. *Mechanisms of ageing and development*, 23(7), 765-71. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00422-5
- Liu Y., Zhou Z., Yin L., Zhu M., Wang F., Zhang L., Wang H., Zhou Z., Zhu H., Huang C., Fan S. (2022). Tangeretin promotes lifespan associated with insulin/insulin-like growth factor-1 signaling pathway and heat resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Biofactors*, 48, 442-453. doi: 10.1002/biof.1788
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Journal*, 4, 118-26. doi:

10.4103/0973-7847.70902

- Lucanic M., Lithgow G.J., Alavez S. (2013). Pharmacological lifespan extension of invertebrates. *Ageing research reviews*, 12, 445-58. doi: 10.1016/j.arr.2012.06.006
- Luna Morales, C. C., Aguirre R. J. R. (2001). Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de la pitaya mixteca en México. *Interciencia*, 26, 18–24. <http://www.redalyc.org/pdf/339/33905204.pdf>
- Lushchak, V. I. (2014). Chemico-Biological Interactions Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016
- Martorell, P., Forment, J. V., De Llanos, R., Montón, F., Llopis, S., González, N., Genovés, S., Cienfuegos, E., Monzó, H., Ramón, D. (2011). Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2077–2085. doi:10.1021/jf104217g
- Martorell P., Llopis S., Gil J.V., Genovés S., Ramón D., Zacarías L., Rodrigo M.J. (2020). Evaluation of carotenoids protection against oxidative stress in the animal model *Caenorhabditis elegans*. *Methods in molecular biology*, 2083, 387-401. doi: 10.1007/978-1-4939-9952-1\_29
- Miao, X., Zhang, X., Yuan, Y., Zhang, Y., Gao, J., Kang, N., Liu, X., Wu, J., Liu, Y., Tan, P. (2020). The toxicity assessment of extract of *Peganum harmala* L. seeds in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20, 256. doi:10.1186/s12906-020-03051-x
- Mosquera, D., Díaz, R., Cardona, J., Gutierrez, R., Hernandez, M. (2012). Obtención de aceites vegetales provenientes de especies Amazónicas mediante la técnica de extracción asistida por microondas (Eam). *Vitae*, 19, 57–59.
- Nas, J. S. B., Manalo, R. V. M., Medina, P. M. B. (2021). Peonidin-3-glucoside extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* and enhances its tolerance to heat, UV, and oxidative stresses. *Science Asia*, 47, 457–468. doi:10.2306/SCIENCEASIA1513-1874.2021.059
- Netzel, M., Stintzing, F. C., Quaas, D., Strab, G., Carle, R., Bitsch, R., Bitsch, I., Frank, T.

- (2005). Renal excretion of antioxidative constituents from red beet in humans. *Food Research International*, 38, 1051–1058. doi:10.1016/j.foodres.2005.03.016
- Oaxaca-Villa, B., Casas, A., Valiente-Banuet, A. (2006). Reproductive biology in wild and silvicultural managed populations of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 277–287. doi:10.1007/s10722-004-6147-4
- Oroian, M., Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10–36. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.018
- Parra, F., Blancas, J. J., Casas, A. (2012). Landscape management and domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley: Human guided selection and gene flow. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8, 1–18. doi:10.1186/1746-4269-8-32
- Parra, F., Pérez-Nasser, N., Lira, R., Pérez-Salicrup, D., Casas, A. (2008). Population genetics and process of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments*, 72(11), 1997–2010. doi:10.1016/j.jaridenv.2008.06.007
- Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. (2000). *Journal of natural products*, 63, 1035-42. doi: 10.1021/np9904509.
- Piñol, M.T., Palazón, J., Cusidó, R.M. (2013). Introducción al metabolismo secundario. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds). *Fundamentos de fisiología vegetal segunda edición* (pp. 331-332). Ed. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid.
- Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). European Journal of Medicinal Chemistry The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040
- Prakash Maran, J., Priya, B. (2016). Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 792–799. doi: 10.1007/s13197-015-1988-8
- Prakash Maran, J., Manikandan, S. (2012). Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia*

- ficus-indica*) fruit. *Dyes and Pigments*, 95, 465–472. doi: 10.1016/j.dyepig.2012.06.007
- Prakash Maran, J., Manikandan, S., Mekala, V. (2013). Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box-Behnken design with desirability function. *Industrial Crops and Products*, 49, 304–311. doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.012
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
- Pun, P.B., Gruber, J., Tang, S.Y., Schaffer, S., Ong, R. L., Fong, S., Ng, L.F., Cheah, I., Halliwell, B. (2010). Ageing in nematodes: Do antioxidants extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*?. *Biogerontology*, 11, 17–30. doi:10.1007/s10522-009-9223-5
- Ramirez-Lopez, L. M., DeWitt, C. A. M. (2014). Analysis of phenolic compounds in commercial dried grape pomace by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Food Science and Nutrition*, 2, 470–477. <https://doi.org/10.1002/fsn3.136>
- Ramírez-Rodríguez, Y., Martínez-Huélamo, M., Pedraza-Chaverri, J., Ramírez, V., Martínez-Tagüeña, N., Trujillo, J. (2020). Ethnobotanical, nutritional and medicinal properties of Mexican drylands Cactaceae Fruits: Recent findings and research opportunities. *Food Chemistry*, 312, 126073. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126073
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9
- Rodríguez-Sánchez, J.A., Cruz y Victoria, M.T., Barragán-Huerta, B. E. (2017). Betaxanthins and antioxidant capacity in *Stenocereus pruinosus*: Stability and use in food. *Food Research International*, 91, 63–71. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.023
- Roriz, C. L., Barros, L., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R. (2017). Modern extraction techniques optimized to extract betacyanins from *Gomphrena*

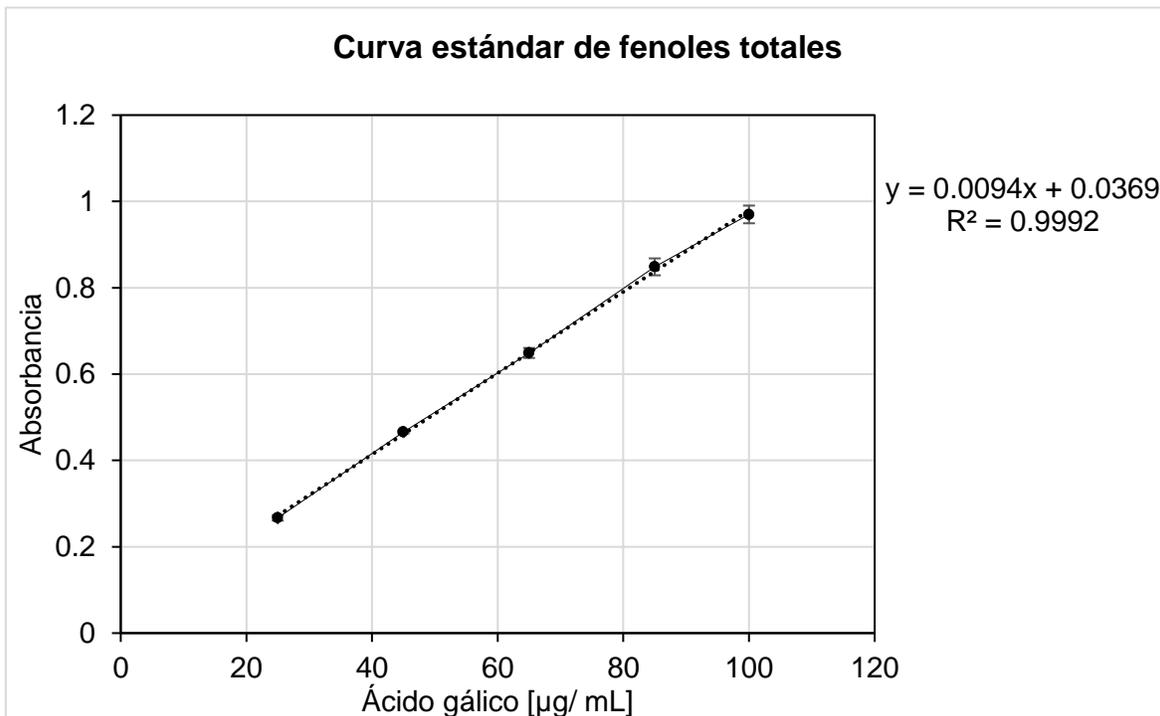
- globosa* L. *Industrial Crops & Products*, 105, 29–40. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.008
- Rosas-Benítez, A., Trujillo-Cárdenas, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., García-Cruz, L. (2016). Quality attributes of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit handled in postharvest with and without thorns under refrigerated storage. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 22, 191-207. doi:10.5154/r.rchsh.2016.04.011
- Ruiz Huerta, E. A., Márquez Guzmán, J., Pelayo Zaldívar, C., Barbosa Martínez, C., Ponce de León García, L. (2015). *Escontria chiotilla* (Cactaceae): Fruit development, maturation and harvest index. *Fruits*, 70, 201–212. doi:10.1051/fruits/2015013
- Sagar, B., Kedare, R., Singh, P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422. doi: 10.1007/s13197-011-0251-1
- Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M.R., San Martin-Martinez, E., Zepeda, L. G. (2013). Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11995–12004. doi:10.1021/jf401705h
- Sandate-Flores, L., Romero-Esquivel, E., Rodríguez-Rodríguez, J., Rostro-Alanis, M., Melchor-Martínez, E. M., Castillo-Zacarías, C., Reuna-Ontiveros, P., Morales Celaya, M.F., Chen, W. N., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R. (2020). Functional attributes and anticancer potentialities of chico (*Pachycereus weberi*) and jiotilla (*Escontria chiotilla*) fruits extract. *Plants*, 9, 1–17. doi: 10.3390/plants9111623
- Schieber, M., Chandel, N, S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current Biology*, 24, 453–462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Shunan, D., Yu, M., Guan, H., Zhou, Y. (2021). Neuroprotective effect of betalain against AlCl<sub>3</sub>-induced Alzheimer's disease in Sprague Dawley rats via putative modulation of oxidative stress and nuclear factor kappa B (NF-KB) signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111369. doi:10.1016/j.biopha.2021.111369.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Song B, Zheng B, Li T, Liu RH. (2020). Raspberry extract promoted longevity and stress

- tolerance via the insulin/IGF signaling pathway and DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food Function*, 11,3598-3609. doi: 10.1039/c9fo02845e
- Soriano-Santos, J., Franco-Zavaleta, M. E., Pelayo-Zaldivar, C., Armella-Villalpando, M. A., Yanez-Lopez, M. L., Guerrero-Legarreta, I. (2007). A partial characterization of the red pigment from the Mexican fruit cactus "jiotilla" (*Escontria chiotilla* [Weber] Britton & Rose). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6, 19–25.
- Stalikas, C. D. (2007). Review Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295. doi:10.1002/jssc.200700261
- Thakur, V., Gupta, D. (2006). Studies on the clarification and concentration of beetroot juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 30, 194–207. doi: 10.1111/j.1745-4549.2006.00059.x
- Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V. (2017). Microwave assisted extraction process of betalain from dragon fruit and its antioxidant activities. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 16, 41–48. doi:10.1016/j.jssas.2015.02.001
- Tripathy, B.C, Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant signaling and behavior*, 7(12), 1621-33. doi: 10.4161/psb.22455
- Van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., Somoza, V., Knorr, D., Jasti, P.R., Eisenbrand, G. (2010). A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular nutrition and food research*. 54(9), 1215-47. doi: 10.1002/mnfr.200900608
- Vayndorf, E.M., Lee, S.S., Liu, R.H. Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Functional Foods*, 5, 1236-1243. doi: 10.1016/j.jff.2013.04.006
- Vergara Hinojosa, C. C. (2013). Extracción y estabilización de betalaínas de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) mediante tecnología de membranas y microencapsulación, como colorante alimentario [Tesis de doctorado, Universidad de Chile]. Repositorio Académico de la Universidad de Chile.
- Villa-Hernández, J. M., Mendoza-Cardoso, G., Mendoza-Espinoza, J. A., Vela-Hinojosa, C., Díaz de León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, F., Alia-Tejacal. I., Pérez-Flores, L. J.

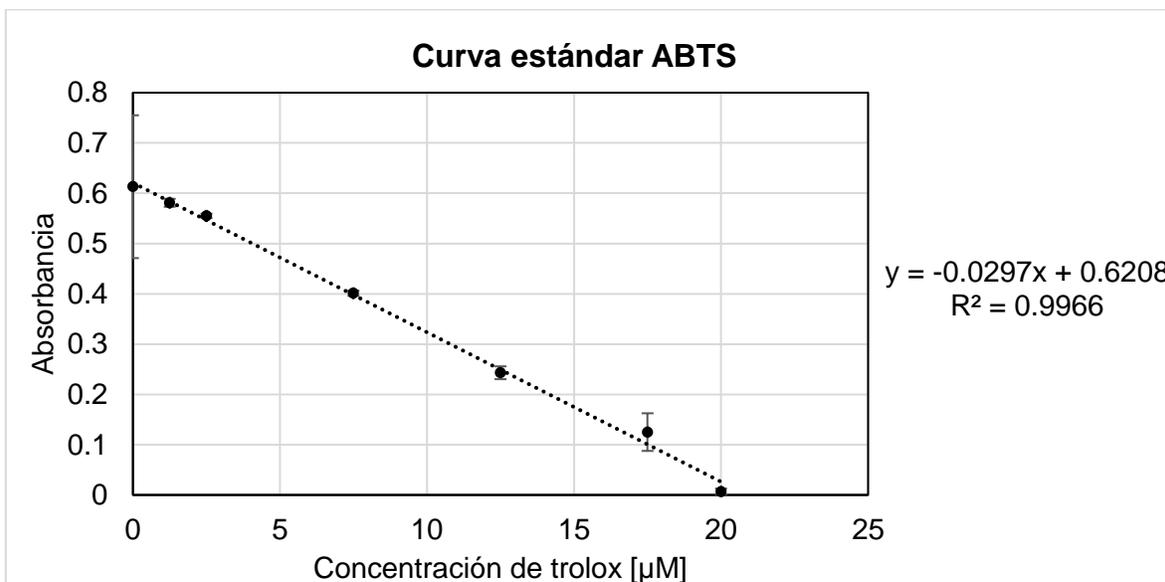
- (2017). Antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo* of various ecotypes of Mexican Plum (*Spondias purpurea* L.). *Journal of Food Science*, 82, 2576–2582. doi:10.1111/1750-3841.13862
- Wang, C. Q., Yang, G. Q. (2010). Phytomedicine betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine*, 17, 527–532. doi:10.1016/j.phymed.2009.09.006.
- Wang, S., Dong, X., Tong, J. (2013). Optimization of enzyme-assisted extraction of polysaccharides from alfalfa and its antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 387–396. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.09.029
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Kristinsson, H.G., Hreggvidsson, G.O., Jónsson, J.Ó., Thorkelsson, G., Ólafsdóttir, G. (2010). Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 1387–1393. doi:10.1016/j.lwt.2010.05.010
- Wroblewska, M., Juskiwicz, J., Wiczowski, W. (2011). Physiological properties of beetroot crisps applied in standard and dyslipidaemic diets of rats. *Lipids in Health and Disease*, 10, 1–8. doi:10.1186/1476-511X-10-178
- Yen-Ming, W., Lee-Fong, S. (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3086–3092. doi:10.1007/s13197-014-1362-2
- Zhang, W., Lv, T., Li, M., Wu, Q., Yang, L., Liu, H., Sun, D., Sun, L., Zhuang, Z., Wang, D. (2013). Beneficial effects of wheat gluten hydrolysate to extend lifespan and induce stress resistance in nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 8, 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0074553
- Zhou, S., Chen, J., Fan, F., Pan, Y., Feng, X., Yu, L., Chu, Q. (2022). Apios americana Medik flower extract protects high-glucose-treated hepatocytes and *Caenorhabditis elegans*. *Food Bioscience*, 45, 101473. doi:10.1016/j.fbio.2021.101473
- Zorrilla-García, A. E. (2002). El Envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21, 178–185.

## 11. Anexos

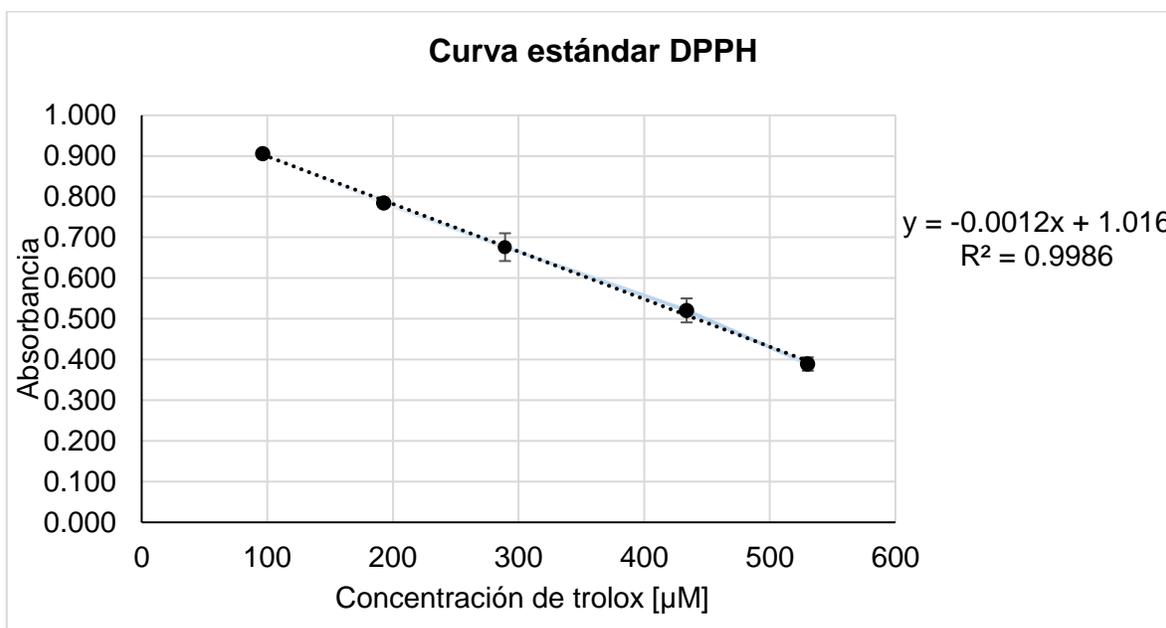
### Anexo 1. Curva estándar empleada para la determinación de fenoles totales



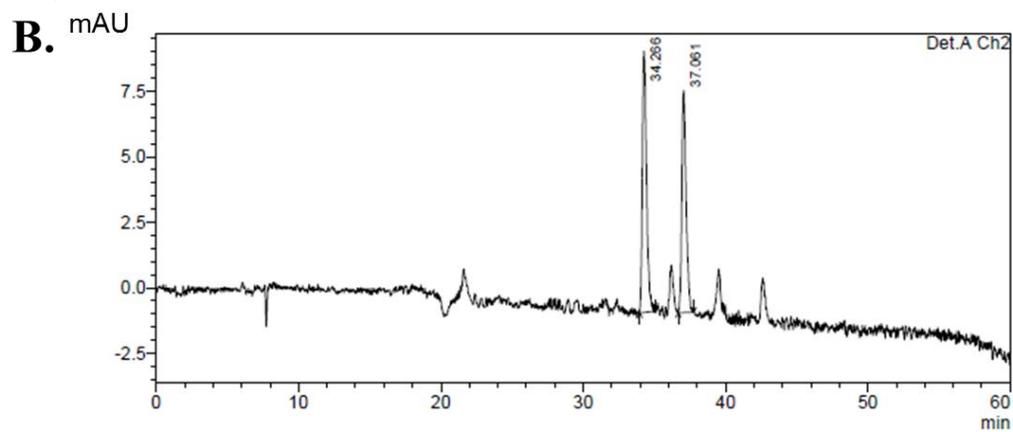
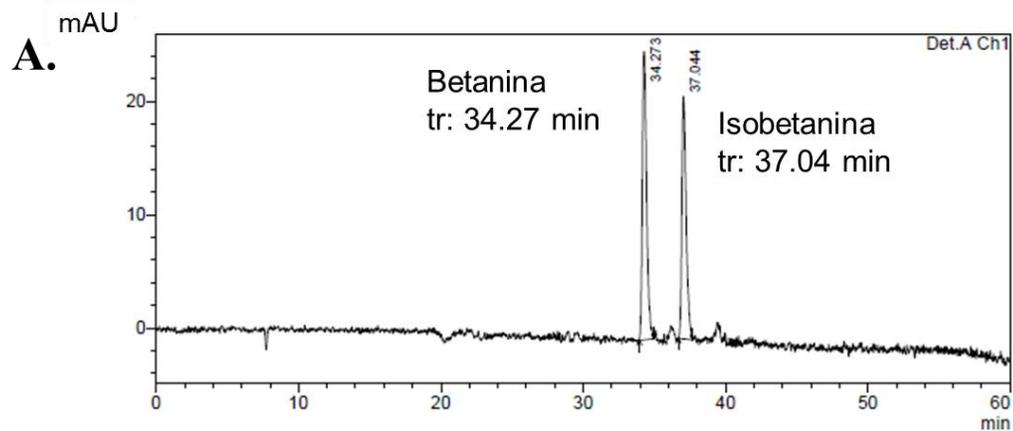
### Anexo 2. Curva estándar para la determinación de capacidad antioxidante por el método de ABTS



**Anexo 3.** Curva estándar para la determinación de capacidad antioxidante por el método de DPPH

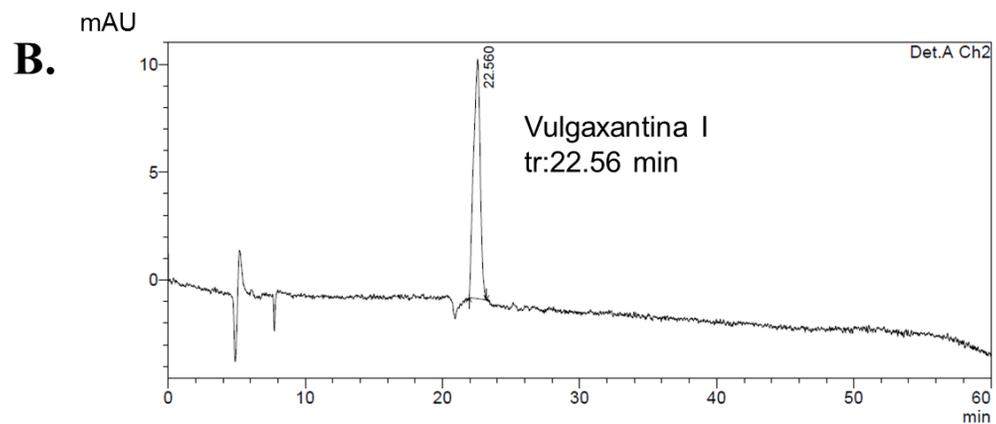
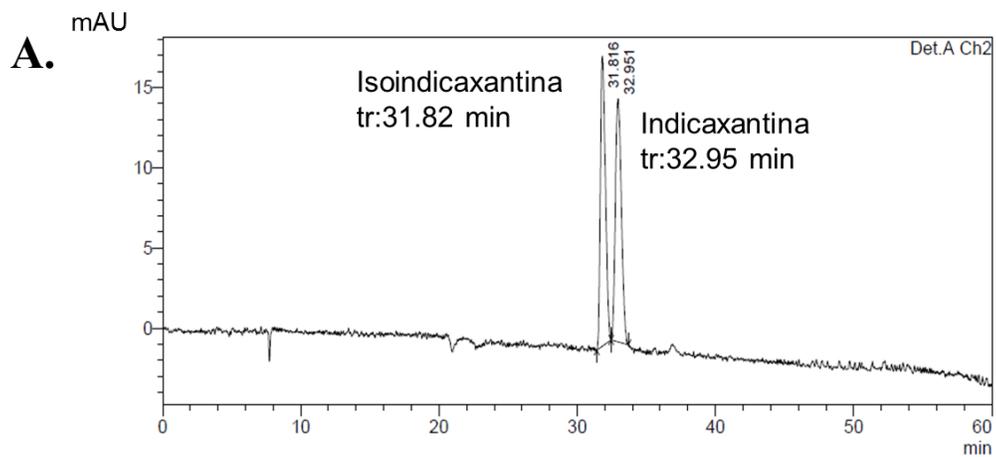


**Anexo 4.** Cromatograma de HPLC del estándar de betanina e isobetanina ( $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$ ) [1 mg/mL] A)  $\lambda=535$  nm y B) 480 nm.

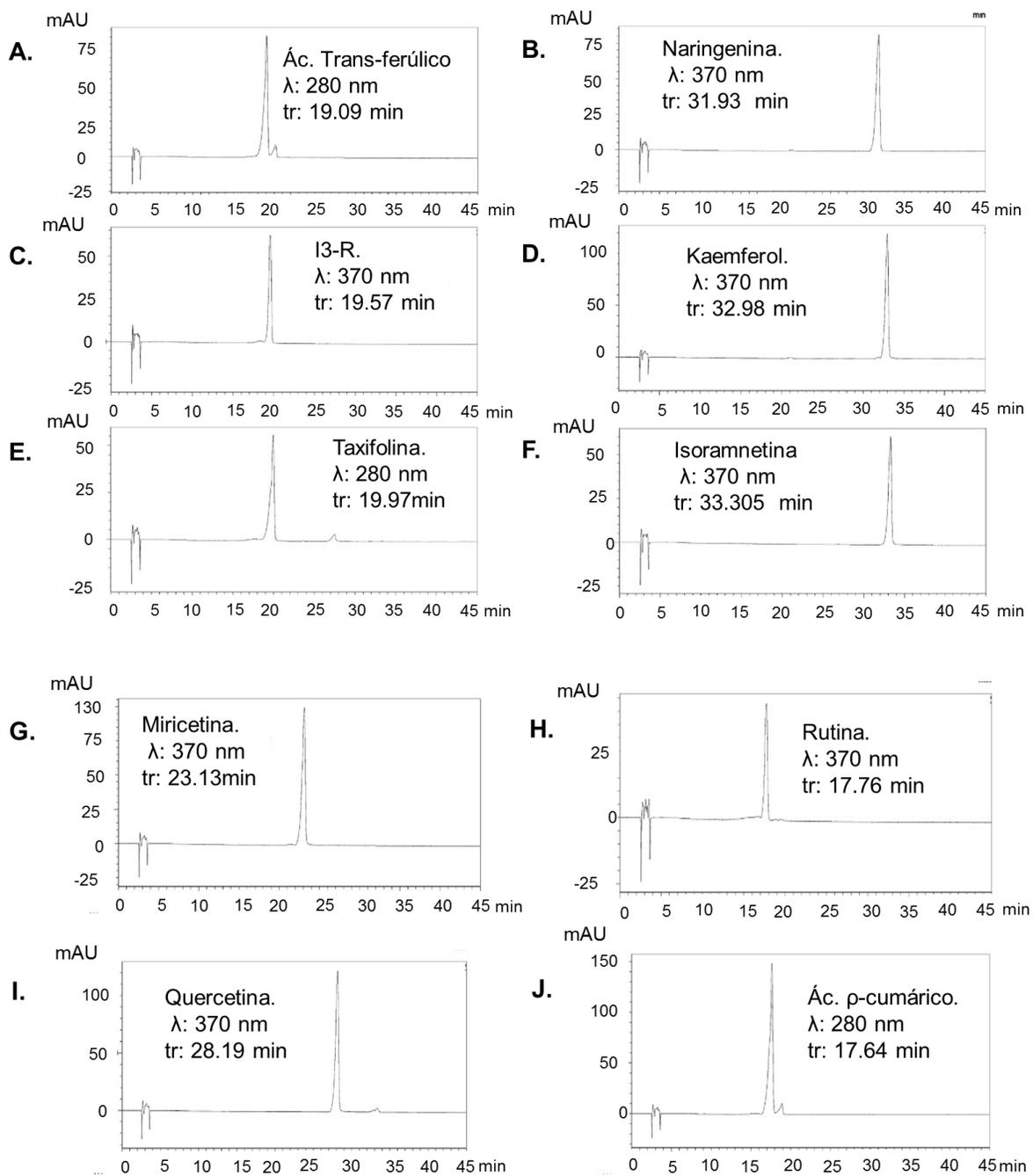


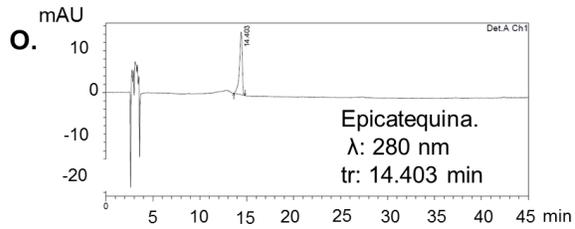
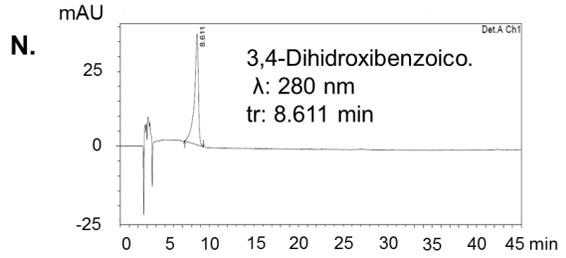
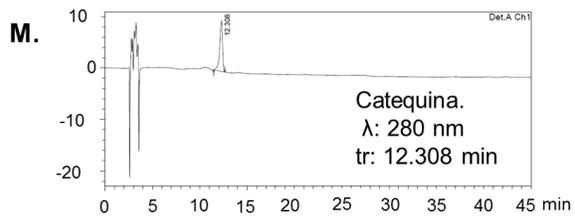
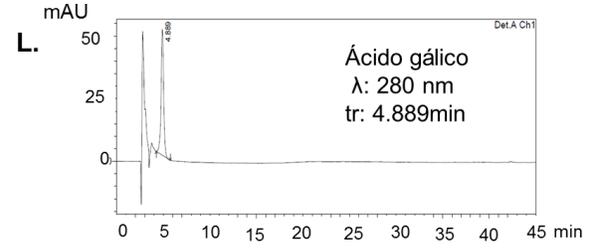
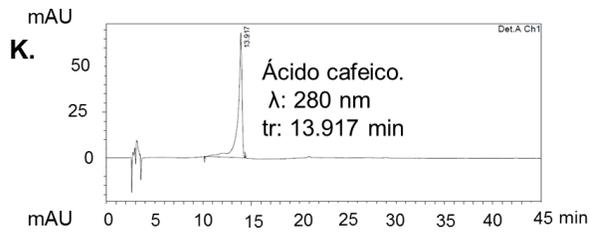
**Anexo 5.** Cromatograma de HPLC de estándares de betaxantina [1 mg/mL] a  $\lambda = 480$  nm.

A) indicaxantina e isoindicaxantina  $C_{14}H_{16}N_2O_6$  y B) Vulgaxantina I  $C_{14}H_{17}N_3O_7$



## Anexo 6. Cromatogramas de HPLC de estándares de compuestos fenólicos





## **Anexo 7.** Lista de productos obtenidos

### **Publicación obtenida de la tesis**

Franco-Vásquez, D., Carreón-Hidalgo, J., Gómez-Linton, D., Román-Guerrero, A., Franco-Vásquez, A., Arreguín-Espinosa, R., Alavez, S., & Pérez-Flores, L. (2022). Conventional and non-conventional extraction of functional compounds from jiotilla (*Escontria chiotilla*) fruits and evaluation of their antioxidant activity. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 22(1), Alim2963. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim2963>

### **Participación en publicaciones**

- Carreón-Hidalgo JP, Román-Guerrero A, Navarro-Ocaña A, Gómez-Linton DR, Franco-Vásquez DC, Franco-Vásquez AM, Arreguín-Espinosa R, Pérez-Flores LJ. Chemical characterization of yellow-orange and purple varieties of *Opuntia ficus-indica* fruits and thermal stability of their betalains. *J Food Sci.* 2022 Dec 16. doi: 10.1111/1750-3841.16421. Epub ahead of print. PMID: 36524774.
- Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications. Carreón-Hidalgo, J. P., Franco-Vásquez, D.C., Gómez-Linton, D. R., and Pérez-Flores, L.J. 2022. *Food Research International*. 151, 110821. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110821>

### **Asistencia a congresos**

- XXVII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Presentación del Cartel “Efecto del extracto de jiotilla (*Escontria chiotilla*) en el periodo de vida, fertilidad y resistencia a radiación ultravioleta en modelo de *Caenorhabditis Elegans*”. 28,29, 30 noviembre, 1 y 2 de diciembre 2022.
- 1 Encuentro internacional de la regencia de farmacia, FUNDES “Impacto en la salud”. Presentación de conferencia: “Actividades biológicas de las betalaínas”. 04 de junio de 2022.
- XXVI Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Presentación del Cartel:” Efecto del extracto de jiotilla (*Escontria chiotilla*) en la resistencia al estrés oxidante y térmico en *Canorhabditis elegans*. 6 al 10 de diciembre 2021.

-XIII Congreso Internacional Virtual, Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los Alimentos en la Industria y Servicios de Alimentación. Presentación de trabajos de investigación modalidad cartel de posgrado con el cartel:” Efecto de los métodos de extracción en el contenido de betalaínas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de frutos de jiotilla (*Escontria chiotilla*). 18 y 19 marzo del 2021.

-XXIV Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Presentación del cartel:” Optimización del proceso de extracción convencional de frutos de pitaya de mayo *Stenocereus pruinosus*. 30 septiembre al 4 octubre 2019.

-XXIII Simposio del Departamento de Ciencias de la Salud. Presentación de trabajo de investigación modalidad cartel: “Compuestos fenólicos, betalaínas y capacidad antioxidante de jiotilla (*Escontria chiotilla*) y pitaya de mayo (*Stenocereus pruinosus*). 22 al 26 octubre 2018.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00278

Matrícula: 2153804189

EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN  
FUNCIONAL DE COMPUESTOS  
ANTIOXIDANTES DE PITAYA DE  
MAYO (*Stenocereus pruinosus*)  
Y JIOTILLA (*Escontria  
chiotilla*)

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 5 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO  
DR. JUAN MANUEL VILLA HERNANDEZ  
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS  
DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

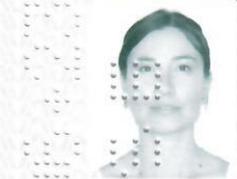
DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: DIANA CAROLINA FRANCO VASQUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*DIANA CAROLINA FRANCO V.*

DIANA CAROLINA FRANCO VASQUEZ  
ALUMNA

REVISÓ

*[Signature]*  
MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DR. JOSE LUÍS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

*[Signature]*  
DRA. ANGÉLICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

*[Signature]*  
DR. JUAN MANUEL VILLA HERNANDEZ

VOCAL

*[Signature]*  
DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUIN  
ESPINOSA DE LOS MONTEROS

SECRETARIA

*[Signature]*  
DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS  
BARRERA