



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y bioaccesibilidad *in vitro* de un jugo combinado de tuna termoultrasonicado”

Tesis para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

L.N. ALEXIS AYALA NIÑO

Directora de Tesis

DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO

Codirectores

Dra. Esther Ramírez Moreno

Dr. José de Jesús Manríquez Torres

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Septiembre de 2015





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
 MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Of. No MCBS/2015/101
 Asunto: Asignación de Jurado de Examen

L.N. Alexis Ayala Niño
 Candidata a Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Identificación de Compuestos Fenólicos, Actividad Antioxidante y Bioaccesibilidad *in vitro* de un Jugo Combinado de Tuna Termoultrasonificado.", con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE DRA. ESTHER RAMÍREZ MORENO

PRIMER VOCAL DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO

SECRETARIO DR. JOSÉ DE JESÚS MANRIQUEZ TORRES

SUPLENTE DRA. RAQUEL CARIÑO CORTES

SUPLENTE DR. ERNESTO ALANÍS GARCÍA



Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
 San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 2 de julio 2015

M.C. ESP. JOSÉ MARÍA BUSTO VILLARREAL
 DIRECTOR

DRA. ARACELI ORTIZ POLO
 COORDINADORA DE POSGRADO ICESA

DR. JUAN ELIEZER ZAMARRIPA CALDERÓN
 COORDINADOR DEL PROGRAMA



Laboratorio de Materiales Dentales /Clínica de Odontología Ciudad del Conocimiento carretera Pachuca Tulancingo Km. 4.5
 Mineral de la Reforma Hgo. C.P. 42184 Tel: (771) 7172000 ext. 6991 correo electrónico mtria_bio_sal@uaeh.edu.mx



Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 552425.

Dedicatorias y agradecimientos

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de esta y todas mis etapas, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de experiencias, aprendizaje y sobre todo felicidad.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional que me otorgaron y el cariño que me inspiraron mis padres, de forma incondicional, entendieron mis ausencias y mis malos momentos. Que a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado para saber como iba mi proceso. Las palabras nunca serán suficientes para testimoniar mi aprecio y mi agradecimiento.

Para mi hermana, por todos estos años de convivencia, pláticas y salidas, que aunque en esta etapa estábamos algo lejos, nunca faltaba una llamada para distraerme y alegrarme el día. Te quiero hermanita.

Para mi hermano, gracias por recibirme cada fin de semana con una sonrisa, con ganas de platicar y pasar tiempo juntos, por compartir tus experiencias y escuchar mis consejos. Te quiero Dano Danonino.

A mi esposo José Antonio Sánchez Franco, compañero de vida, gracias por todo el apoyo y tiempo que haz compartido conmigo, si se pudo, te amo.

Este trabajo de tesis realizado en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron distintas personas opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia y dando ánimo.

A mi directora de tesis, Dra. Nelly Cruz Cansino, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo en persona, por su paciencia ante mi inconsistencia, y por su valiosa dirección y apoyo durante el desarrollo y conclusión de esta tesis.

A mis codirectores de tesis, gracias por el apoyo y visión que compartieron conmigo durante estos dos años.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Opuntia spp.	3
1.1.1 Antecedentes experimentales del género Opuntia spp.	5
1.1.2 Características botánicas de Opuntia ficus-indica	7
1.1.3 Usos y aprovechamiento de Opuntia ficus indica.	14
1.2 Alimentos funcionales.....	15
1.3 Propiedad Antioxidante.	17
1.3.1 Vitamina C (Ácido ascórbico).....	18
1.3.2 Polifenoles.	19
1.3.4 Antioxidantes en la tuna.....	21
1.4 Tecnologías emergentes en alimentos.	24
1.4.1 Ultrasonido	24
1.5. Bioaccesibilidad de polifenoles.....	28
II JUSTIFICACIÓN.	31
III. HIPÓTESIS	31
IV. OBJETIVOS.	32
4.1 Objetivo general.	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS.	33
5.1 Elaboración del jugo y tratamientos.....	34
5.2 Compuestos antioxidante y capacidad antioxidante	34
5.2.1 Determinación de ácido ascórbico.....	34
5.2.2. Determinación de polifenoles totales.....	35
5.2.3 Determinación de Betaláínas.....	35
5.2.4 Determinación de la actividad antirradicalaria por el método DPPH.....	36

5.2.5 Determinación de actividad antioxidante por ABTS ^{•+}	36
5.3 Determinación de bioaccesibilidad intestinal in vitro de compuestos antioxidantes.	37
5.4 Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios	37
5.4.1 Obtención de extractos.....	37
5.4.2 Obtención de compuestos puros.....	38
5.5 Análisis Estadístico.....	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Actividad Antioxidante de Jugos.	39
6.1.1 Ácido Ascórbico	39
6.1.2 Polifenoles Totales	40
6.1.3 Betalaínas	41
6.1.4 Actividad Antioxidante.....	42
6.2 Bioaccesibilidad intestinal in vitro	43
6.2.1 Actividad antioxidante y compuestos antioxidantes del jugo después de digestión in vitro	43
6.2.1.1. Ácido Ascórbico	44
6.2.1.2 Compuestos Fenólicos Totales	45
6.2.1.3. Betalaínas.....	47
6.2.1.4 Actividad Antioxidante	48
6.3 Extractos.....	50
6.3.1 Rendimiento y Actividad Antioxidante	50
6.4 Fracciones	51
6.4.1 Rendimiento y Actividad Antioxidante de las fracciones.....	52
6.5. Descripción de Compuestos Aislados.....	54
6.5.1. Disacárido 1.....	54
6.5.2 β-sitosterol.....	58
VII CONCLUSIONES.....	62
IX BIBLIOGRAFÍA.	64

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Pulpa de distintos colores de la tuna.	7
Figura 2. Principales estados productores de tuna en México, 2013.....	9
Figura 3. Municipios de Hidalgo, productores de tuna, 2013.	10
Figura 4. Estructura del Ácido Ascórbico.	19
Figura 5. Estructura del fenol y principales flavonoles y flavonas en plantas.	20
Figura 6. Cavitación del ultrasonido.....	25
Figura 7. Proceso de absorción, transporte y metabolismo de los compuestos polifenólicos.	29
Figura 8. Metabolismo de quercetin-3- <i>O</i> -rutinosido mediado por bacterias colónicas.....	30
Figura 9. Diseño Metodológico	33
Figura 10. Porcentaje bioaccesible de compuestos y actividad antioxidante.....	47
Figura 11. Actividad Antioxidante por ABTS ^{•+} de extractos de jugos.	51
Figura 12. Actividad Antioxidante por DPPH de extractos de jugos.	51
Figura 14. Actividad Antioxidante por ABTS ^{•+} de fracciones de extracto metanólico.	53
Figura 15. Actividad Antioxidante por ABTS ^{•+} de fracciones de extracto metanólico.	53
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H de α -D-Glucopiranosil-(1→1)- β -D-glucopiranosido ..	55
Figura 17. Espectro de RMN den ¹³ C de α -D-Glucopiranosil-(1→1)- β -D-glucopiranosido	56
Figura 18. Espectro RMN ¹ H β -sitosterol.....	59
Figura 19. Espectro RMN ¹³ C β -sitosterol.....	60

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Especies de la familia <i>Opuntia</i>	4
Tabla 2. Fenoles de harina de cladodios de 7 diferentes <i>Opuntia spp</i> después de hidrólisis ácida	5
Tabla 3. Rango de valores para algunas características físicas de la tuna de diversas variedades.....	8
Tabla 4. Producción, exportación y consumo per cápita en los tres principales países productores de tuna.	9
Tabla 5. Contenido de minerales en pulpa de tuna.	11

Tabla 6. Composición química de 100 g comestibles del fruto de <i>Opuntia ficus indica</i>	11
Tabla 7. Niveles de esteroles y vitamina E, en aceites de pulpa y semilla de tuna	13
Tabla 8. Tuna, Sistema Nacional de Alimentos Equivalentes	13
Tabla 9. Vitaminas y antioxidantes contenidos en la pulpa de la tuna	22
Tabla 10. Vitaminas y antioxidantes en pulpa fresca de tuna verde, púrpura, roja y amarilla	22
Tabla 11. Compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de jugo combinado de tuno con diferentes tratamientos.....	40
Tabla 12. Correlación entre compuestos antioxidantes y actividad antirradical en jugo de tuna combinado.....	43
Tabla 13. Comparación de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de jugo combinado de tuna antes y después de digestión <i>in vitro</i>	45
Tabla 14. Correlación entre compuestos antioxidantes y actividad antirradical después de digestión <i>in vitro</i>	49
Tabla 15. Valores de rendimiento de extractos por disolvente de jugos liofilizados (g/50g).	50
Tabla 16. Valores de rendimiento de fracciones de extracción metanólica (%)	52
Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz de α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-glucopiranosido.....	57
Tabla 18. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz de β -sitosterol en CDCl_3	61

ABREVIATURAS

AA: ácido ascórbico.

ABTS: Ácido 2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico.

AcOEt: acetato de etilo.

BC: betacianinas.

BX: betaxantinas.

Ctl: Control.

DPPH: 2,2-Difenil –1-Picril hidrolizado.

EB/L: Equivalentes de betanina por litro

EI/L: Equivalentes de indicaxantina por litro

PT: Polifenoles totales.

J: Constante de acoplamiento.

MeOH: metanol.

mg EAA/L: miligramos equivalentes de ácido ascórbico por cada litro.

mg EAG/L: miligramos equivalentes de ácido gálico por cada litro.

mg ET/L: miligramos equivalentes de trolox por cada litro.

mg EVC/L: miligramos equivalentes de vitamina C por cada litro.

Past: Pasteurizado.

TUS: Termoultrasonificado.

RESUMEN

México es el país con mayor producción de tuna a nivel mundial, existiendo una pérdida post-cosecha de hasta el 60%. Algunos estudios han considerado a la tuna como alimento de alto valor agregado, por lo que es importante la elaboración de productos a partir de esta materia prima utilizando tecnologías emergentes como la termoultrasonificación. Es importante disponer de estudios que demuestren la optimización de jugos comerciales por lo tanto el objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en compuestos antioxidantes y la actividad antioxidante de jugos de tuna combinado sometidos a pasteurización y termoultrasonificado, sus extractos y fracciones bioaccesibles. El jugo se elaboró con tunas peladas, licuadas y coladas, combinando jugo de tuna púrpura y tuna verde clarificado (6/4 v/v), posteriormente fue sometido a termoultrasonido (TUS, 80% amplitud, 45°C, 15 minutos) o pasteurización (70°C, 30 min). Se evaluaron de cada jugo ácido ascórbico, polifenoles totales, betalaínas y actividad antioxidante por Ácido 2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico y 2,2-Difenil-1-Picril hidrolizado (ABTS y DPPH), de los jugos, así como sus extractos obtenidos por hexano, acetato de etilo y metanol, y de las fracciones bioaccesibles sometidos previamente a digestión *in vitro*. El jugo obtenido por termoultrasonido, presentó valores mayores ($p \leq 0.05$) de contenido total de polifenoles, pigmentos y actividad antirradical respecto al pasteurizado y control. En los extractos, existió un aumento de actividad antioxidante conforme incrementaba la polaridad de los disolventes utilizados. Se aislaron 2 compuestos mayoritarios en los tres jugos (α - β trehalosa y β -sitosterol). Existió una disminución de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante después de que el jugo fue sometido a un proceso de digestión *in vitro*. La cantidad de compuestos y actividad antioxidante bioaccesibles fue mayor en el jugo TUS ($p \leq 0.05$). Se concluye que con el termoultrasonido se obtiene un jugo de mayor calidad en compuestos antioxidantes, comparado con las tecnologías convencionales, ayudando a la liberación de compuestos bioactivos benéficos para la salud del consumidor.

Palabras clave: *Opuntia ficus-indica*, jugo combinado, actividad antioxidante, compuestos con actividad antioxidante, termoultrasonido.

ABSTRACT

Mexico is the country with the highest production of cactus pear worldwide, having a post-harvest lost up to 60%. Some studies have looked at cactus pear as a food with a high added value, that is why it is important the production of products from this raw material using emerging technologies such as thermoultrasound, also it is important to have studies that demonstrate the optimization of commercial juices. Therefore the aim of this study was to assess changes in antioxidant compounds and antioxidant activity in cactus pear juice combined and subjected to pasteurization and thermoultrasound, also their bioavailability of its extracts and fractions. The juice is prepared with peeled cactus pear, blended and strained, combining purple cactus pear juice and clarified green cactus pear juice (6/4 v / v) subsequently underwent to thermoultrasound (TUS 80% range, 45 ° C, 15 minutes) or pasteurization (70 ° C, 30 min). For each juice ascorbic acid, total polyphenols, betalains and antioxidant activity by 2,2 'Azinobis-3-ethyl-6-sulfonic benzotiazolin and 2,2-Diphenyl-picryl -1 hydrolyzate (ABTS and DPPH) of juices and extracts obtained by hexane, ethyl acetate and methanol, and fractions subjected to *in vitro* intestinal bioavailability were evaluated. The juice obtained by thermoultrasound, presented higher values in total polyphenol content, pigments and anti-radical activity compared to pasteurized and control ($p \leq 0.05$). In extracts, there was an increase in antioxidant activity as the polarity of the solvents used increased. Two major compounds were isolated in the three juices (α - β trehalose and β -sitosterol). There was a decrease in antioxidant compounds and antioxidant activity after the juice was subjected to a process of *in vitro* digestion. The amount of compounds and bioavailable antioxidant activity was greater in TUS juice ($p \leq 0.05$). With these results, we concluded that the thermoultrasound juice had a higher quality of antioxidant compounds, compared with juices treated with conventional technologies, helping the release of bioactive compounds beneficial for consumer's health.

Keywords: *Opuntia ficus indica*, antioxidant, combined juice, antioxidant activity, compounds with antioxidant activity, thermo-ultrasound.

I. MARCO TEÓRICO.

1.1 *Opuntia spp.*

El término cactus (*Cactaceae*), se refiere al grupo de aproximadamente 1600 especies en 130 géneros subdivididos en tres subfamilias: *Perekioideae*, *Opuntioideae* y *Cactoideae*. El más común y esparcido es el género *Opuntia*, el cual cuenta con 300 especies de las cuales cerca de 100 han sido encontradas de forma natural en México, siendo 60 de éstas endémicas (1). La tuna (*Opuntia spp.*) y la cholla (*Cylindropuntia spp.*) son las especies que representan la mayoría de la familia *Opuntia* de los cuales están enlistados en la tabla 1 (2).

México tiene la mayor diversidad y abundancia de especies y cultivares de *Opuntia* a nivel mundial (aproximadamente 150), por lo cual se le considera como centro de origen y dispersión de la especie (3), sin embargo hoy en día se les puede encontrar en todos los continentes en una gran variedad de condiciones agroclimáticas, ya sea en forma silvestre o cultivada (4). Estas son plantas carnosas, arborescentes, arbustivas o rastreras, y se caracterizan por tener tallos o cladodios en forma de paletas que son planos y articulados, llamados comúnmente pencas o cladodios, y alcanzan hasta los 70 cm de longitud. También cuenta con flores que son generalmente hermafroditas y solitarias, se desarrollan normalmente en el borde superior de las pencas y su color es variable: rojas, amarillas, blancas, entre otros. En la mayor parte del mundo la planta florece una vez al año, de la cual se crea su fruto, comúnmente llamado tuna (3).

Tabla 1. Especies de la familia *Opuntia*

Subgénero <i>Opuntia</i>	Localización
<i>Opuntia basilaris</i>	Sudoeste de EUA y noroeste de México.
<i>Opuntia chlorotica</i>	Nativa del sudoeste de EUA y de los desiertos de Mojave, Sonora, México.
<i>Opuntia engelmannii</i>	México.
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Originaria de sur-centro de México, cultivada en regiones cálidas del mundo por su fruto comestible.
<i>Opuntia fragilis</i>	Grandes llanuras del este de la Columbia Británica.
<i>Opuntia humisfisa</i>	A lo largo de las llanuras del Este de EUA, al sur de Ontario.
<i>Opuntia leucotricha</i>	Montañas del centro de México.
<i>Opuntia macrocentra</i>	Sudoeste de EUA y norte de México.
<i>Opuntia macrorhiza</i>	Llanuras de norte de EUA.
<i>Opuntia microdasys</i>	México (Hidalgo).
<i>Opuntia santa-rita</i>	Texas, Arizona y norte de México.
<i>Opuntia stricta</i>	Regiones costeras.
<i>Opuntia polycantha</i>	Arizona, Colorado, Utah y Norte de México.
<i>Opuntia phaeacantha</i>	Arizona, Texas, Utah y Norte de México.

Fuente: Modificada de Shaw y colaboradores, 2014.

1.1.1 Antecedentes experimentales del género *Opuntia* spp.

Esparza-Sandoval (2010), realizó una búsqueda de las especies de *Opuntia* en México, revisando 3 bases de datos naturales nacionales e internacionales, estudio en el que encontró 83 especies de *Opuntia*, 6 de las cuales están reconocidas en el género *Nopalea*, y de las restantes son *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia streptacantha*, *Opuntia tomentosa*, *Opuntia pubescens* y *Opuntia robusta*, las que cuentan con mayores registros en las bases de datos naturales (5).

Estudios han demostrado que las especies de este género son ricas en polifenoles, Santos-Sea y colaboradores (2011), realizaron la comparación entre harina de cladodios de 7 diferentes *Opuntias* spp. En la tabla 2 se ilustra el contenido de polifenoles en dicho estudio (6).

Tabla 2. Fenoles de harina de cladodios de 7 diferentes *Opuntia* spp después de hidrólisis ácida

	Agliconas µg/g		% de glucósido remanente después de hidrólisis					
	K	I	IG1	IG2	IG3	KG1	IG5	IG6
1	1.8±.3	0.00±0.0	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2	54±5	583±122	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	11±2
3	42±4	59±15	NE	NE	NE	NE	311±31	380±75
4	12±2	327±74	1.7±.4	NE	8±0.6	74.6±32	1016±183	NE
5	28±4	200±24	0.0	NE	NE	0.0	0.4±0.8	56±21
6	45±1	99.±47	0.0	0.0	NE	0.0	0.0	0.0
7	39±6	418±9	0.0	61±9	12±6	0.0	27±24	38±9

1. *Opuntia lindheimeri* Englem. 2. *Opuntia robusta*, 3. *Opuntia streptacantha*, 4. *Opuntia undulata*, 5. *Opuntia rastrera*, 6. *Opuntia robusta*, 7. *Opuntia leucotricha*. NF, No encontrado. K, Keampferol; I, Isorhamnetina; IG1, Isorhamnetina-glucosil-ramnosil-ramnósido; IG2, Isorhamnetina-glucosil-ramnosil-pentósido; IG3, Isorhamnetina-hexosil-hexosil-pentósido; KG1, Keampferol-gucosil-ramnosido; IG5, Isorhamnetina-glucosil-ramnosido; IG6, Isorhamnetina hexosil-pentosido. NE= No Encontrado.

Fuente: Modificado de Santos-Sea y colaboradores, (2011).

No solo los cladodios son ricos en compuestos con actividad biológica, Elhadi y colaboradores (2011), evaluaron los compuestos bioactivos y actividad antioxidante de 10 cultivares y líneas de tunas *Opuntia spp*, en el que hallaron que la tuna es un fruto con elevadas cantidades de compuestos bioactivos (7).

A pesar de los compuestos encontrados en el género *Opuntia*, son pocos los estudios realizados respecto a sus efectos biológicos, siendo el uso más común el efecto hipoglucemiante que se ha observado tras el consumo de los cladodios y frutos de *Opuntia streptacantha*, *Opuntia megacantha* y *Opuntia fuliginosa*, esto debido a su alto contenido en inulina (8-10) . Sin embargo, el consumo de extracto de gladiolo de *Opuntia megacantha*, puede resultar nefrotóxico, ya que se observó un incremento plasmático de urea y creatinina, y una disminución de Na^+ , después de 5 semanas de consumo por ratas diabetizadas y no diabetizadas (8).

También se ha evaluado el efecto protector contra la oxidación en enfermedades como la hipercolesterolemia familiar en pacientes jóvenes, observando disminución de factores de oxidación Protagrandila 8-Epi F2 Alfa, indicador de oxidación *in vivo*, así mismo existió una disminución de lipoproteínas de baja densidad (LDL), sin afectar el peso o la composición corporal del paciente, dichos efectos se encontraron después de un consumo habitual durante al menos 5 semanas del fruto de *Opuntia robusta* (11). Otro efecto biológico encontrado en *Opuntia robusta*, es su efecto antiproliferativo en células de cáncer de colón, esto debido a su alto contenido en pigmentos naturales, como lo son las betalainas (12).

Loro y colaboradores (1999), estudiaron la *Opuntia dillenii* y sus efectos antiinflamatorio y analgésico en ratas, atribuyéndole al extracto acuoso de esta *Opuntia* la disminución de edema inducido y al dolor (químico y térmico) de manera dosis-dependiente (13).

A pesar de la gran variedad de especies *Opuntia* que existen en México y de los distintos compuestos bioactivos que las conforman, *Opuntia ficus-indica* es aquella cuyo origen antropogénico la hace la *Opuntia* de mayor consumo, no solo en México, si no en el mundo (14).

1.1.2 Características botánicas de *Opuntia ficus-indica*

La tuna es una baya carnosa, esférica, cilíndrica o piriforme, presenta en el extremo apical una depresión a la que se denomina “ombbligo” de profundidad variable, mayor en los frutos piriformes y menor en los esféricos. Sus dimensiones, dulzor y coloración varían según la especie; presentan espinas pequeñas, finas y frágiles de 2 a 3 mm de longitud, pulpa gelatinosa, de cáscara gruesa, cubierta de gloquidios. Se pueden encontrar en diversos colores como amarillo, anaranjado, rojo, guinda, rojo-morado, verde y blanco verdoso (figura 1) (14).



Figura 1. Pulpa de distintos colores de la tuna.

La tuna presenta diferentes características dependiendo de la subespecie a la cual se esté refiriendo; de acuerdo con un estudio hecho por Reyes-Agüero y colaboradores (2005), donde se evaluaron 38 variantes de tuna en México, las características de las variedades comercializadas se encuentran descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Rango de valores para algunas características físicas de la tuna de diversas variedades.

Características	Rango de valores
Peso Total	40-190 g
Peso de la cáscara	14-100 g
Peso de la pulpa	45-130 g
No de semillas	65-480
Diámetro de la semilla	0.1-0.5 cm
Longitud del fruto	6-10 cm
Diámetro del fruto	3.5-6.5 cm

Fuente modificada de Reyes-Agüero y colaboradores, 2004.

Son varios los países que la producen y exportan, siendo México el país con mayor producción y consumo *per cápita* (tabla 4). En la mayoría de los países productores, la tuna se considera un producto secundario de nopaleras dedicadas a la producción de forraje y/o conservación de suelos (15). En México, se produce principalmente en la zona centro del país (4), en la figura 2 se ilustran las principales entidades productoras de tuna.

El estado de Hidalgo ocupó el cuarto lugar en producción de tuna con un total de 15,021.64 toneladas (ton) en 2013, superado por los estados de Estado de México (188,947.69 ton), Zacatecas (167,111.27 ton) y Puebla (83,292.75 ton) (16).

Tabla 4. Producción, exportación y consumo per cápita en los tres principales países productores de tuna.

País	Superficie de producción (hectárea)	Producción (ton/año)	Exportación (ton/año)	Consumo per cápita (kg/persona)
México	72500	489500	7500	4.38
Italia	2500	50000	15000	0.61
Sudáfrica	1500	15000	250	0.4

Fuente: Flores-Valdez y colaboradores, 1995.

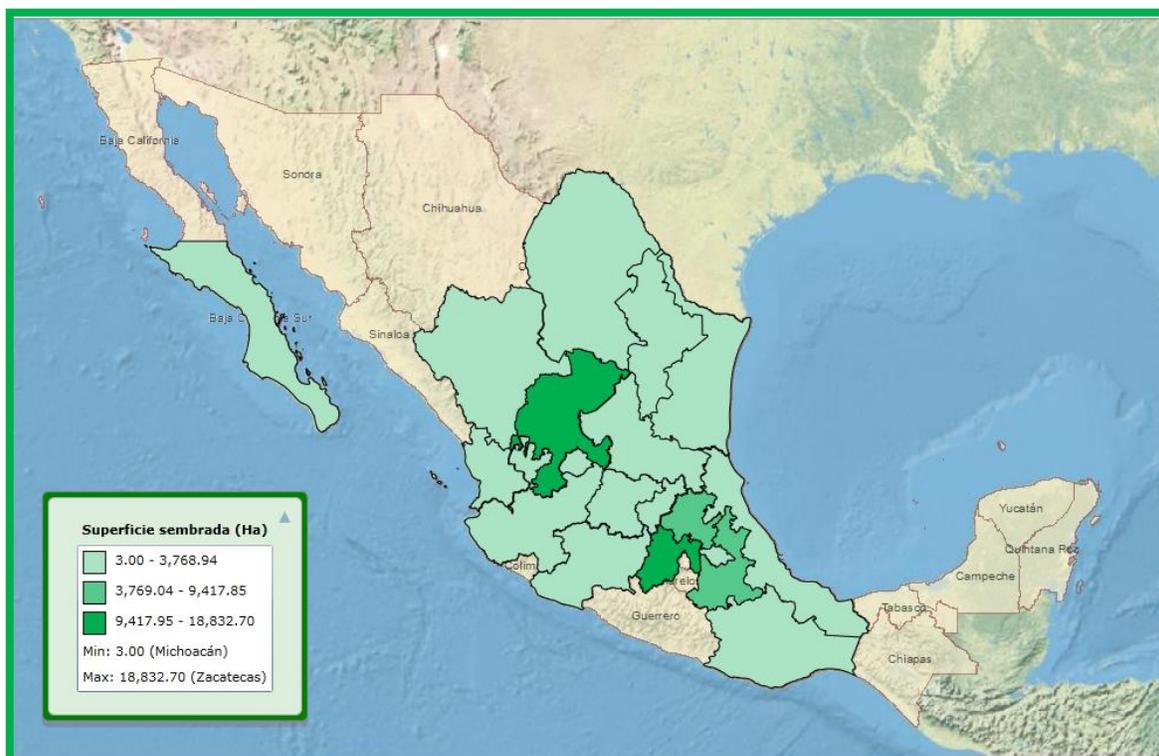


Figura 2. Principales estados productores de tuna en México, 2013.
Fuente: SIAP, 2013.

En Hidalgo, la producción de tuna se encuentra en el Sur y Sureste del estado, siendo los municipios de Actopan (5,475 ton), San Agustín Tlaxiaca (4,441 ton) y Zempoala (3,075 ton) los de mayor producción, como se puede observar en la figura 3 (16).

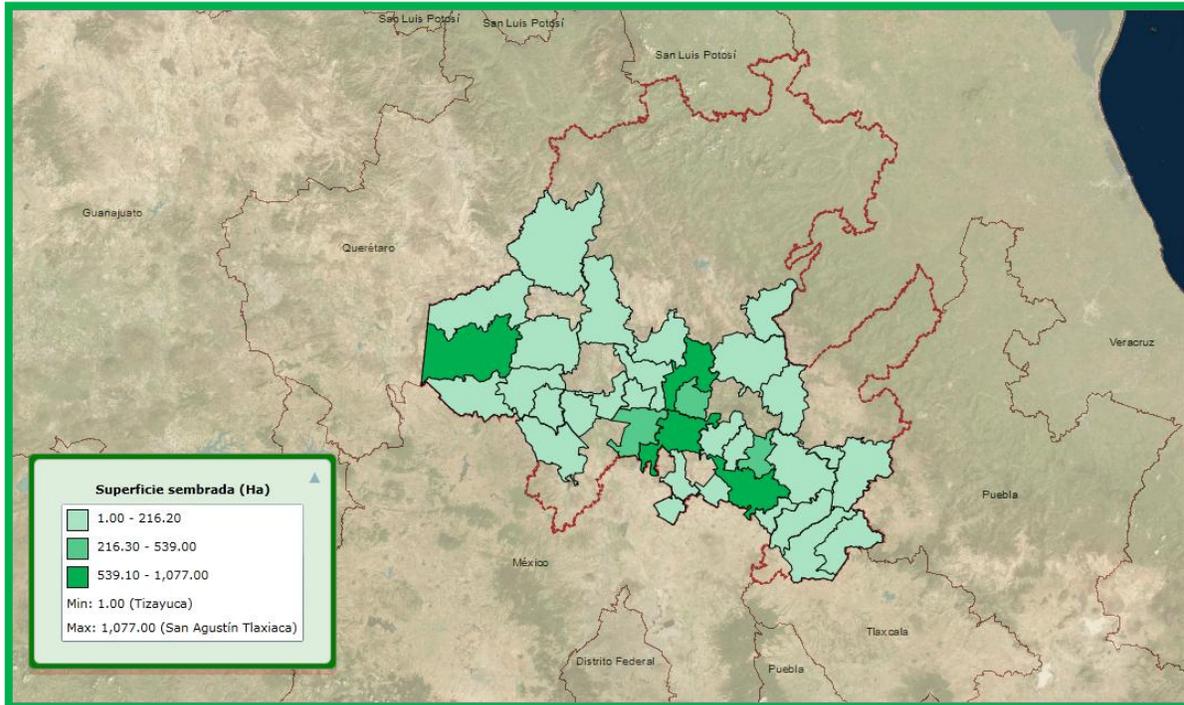


Figura 3. Municipios de Hidalgo, productores de tuna, 2013.
Fuente: SIAP, 2013.

El fruto es utilizado desde tiempos prehispánicos como materia prima importante en la dieta de la población y en la economía agrícola (17), dado que la pulpa de la fruta es considerada una buena fuente de minerales, especialmente calcio, potasio y magnesio, y vitaminas (tabla 5 y 6) (18). Su alto contenido en azúcares y su poca acidez lo hacen un fruto delicioso, el cual está compuesto por un sencillo patrón de glucosa y fructosa aparentemente en cantidades iguales (19). Respecto a ácidos orgánicos, contiene principalmente ácido cítrico (20). Debido a su alto contenido en agua, tiene un valor calórico total de 50-80 kcal/100g característica que lo hace comparable con otros frutos como las peras y naranjas (21).

Tabla 5. Contenido de minerales en pulpa de tuna.

Mineral	mg/100g en pulpa fresca de tuna
Calcio (Ca)	12.8-59
Magnesio (Mg)	16.1-98.4
Potasio (K)	90-220
Fósforo (P como PO4)	15-32.8
Sodio (Na)	0.6-1.1
Hierro (Fe)	0.4-1.5

Fuente: Abdel-Hameed y col. 2014.

Tabla 6. Composición química de 100 g comestibles del fruto de *Opuntia ficus indica*.

Compuesto	Cantidad
Agua	85%
Kilocalorías	68 kcal.
Carbohidratos Totales	11 g
Fibra total	1.8 g
Cenizas (g)	1.6
Vitaminas	
• A (UI)	40
• Riboflavina (mg)	0.02
• Niacina (mg)	0.3
• Ácido Ascórbico (mg)	30

Fuente: Cantwell, 2004.

Por otro lado, varios autores han sugerido que la tuna es una buena fuente de aceites (22, 23) (tabla 7). La pulpa de la fruta proporciona rendimientos muy bajos (0.1-1.0%), representando cerca de 8.7 g de los aceites totales en 1 kg de materia seca, comparado con 1kg de semillas que tiene un rendimiento aproximado de 98.8 g de aceite. Además, se ha demostrado que el aceite de pulpa tiene una cantidad significativa de lípidos polares (fosfolípidos) los cuales representan el 52.9% de los lípidos totales, mientras que las semillas tiene una cantidad significativa de lípidos neutros: oleato de colesterol (C18: 1, cis-9), ácido oleico (C18: 1 cis-9), ácido oleico éster metílico de (C18: 1, cis-9), trioleina (C18: 1, cis-9); representando el 87% de los lípidos totales. Ambos aceites son una fuente rica en ácidos grasos esenciales y esteroides. Por último, la cáscara contiene aproximadamente 36.8 g de aceite por kilogramo (22). Es importante mencionar, que las vitaminas liposolubles como alfa-, beta-, delta y gama- tocoferoles, vitamina K1 y beta-caroteno, se encuentran relacionados con las semillas de la fruta así como los aceites contenidos en la pulpa, los cuales tienen la capacidad de proteger los aceites de la oxidación. El contenido de ácidos grasos de las semillas de tuna, se puede comparar con la composición de semillas de girasol así como con las semillas de uva (24). No obstante, los niveles de lípidos totales, esteroides y vitaminas liposolubles, dependerá del cultivar, grado de maduración, procesamiento de la fruta y las condiciones de almacenamiento (22).

Debido a su sabor peculiar y el contenido nutricional, los usos y aprovechamientos de la fruta son principalmente en el fruto fresco. En el Sistema Nacional de Alimentos Equivalentes, se recomienda el consumo de dos tunas para cubrir con un equivalente de fruta (250 g), con el que se obtiene 56 kcal, 1 g de proteína, 13.2 g de carbohidrato y 0.7 g de lípidos, siendo catalogada como un fruto con un alto valor en fibra, ácido ascórbico y potasio (Tabla 8) (25).

Tabla 7. Niveles de esteroides y vitamina E, en aceites de pulpa y semilla de tuna

Compuestos		Aceite de semilla (g/100g)	Aceite de pulpa (g/100g)
Campesterol		1.66	8.74
β -sitosterol		67.5	11.2
Vitamina E	• Alfa-tocoferol	0.56	8.49
	• Beta-tocoferol	0.12	1.26
	• Gama-tocoferol	3.3	0.79
	• Delta-tocoferol	0.05	42.2

Fuente: Ramadan y colaboradores, 2003.

Tabla 8. Tuna, Sistema Nacional de Alimentos Equivalentes

Compuesto	Concentración
Energía (Kcal)	56
Proteína (g)	1
Lípidos (g)	0.7
Carbohidratos (g)	13.2
Fibra (g)	5.0
Vitamina A (μ g RE)	6.9
Ácido ascórbico (mg)	19.3
Ácido Fólico (mg)	0
Hierro NO HEM (mg)	0.4
Potasio (mg)	302.5

Fuente: Sistema Nacional de Alimentos Equivalentes.

Sin embargo, durante su procesamiento (cosecha, almacenamiento y conservación) existen pérdidas de hasta el 60%, ya que es una fruta estacional y su vida de anaquel varía entre 7 y 15 días (15), por lo que es importante el desarrollo de productos industrializados a partir de tuna, y así contar con un mayor uso y aprovechamiento de este fruto.

*1.1.3 Usos y aprovechamiento de *Opuntia ficus indica*.*

El uso integral de esta especie representa un gran atractivo para el sector agroindustrial. Algunos sectores que pueden beneficiarse con productos obtenidos a partir de la planta antes descrita, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) son (26):

- Agroindustria de alimentos y bebidas para consumo humano (producción de diversos alimentos como encurtidos, mermeladas, jugos, néctares, productos deshidratados, concentrados, jarabes, bebidas alcohólicas y no alcohólicas de tuna y nopalitos);
- Agroindustria de alimentos para animales (suplementos y piensos de pencas y de desechos de la industria procesadora de tuna, como las cáscaras y semillas);
- Industria cosmética (cremas, shampoo y lociones);
- Industria productora de aditivos naturales (gomas de cladodios; colorantes de la fruta);

El consumo de tuna se concentra en la región centro, en el altiplano, excluyendo a los estados costeros y las regiones tropicales. Lo que se puede explicar por los patrones culturales y la falta de distribución eficiente del producto en estas regiones, esto significa que existen mercados insatisfechos en el sur y norte del país (4). Y aunque el consumo de tuna no es elevado, ha sido objeto de estudio sobre su actividad antioxidante con la finalidad de producir alimentos funcionales con un alto valor agregado; con ello diversificar su comercialización y aumentar su producción (27). Por otro lado, en México no existe una industria procesadora de tuna, los factores que han inhibido su desarrollo, radican en gran medida en los problemas tecnológicos para la elaboración de néctares y jugos, en especial la eliminación de la semilla y la obtención de un producto homogéneo y estable (15).

A pesar de ello, la industria de jugos y néctares, en México, se ha mostrado en los últimos años como uno de los sectores económicos más dinámicos, y como una de las más importantes dentro del segmento de conservas alimenticias. Dicho dinamismo se ha visto acompañado con una mayor diversidad de productos, creando más competencia entre las empresas participantes, lo que se ha reflejado en un mayor beneficio al consumidor al contar con un alimento de calidad y variedad en presentaciones. Las categorías que muestran mayor participación en el volumen total de ventas son jugos con 2,215 millones de pesos, néctares con 2,715 millones de pesos y bebidas de fruta con 1,936 millones de pesos (28). Debido al crecimiento estable en la industria de los jugos en México y las características nutrimentales y funcionales de la tuna, lo hace una buena opción para diversificar el consumo de este fruto.

1.2 Alimentos funcionales.

Aunque en la actualidad sigue sin existir una definición puntual del concepto alimento funcional, el Consejo de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina de Estados Unidos, lo definió como “cualquier alimento o ingrediente que puede proporcionar un beneficio para la salud más allá de los nutrientes que tradicionalmente contiene” (29).

El primer término usado para este tipo de alimentos en los Estados Unidos fue el de "alimentos diseñados", utilizado en 1989 por el Dr. Herbert Pierson, Director del Programa de Alimentos Diseñados del Instituto Nacional de Cáncer, para describir aquellos alimentos que contienen naturalmente o que son enriquecidos con componentes químicos, biológicamente activos pero no nutritivos, provenientes de plantas (fitoquímicos), efectivos en la reducción de los riesgos al cáncer. Ese mismo año, el Dr. Stephen DeFelice, Director de la Fundación de Medicina Innovativa, crea el término "nutracéutico" para referirse a "cualquier sustancia que pueda ser considerada como alimento o como parte de un alimento y que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad" (30). Con el paso del tiempo, otros términos creados para caracterizar los "alimentos funcionales" incluyen:

- Alimentos genéticamente diseñados
- Farmacoalimentos

- Fitoalimentos, fitonutrientes
- Sustancias fitogénicas
- Alimentos rendimiento
- Alimentos inteligentes
- Alimentos terapéuticos
- Alimentos de valor añadido
- Alimentos genómicos
- Prebióticos/Probióticos
- Fuentes fitoquímicas
- Alimentos superiores
- Alimentos hipernutritivos
- Por último hasta el término "alimentos reales" (presentado en una revista promotora de fisicoculturismo) (31).

De acuerdo al sistema japonés de Alimentos de Uso Exclusivo para la Salud (FOSHU), describe 11 categorías de ingredientes con actividad fisiológica (32).

- Fibras alimentarias.
- Oligosacáridos.
- Alcoholes derivados de azúcares.
- Ácidos grasos poliinsaturados.
- Péptidos y proteínas.
- Glucósidos, isoprenoides y vitaminas.
- Alcoholes y fenoles.
- Colinas (lecitina).
- Bacterias del ácido láctico.
- Minerales.
- Otros.

El éxito actual de la industria alimentaria depende de la capacidad de adaptación e innovación de productos de calidad, que satisfagan las expectativas y necesidades de los consumidores, buscando el bienestar físico del consumidor (33). El término "fitoquímicos"

constituye la evolución más reciente del término "alimentos funcionales" y enfatiza las fuentes vegetales de la mayoría de los compuestos preventivos de enfermedades, esto debido a que el consumo de dietas con alto contenido en productos de origen vegetal, es considerado como medio de protección contra enfermedades crónicas especialmente cáncer (34, 35).

Dentro de los fitoquímicos se encuentran los terpenos en los que destacan los carotenoides; los polifenoles como la quercetina; los tioles y tocoferoles. Estos compuestos han sido estudiados por su función como antioxidantes, protegiendo a los lípidos, a la sangre y a otros fluidos corporales contra el ataque de radicales libres, algunas especies de oxígeno reactivo, grupos hidroxilos, peróxidos y radicales superóxidos (36).

1.3 Propiedad Antioxidante.

Los antioxidantes podrían ser categorizados como alimento funcional, esto porque son ingredientes naturales con función fisiológica importante, debido a que los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno (ERO's), son balanceados por la acción de antioxidantes, los cuales son moléculas que neutralizan a los radicales libres, aceptando o donando electrones para eliminar su condición impar. Los antioxidantes actúan directamente con los radicales reactivos y los inhibe, con lo que estos se convierten en nuevos radicales menos activos, con vida más larga y menos dañinos que aquellos radicales que neutralizaron. Estos al mismo tiempo serán inhibidos por otros antioxidantes u otros mecanismos para terminar con su estado radical (37).

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas con uno o más electrones no apareados en las órbitas de valencia, estas son moléculas muy inestables y muy reactivas, ya que tienden a capturar un electrón de otras moléculas generando a su vez su oxidación formando nuevos radicales (38). Los ERO's contienen radicales libres y formas reactivas de oxígeno. Los radicales libres son producidos por una transferencia de electrones que requiere un alto consumo de energía, como puede resultar con un deportista. Cuando existe una mayor ingesta o bien una mayor producción de ERO's se origina lo que se conoce como estrés oxidativo, el cual ha sido implicado en el desarrollo de enfermedades crónico

degenerativas, es por esto que el exceso de ERO's y otros radicales libres, se relacionan como inductores de daño tisular en condiciones patológicas severas (39, 40).

La obesidad es un problema importante debido a que esta, junto con la trigliceridemia, colesterolemia, presión alta y/o glucosa plasmática alta, son las responsables del síndrome metabólico (41), el cual entre otras cosas, aumenta las reacciones de óxido-reducción produciendo radicales libres, los cuales afectan las membranas mitocondriales de la célula, incrementando el estrés oxidativo y por ende existe una disfunción orgánica (42).

Otra enfermedad no transmisible o crónico degenerativas es el cáncer, el cual es la tercera causa de muerte en México y según estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer, cada año se suman más de 128,000 casos de mexicanos (43, 44). Cabe mencionar, que un microambiente con una continua producción de ERO's, es idónea para el crecimiento de células cancerosas (45).

De la misma forma que los radicales libres, los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos (46). Los antioxidantes exógenos se obtienen a través de la dieta, lo cual indicaría que una dieta saludable ayudaría a contrarrestar los efectos dañinos de los radicales libres. Algunos de los compuestos que se encuentran en la dieta no neutralizan los radicales libres, sin embargo mejoran la actividad de antioxidantes endógenos, clasificándolos de la misma forma como antioxidantes exógenos (47).

Existe un interés creciente en el estudio de la composición química de las plantas, debido precisamente a las propiedades de algunos componentes que pueden inhibir, interrumpir o frenar los procesos oxidativos y contrarrestar la actividad de los radicales libres (48).

Los compuestos antioxidantes que podemos encontrar en las plantas son la vitamina C o ácido ascórbico y los polifenoles.

1.3.1 Vitamina C (Ácido ascórbico).

La vitamina C contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico, la estructura de la lactona y dos grupos hidroxilos enólicos, así como un grupo alcohol primario y secundario. La estructura endiol motiva sus cualidades

antioxidantes, ya que los endioles pueden ser oxidados fácilmente a dicetonas (Figura 4). La vitamina C es hidrosoluble la cual juega un papel importante en la protección de organelos del daño ocasionado por la oxidación, por lo que es más abundante en tejidos como pulmones, cerebro y ojos, en los que la producción de ERO's es más importante (49). En los fluidos, la vitamina C tiene la capacidad de neutralizar ERO's dentro de las células, refuerza la acción de la vitamina E por regenerar su forma activa después de que han reaccionado con los ERO's, también poseen la capacidad de atrapar los iones de cobre, que tienen una acción oxidante importante (50).

Figura 4. Estructura del Ácido Ascórbico.
Fuente: Nikolaidis y colaboradores, 2012.

1.3.2 Polifenoles.

Los polifenoles son metabolitos secundarios obtenidos de las plantas y juegan un rol importante en la protección de la salud, ya que tienen importantes propiedades antioxidantes y actividad biológica (48). Los principales tipos de polifenoles son flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, chalconas, auronas e isoflavonas, siendo los flavonoles (quercetina, kaempferol, isorhamnetina) y los flavonas (apigenina, luteolina), las dos clases principales de polifenoles, todos estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura un grupo fenólico, los cuales poseen un anillo bencénico con al menos un grupo hidroxilo, y se clasifican por el número de anillos bencénicos y ubicación de grupos hidroxilo (figura 5) (51).

Los beneficios de los polifenoles han sido probados en diferentes estudios, tanto en condiciones *in vitro* como en condiciones *in vivo*. Tamura y colaboradores (2013), utilizaron los polifenoles de la cáscara de cacahuate para la disminución de colesterol *in vitro*, obteniendo como resultado la disminución del colesterol en el medio (52). Diversos estudios realizados *in vivo* tanto en ratas como en humanos, han obtenido resultados favorables contra cáncer, colesterolemia, y diabetes, así mismo han mostrado efectos cardioprotectores, antimicrobianos y antivirales (53).

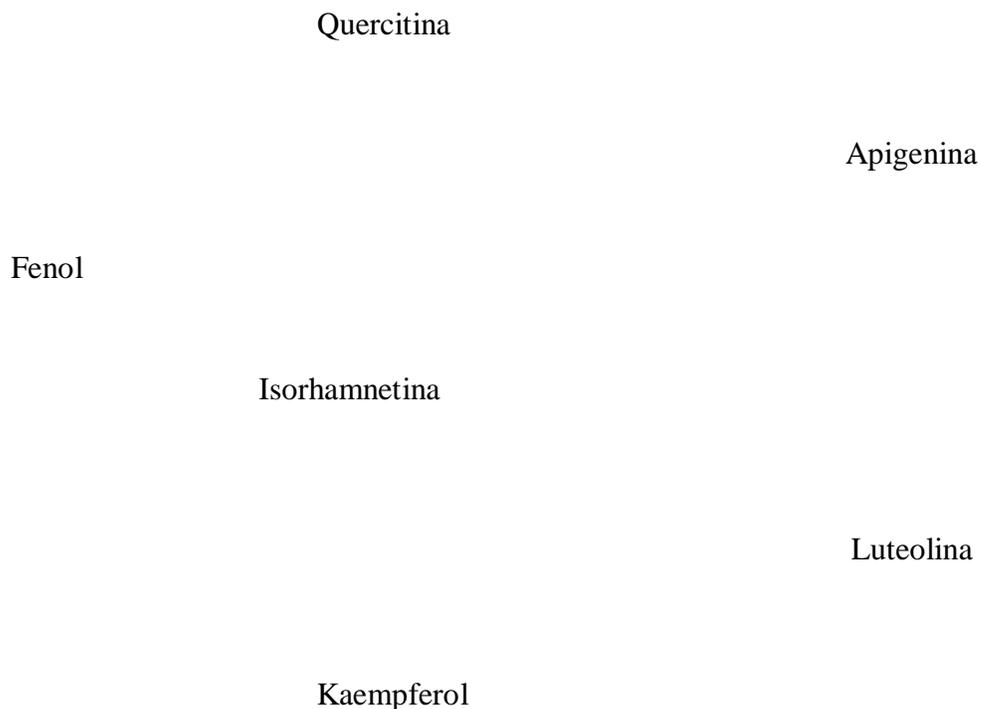


Figura 5. Estructura del fenol y principales flavonoles y flavonas en plantas.
Fuente modificada de: Pasinetti y colaboradores, 2012.

1.3.4 Antioxidantes en la tuna

Han sido varios los estudios realizados en la tuna para la determinación de sus compuestos bioactivos, elaborados tanto en la cáscara como en la pulpa de la fruta, así como en las distintas variedades de tunas que existen. El kaempferol, es el flavonoide que se encuentra en tres distintos tipos de tuna, tanto en tuna de cáscara verde, púrpura y roja, sin embargo, la isorhamnetina solo se encuentra en la tuna con cáscara verde y púrpura. Por otro lado, la tuna con cáscara roja contiene más ácido ascórbico, mientras que las tunas con cáscara amarilla contienen más carotenoides. La actividad antioxidante de los extractos de tuna púrpura es más alta, esto causado a su alto contenido de flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y betalaínas (54, 55).

Por otro lado, un estudio analítico realizado por Fernández-López y colaboradores (2010), para determinar los compuestos antioxidantes y su capacidad antioxidante *in vitro*, establecieron que la tuna posee una importante capacidad antioxidante, al igual que un alto contenido de taurina, así como porcentajes importantes de ácido ascórbico y polifenoles (56), en los que destacan los fenoles y los ácidos fenólicos (57), también contiene pigmentos con importante actividad antioxidante, como las betalaínas (58). En la tabla 9, se puede observar el rango en que varían las tunas en contenido de vitaminas y antioxidantes, encontrándose el ácido ascórbico entre 12 y 80 mg por cada 100 g de pulpa, siendo los derivados de quercetina los flavonoles con mayor concentración en la tuna, entre 0.9 y 0.98 g (20, 59). Por otro lado, en la tabla 10 se describen cuatro diferentes tipos de tunas, tuna verde, púrpura, roja y amarilla en contenido de vitaminas y antioxidantes, siendo la tuna roja la que contiene la mayor cantidad de ácido ascórbico y Kaempferol, hasta 815 y 3.8 µg/g respectivamente (54).

Al encontrarse compuestos con importante actividad biológica en la fruta, se realizaron otros estudios referidos a su bioaccesibilidad y a los efectos que puede tener, tanto en forma *in vitro* como *in vivo*. Encontrando que entre el 69-83% de polifenoles disponibles en la pulpa, y del 0-14% de polifenoles disponibles en las semillas de la tuna son bioaccesibles, esto en un modelo de digestión *in vitro* (60). En pruebas *in vivo*, se ha comprobado un importante factor hepatoprotector, neuroprotector y diurético (61-63).

Tabla 9. Vitaminas y antioxidantes contenidos en la pulpa de la tuna

Compuesto	Por cada 100g de pulpa
Ácido ascórbico	12-81 mg
Carotenoides totales	0.29-2.37g
• Beta caroteno	1.2-3 µg (microgramos)
Vitamina E total	111-115 µg
Vitamina K	53 µg
Flavonoles	
• Derivados del keampferol	0.11-0.38 g
• Derivados de la quercetina	0.98-0.9 g
• Derivados de la isorhamnetina	0.19-2.41 g

Fuente modificada de: Stintzing y col. (2001) y Stintzing y col. (2005).

Tesoriere y colaboradores (2004), realizaron un estudio en el que compararon los efectos del estrés oxidativo, en personas que consumieron jugo de tuna y ácido ascórbico, en la que se comprobó que era mayor la actividad biológica del jugo de tuna que el consumo de la vitamina (64).

Tabla 10. Vitaminas y antioxidantes en pulpa fresca de tuna verde, púrpura, roja y amarilla

Compuesto (µg/g)	Verde	Púrpura	Roja	Amarilla
Ácido ascórbico	458	121	815	437
Carotenoides totales	2.9	6.7	14.6	23.7
Polifenoles totales	69.5±3.8	93.5±12.4	54.8±5.1	9.8±3
• Kaempferol	2.2±0.3	1.1±0.4	3.8±0.5	ND
• Quercetina	43.2±2.5	90.5±11.5	51.0±4.6	9.8±3
• Isorhamnetina	24.1±1	1.9±0.5	ND	ND

Fuente modificada de Kuti (2004).

Debido a su alto contenido en compuestos bioactivos, a que es un fruto estacional y a su poco consumo en todo el país, es importante buscar tecnologías que conserven y no dañen los compuestos que puedan tener actividad biológica en beneficio al consumidor.

Como ya se había mencionado, existen zonas en la república donde el consumo de tuna es nulo, por lo que es importante elaborar un producto que pudiera llevar a distintos lugares los beneficios de esta fruta, siendo primordial el buscar algún método de conservación óptimo, sin embargo las distintas tecnologías convencionales no han sido eficientes, ya que se pierde una importante cantidad de su actividad antioxidante, al mismo tiempo que son bebidas muy inestables, ya que es un fruto con un pH bajo y alto contenido de azúcares (65).

La mayoría de los procedimientos de conservación inhiben agentes o procesos de deterioro. Algunas tecnologías mantienen la frescura del producto, sin embargo otras como las que reducen la actividad de agua o la modificación de pH, la cambian notablemente (66). Ninguna técnica es capaz de garantizar la completa seguridad del alimento, ya que variaciones en las condiciones de preservación, como la rotura de la cadena de frío, la rehidratación, etcétera, pueden suponer el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes. Los tratamientos térmicos por calor (pasteurización, ultrapasteurización, etc.) utilizan temperaturas entre 60 y 145 °C, son los únicos que operan por inactivación y que se usan de forma mayoritaria en la industria alimentaria, sin embargo dichos procesos remueven el flavor y textura de los productos frescos, al mismo tiempo que la gran cantidad de energía que es transferida al alimento durante el proceso, puede desarrollar reacciones indeseables que podría producir la degradación de compuestos bioactivos o la formación de subproductos químicos no deseados (67, 68), lo cual es un problema debido que en las últimas dos décadas, la demanda por el consumidor de alimentos de alta calidad, microbiológicamente seguros y estables, ha despertado un creciente interés en las técnicas de preservación no térmicas capaces de inactivar microorganismos y enzimas, asegurando flavor y texturas más naturales (69).

1.4 Tecnologías emergentes en alimentos.

Debido a lo anteriormente mencionado, existe interés por los nuevos tratamientos de conservación, implicando tecnologías emergentes, algunas de estas se conocen desde hace tiempo, pero no se ha optimizado su uso y la forma de aplicarlas en la preservación de alimentos no resultan suficientemente efectivos, en estas tecnologías se incluyen; altas presiones, irradiación, campos eléctricos de alta intensidad, campos magnéticos oscilantes, luz blanca de alta intensidad, calentamiento no convencional, ultrasonido, etc. (70).

1.4.1 Ultrasonido

Es una tecnología emergente utilizada desde hace más de 30 años en la industria de los alimentos, ésta consiste en someter al alimento a ondas acústicas inaudibles de una frecuencia superior a 20 kHz, sin embargo esta tecnología ha tenido distintos propósitos a través de los años, como lo es la limpieza de instrumentos de laboratorio, el aumentar el campo de extracción de algún componente alimentario, pretratamiento de la cáscara antes de la extracción o la extracción de aceites vegetales, y recientemente, la inactivación microbiana y enzimática (71-76).

Estos diversos usos se deben a que durante la ultrasonificación existe un fenómeno complejo de cavitación gaseosa, que explica la generación y evolución de microburbujas en un medio líquido. La cavitación se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente. Durante la mitad negativa del ciclo de presión, el líquido se encuentra sometido a un esfuerzo tensional y durante la mitad positiva del ciclo experimenta una compresión. El resultado es la formación ininterrumpida de microburbujas, cuyo tamaño aumenta miles de veces (se expanden) en la alternancia de los ciclos de presión. Las microburbujas que alcanzan un tamaño crítico implosionan o colapsan violentamente para volver al tamaño original. La implosión, supone la liberación de toda la energía acumulada, ocasionando incrementos de temperatura instantáneos y focales, que se disipan sin que supongan una elevación sustancial de la temperatura del líquido tratado. Sin embargo, la energía liberada, así como el choque mecánico asociadas al fenómeno de implosión (figura 6), afectan la estructura de las células

situadas en el microentorno, eliminando de esta forma microorganismos, y en algunos casos la liberación de sustancias deseadas (70, 77).

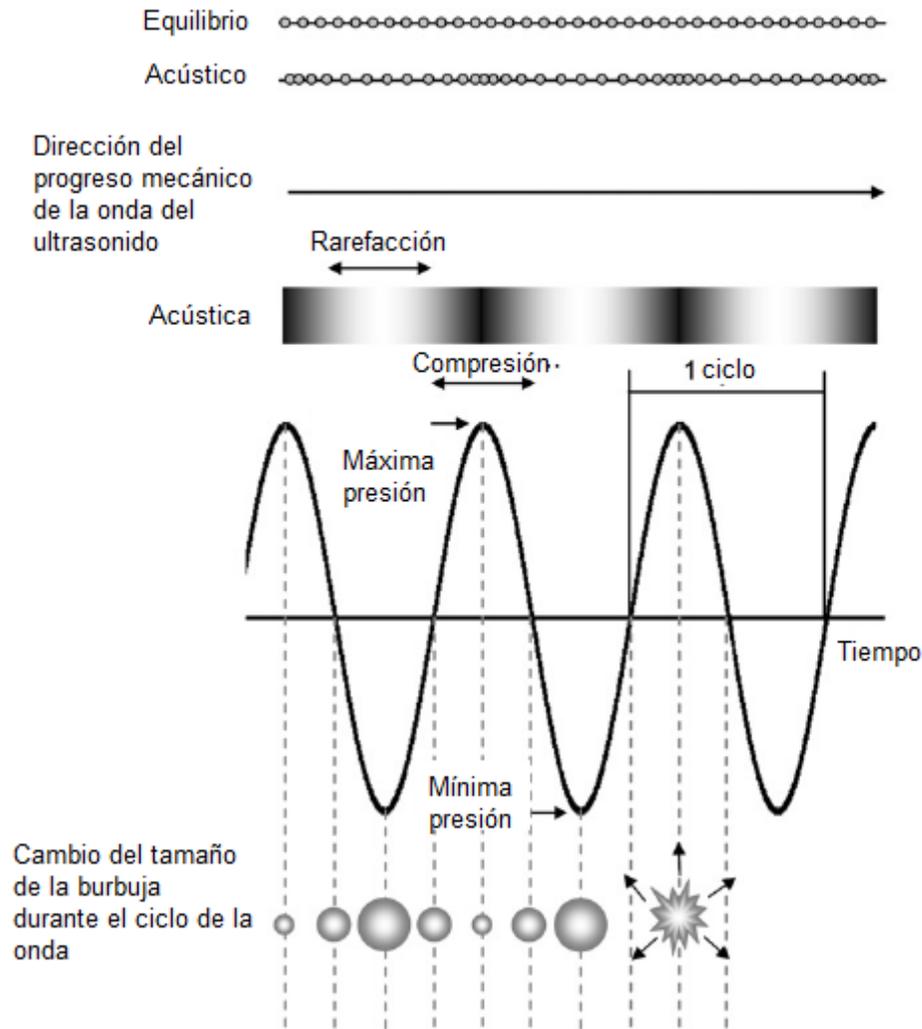


Figura 6. Cavitación del ultrasonido
Fuente modificada de Soria y colaboradores, 2010.

El primer uso que se le dio al ultrasonido en alimentos fue para emulsificar y homogenizar, ejemplo de esto son la mayonesa, la leche y la catsup, que gracias a la cavitación de las burbujas chocando cerca de la interface de dos capas, subsecuentemente, se obtiene una emulsión muy estable y fina, obteniendo mejores resultados costo-beneficio (78).

En general, las aplicaciones del ultrasonido en la industria alimentaria se pueden dividir en baja y alta intensidad. El ultrasonido de baja intensidad utiliza baja amplitud de ondas

ultrasónicas a alta frecuencia (> 1 MHz) que no dañan el material. Este se utiliza normalmente para aplicaciones analíticas, tales como la determinación de la composición, estructura, y estado físico. Por el contrario, las aplicaciones de alta intensidad (también conocidos como ultrasonidos de potencia) utilizan mayor amplitud de onda ultrasónica y pueden alterar las propiedades fisicoquímicas o la estructura de un material, produciendo reacciones químicas en un campo denominado sonoquímica, el cuál ha sido utilizado en la industria alimentaria para la conservación de alimentos (79).

Esta última ha sido probada en lácteos y jugos, en la leche se observó disminución de microorganismos patógenos como lo son *Escherichia coli*, *Pseudomona fluorescens* y *Listeria monocytogena*, esto sin alterar el contenido de proteína o caseína. En jugos de naranja y manzana, se observó la inactivación de las enzimas pectinmetilesterasa, polifenoloxidasa y peroxidasa, las cuales son responsables del deterioro de frutas y verduras (80, 81). También se han realizado evaluaciones de calidad en distintos jugos (toronja, manzana y uva roja), realizando pruebas sobre sus características físico-químicas, observando que no existen cambios en el pH o grados Brix de los jugos tratados, así mismo evita que el jugo se observe turbio y los niveles de capacidad antioxidante y algunos antioxidantes como polifenoles y ácido ascórbico, aumentan después del tratamiento de ultrasonido (82-84).

Sin embargo, el ultrasonido es más efectivo cuando se combina con otros métodos como lo son las altas presiones y las temperaturas controladas, aumentando la eliminación de microorganismos, inactivación de enzimas, efectuando daños mínimos a los compuestos (85). Las combinaciones que existen son:

- Osomosonificación: consiste en oscilar altas presiones en fluidos con ondas ultrasónicas, lo que provocará daño a la membrana (86).
- Manotermosonificación: combinan altas presiones hidrostáticas, temperatura controlada y sonicación, permitiendo igual que la manosonificación, la eliminación de microorganismos e inactivación de enzimas, ocurriendo esto en tiempos más cortos (87, 88).

- Manosonicación, consiste en la combinación de alta presión hidrostática con el ultrasonido, con lo que se inactivan microorganismos (89).
- Termoultrasonicación, combina temperaturas controladas con el ultrasonido, esto permite que la inactivación microbiana y enzimática sea en tiempos más cortos comparados con la pasteurización o esterilización, existiendo cambios mínimos en el color y los niveles de vitamina C del producto (90).

La osmosonicación ha sido utilizada en jugo de zarzamora, en el cuál se observó que existió una disminución en bacterias ácido lácticas, levadura y moho, sin existir cambios significativos en el color, actividad antioxidante, antocianinas y elagitaninos, en tratamiento de más de 32 minutos (86). Por otro lado, la manotermosonicación ha sido probada en jugos de naranja, jitomate y zanahoria, en los cuales existió disminución de enzimas termo-resistentes como son: las pectin metilesterasas y otras enzimas como peroxidasas, lipooxigenasas, y polifenoloxidasas (91-93). Respecto a manosonicación, se ha encontrado la disminución de microorganismos como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, en jugos de manzana y naranja (94).

Por último, son pocos los jugos en los que se han utilizado temperaturas controladas aunadas con el ultrasonido, obteniendo resultados positivos, en los que se destaca la inactivación de enzimas como las pectin metilesterasa, poligalacturonasa y polifenoloxidasas, inactivación de *Escherichia coli*, aumentando el tiempo de almacenamiento de jugos, así como la liberación de ácido ascórbico, polifenoles y licopenos. Estas evaluaciones se han realizado en jugos de jitomate, manzana, sandía y naranja (95-100).

Con tuna, se ha elaborado un jugo sonicado, en el que después de haber sido sometido a sonicación durante 15 a 25 minutos, se observó una disminución importante de carga microbiana, sin afectar las cualidades antioxidantes del jugo, por otro lado, al aumentar la amplitud a 80%, se observó una liberación de compuestos antioxidantes (101).

Cabe mencionar que el uso de cualquier tecnología para la conservación del alimento va a traer consigo cambios en compuestos del mismo, por lo que es importante evaluar el porcentaje de compuestos bioaccesibles que realmente puedan ayudar al consumidor.

1.5. Bioaccesibilidad de polifenoles

Los métodos *in vitro* sobre bioaccesibilidad, ofrecen una alternativa para el estudio en humanos y en animales, ya que son simples, rápidos, de bajo costo y pueden predecir la biodisponibilidad relativa en estudios del procesamiento en alimentos (102). De esta forma, la aplicación de modelos *in vitro*, consiste en una simulación de la fase inicial de la digestión intraluminal, seguido de una absorción intestinal utilizando un modelo de diálisis (103).

Los polifenoles son metabolizados tanto en tejidos como en el colon por la microbiota (104). El metabolismo de los polifenoles comienza en el lumen del intestino delgado y las modificaciones post-absorción ocurren en el hígado, desde el cual puede ser transportado a tejidos blanco como ojos o testículos, o pasar a riñón donde es desechado en orina (figura 7) (105). Además, algunos flavonoides y compuestos relacionados no son absorbidos en el intestino delgado, y pasan directamente al colon. En la microbiota intestinal puede existir una modificación estructural substancial de los polifenoles, los cuales también pueden ser desechados en heces. En general, todos los polifenoles son conjugados en la barrera intestinal a su forma *O-glucuronidos*, ésteres de sulfato y *O-metil éster*, por lo que es necesario que los flavonoides sean metabolizados para dirigirse al plasma u orina (106).

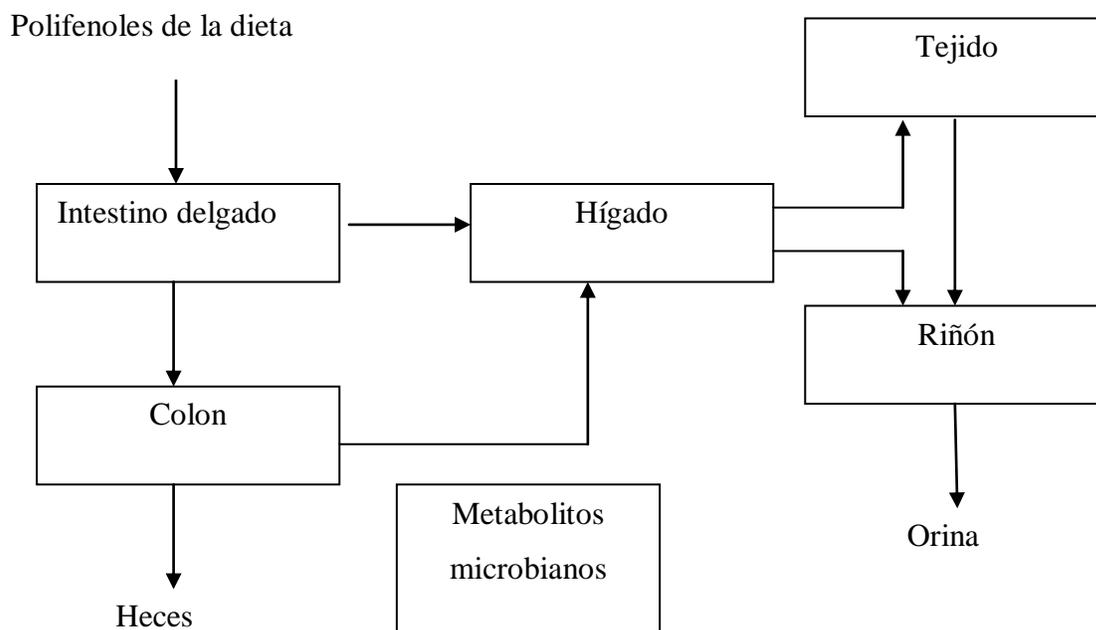


Figura 7. Proceso de absorción, transporte y metabolismo de los compuestos polifenólicos.

Fuente modificada de Scalbert y colaboradores, 2002.

La formación de derivados aniónicos por conjugación con grupos glucurónidos y sulfatos facilita su excreción, explicando su rápida eliminación por orina y bilis. En diferentes estudios se ha encontrado un pico post-prandial entre la primera y segunda hora después de la ingesta de alimentos ricos en varios polifenoles (107). Existe un interés creciente respecto a la porción de flavonoides que no son absorbidos por el intestino delgado, pero pasan directo al intestino grueso, donde son degradados por la microflora intestinal a ácidos fenólicos, los cuales pueden ser absorbidos y llevados al sistema circulatorio, como es el caso de la quercetin-3-*O*-rutinosido, la cual es metabolizada en intestino grueso (figura 8). Posterior al metabolismo intestinal resultan dos productos, una molécula de quercetina y una de ácido 3,4-dihidroxifenilacético. La quercetina es absorbida, mientras que el ácido 3,4-dihidroxifenilacético sigue metabolizándose a ácido 3-4-metoxi-4-hidroxifenolacético, molécula que es eliminada en orina. Los flavonoides que pasan a intestino grueso y sus metabolitos, podrían tener impacto en la salud del colon, por instancia, seleccionando las bacterias probióticas e inhibiendo la proliferación de células cancerosas (108).

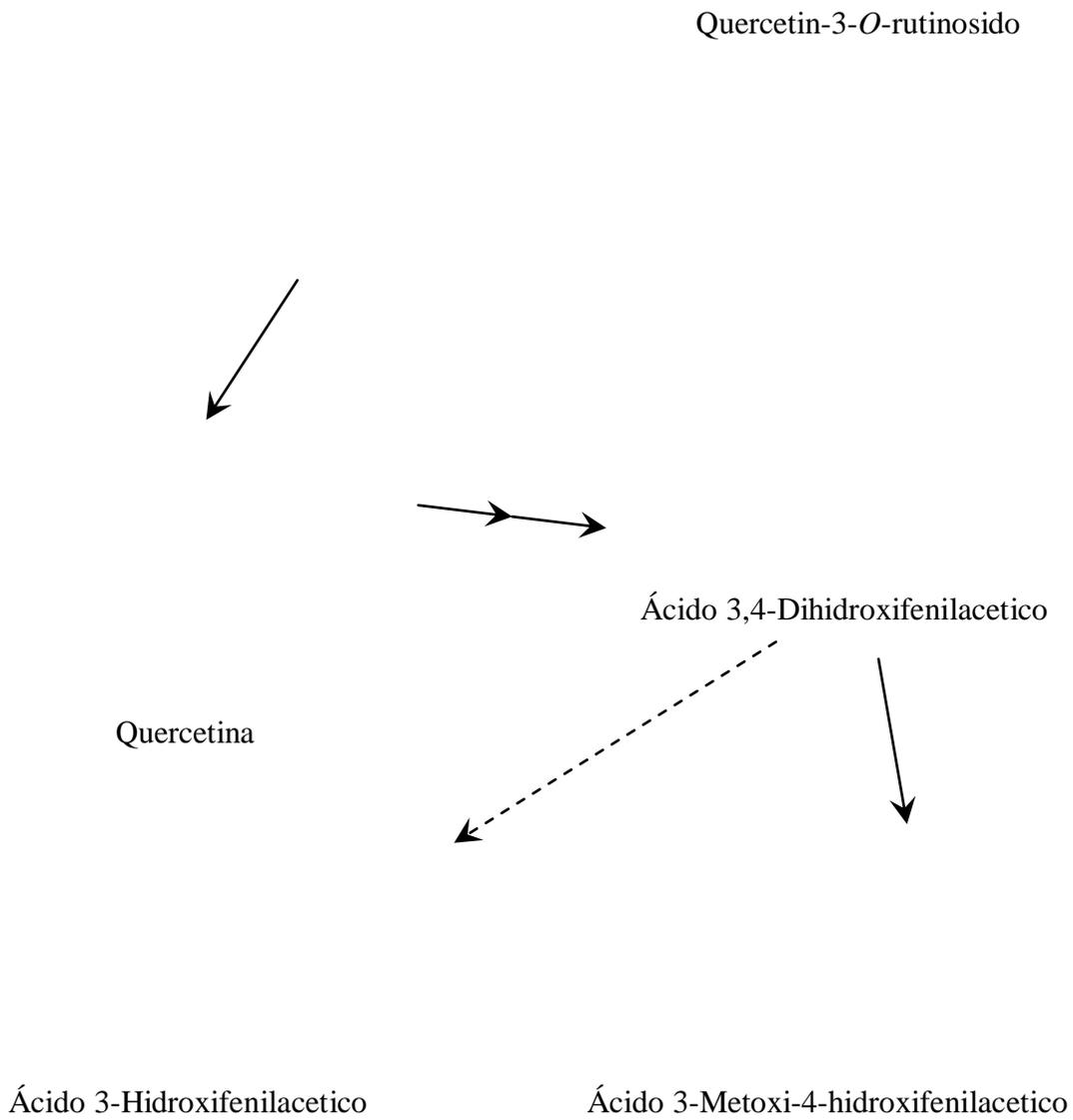


Figura 8. Metabolismo de quercetin-3-*O*-rutinosido mediado por bacterias colónicas
 Fuente modificada de Del Río y colaboradores, 2009.

II JUSTIFICACIÓN.

Ha sido probado en diferentes estudios, que la tuna es una fruta con una importante actividad antioxidante, siendo México el principal productor a nivel mundial. Su principal consumo se encuentra en la zona centro del país, que al mismo tiempo, es la zona de producción de la misma, teniendo una gran pérdida post-cosecha, por lo que es necesario el uso de tecnologías emergentes que además de ayudar en la conservación del alimento, permita la liberación de compuestos bioactivos, y no a su destrucción o degradación por el uso de tecnologías térmicas convencionales. En México, la tuna verde o blanca es la de mayor consumo por su dulzor, sin embargo la tuna púrpura sobresale por su actividad biológica. Por lo que se deben elaborar alimentos de fácil consumo, como es el jugo, mezclando ambas tunas, lo que podría generar un producto con sabor agradable, más los beneficios de sus compuestos bioactivos

Es por esto que es importante utilizar tecnologías emergentes (termoultrasonificación) en jugo de tuna combinado, que beneficien al producto durante el proceso y garantice una cantidad y calidad de compuestos bioactivos que beneficien la salud del consumidor. Lo cual se puede probar por medio de ensayos de bioaccesibilidad *in vitro*, que contribuiría a la extrapolación de resultados que podrían esperarse en la digestibilidad gástrica en humanos, al mismo tiempo, que la extracción y aislamiento de compuestos garantiza conocer con certeza la composición del alimento.

III. HIPÓTESIS

El termoultrasonido liberará compuestos bioactivos, aumentando la actividad antioxidante bioaccesible en un jugo combinado de tuna, sin alterar los compuestos encontrados en el mismo.

IV. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Estudiar los compuestos fenólicos, actividad antioxidante y bioaccesibilidad *in vitro* de un jugo combinado de tuna termoultrasonificado.

4.2 Objetivos específicos.

- Elaborar un jugo de tuna combinado (tuna verde + tuna púrpura) termoultrasonificado y pasteurizado.
- Evaluar compuestos antioxidantes (Polifenoles, ácido ascórbico y betalaínas) y actividad antioxidante (ABTS^{•+} y DPPH) de jugos.
- Obtener tres extractos por disolventes (hexano, acetato de etilo y metanol) a partir de los jugos.
- Medir actividad antioxidante de los extractos.
- Aislar metabolitos mayoritarios del extracto con mayor actividad antioxidante.
- Determinar la estructura de los metabolitos mediante Resonancia Magnética Nuclear.
- Evaluar la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante del jugo combinado de tuna.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

En la figura 9 se describe el diseño metodológico utilizado en este trabajo.

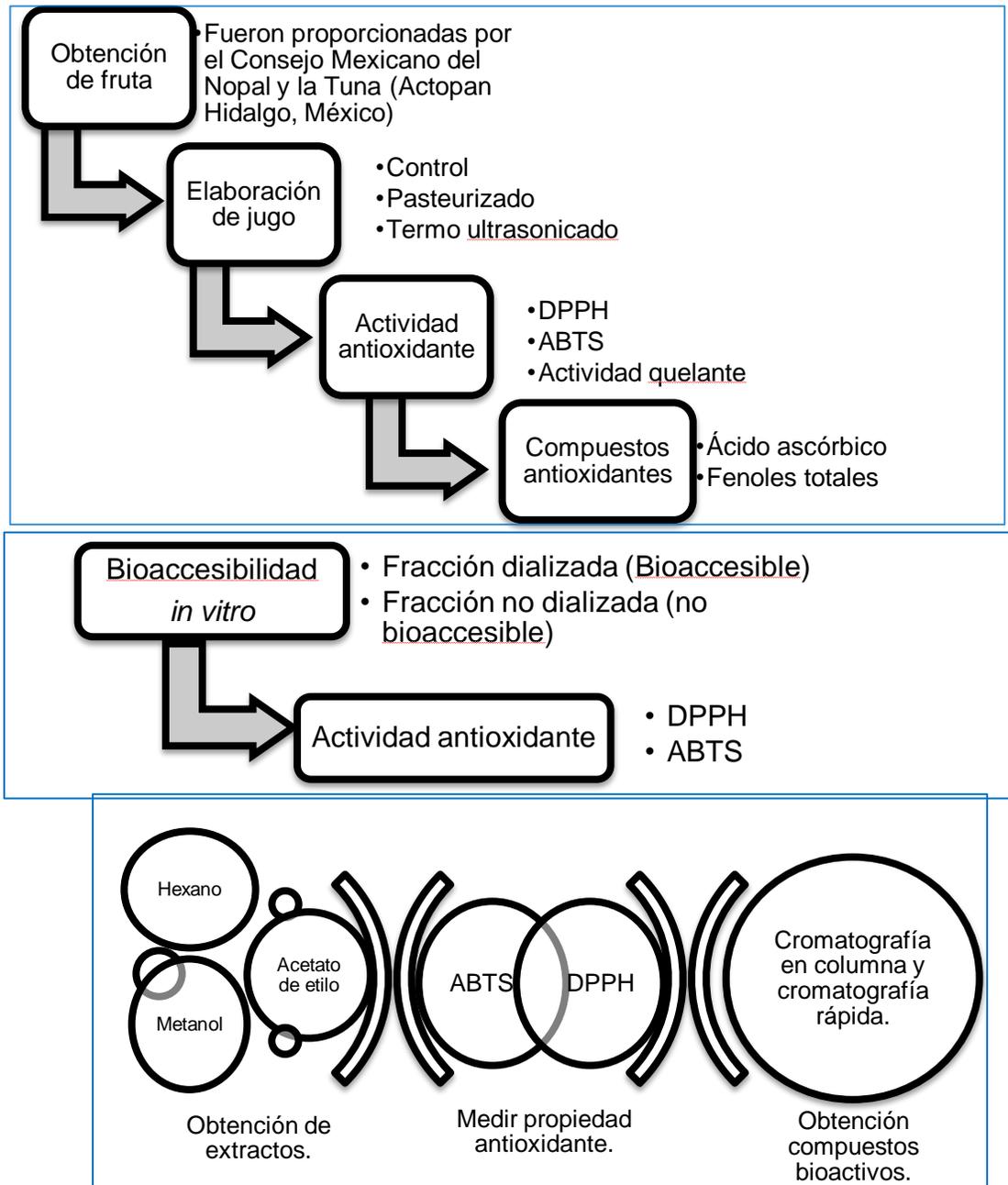


Figura 9. Diseño Metodológico

5.1 Elaboración del jugo y tratamientos

Las tunas (*Opuntia ficus-indica*) fueron proporcionadas por el Consejo Mexicano de Nopal y Tuna (CoMeNTuna), ubicado en Actopan, Hidalgo; México. Se utilizaron la mezcla de dos variedades de tuna (Reyna y Rojo pelón) de tal manera que se aprovechen las características sensoriales, nutricionales y funcionales de ambas variedades. Para la elaboración del jugo, se empleó una licuadora industrial (38BL52-LBC10, Waring Commercial[®], USA), posteriormente se separaron las semillas con un colador; el jugo de tuna verde se clarificó mediante centrifugación (Allegra 25TM, Beckman Coulter, USA) a 10000 rpm durante 15 minutos. Se realizó tratamiento de pasteurizado convencional (Past) a 70°C por 30 minutos, en donde 400 mL de jugo se introdujeron en un recipiente de doble pared, en el cual circulaba agua a temperatura controlada de 70±1 °C utilizando un baño de agua (LSI-3016^a, Cole Parmer, USA) (109) y por termoultrasonido (TUS) (VCX-1500, Sonics & Materials, Inc. Newtown, USA), aplicando una amplitud de 80% usando una sonda de 13 mm, con periodos de pulso de 2 segundos encendido y 4 segundos apagado, durante 15 min a una temperatura controlada de 45±1 °C, utilizando el mismo recipiente. Un jugo sin tratamiento se utilizó como muestra control (Ctl).

5.2 Compuestos antioxidante y capacidad antioxidante

5.2.1 Determinación de ácido ascórbico.

Para la determinación de ácido ascórbico, se empleó el método colorimétrico, utilizando el reactivo DCPI (2,6 diclorofenolato sódico), que tiene una coloración azul-violeta y al reaccionar con el ácido ascórbico, ocurre una decoloración a rosa tenue o incoloro. Se prepararon las siguientes soluciones: DCPI, amortiguador de acetatos al 1 M con pH de 6 y solución de ácido ascórbico. Se efectuaron concentraciones a partir de la solución de ácido ascórbico: 0, 10, 20, 30, 40, y 50 mg/L, se tomaron 100 µL de cada concentración para la obtención de la curva estándar. La técnica para la curva y la muestra de estudio se realizó vertiendo 100 µL de la muestra previamente diluida, 100 µL de amortiguador de acetatos y 800 µL de DCPI, se determinó la absorbancia (Abs) a 520 nm y se utilizó ácido oxálico como blanco al 0.4% (110). Los resultados se expresaron como miligramos de ácido ascórbico por litro (mg AA/L).

5.2.2. Determinación de polifenoles totales.

Para la determinación de polifenoles totales (PT) se realizó por el método Folin-Ciocalteu, el cual es un reactivo que mezcla los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, la cual es reducido a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica, esta reducción ocurre bajo condiciones alcalinas mediante la presencia de carbonato de sodio. Las muestras fueron filtradas (Oasis[®] RHLB 3cc, Waters, USA). Se realizó una curva estándar de la concentración de compuestos fenólicos, por lo que se preparó una solución con 400 mg de ácido gálico por litro de agua desionizada. A partir de esta solución se prepararon las siguientes concentraciones: 0, 100, 200 y 300 mg/L para la obtención de la curva estándar. La técnica para la curva estándar y la muestra de estudio consistió en tomar 100 μ L de muestra, verter 100 μ L de solución de Folin-Ciocalteu y 400 μ L de solución de carbonato de sodio al 7.5%. Las muestras se agitaron en vortex y se reposaron a temperatura ambiente durante 30 min, se realizó la lectura de Abs a 765 nm al finalizar dicho tiempo (111). Los resultados se reportan como miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L).

5.2.3 Determinación de Betalaínas

El contenido de betacianinas y betaxantinas se determinó por miligramos equivalentes de betanina por litro (mg EB/L) y como miligramo equivalente de indicaxantina (mg EI/L) respectivamente. Las betacianinas se midieron a una Abs de 535 nm y las betaxantinas a 484 nm, de acuerdo con la ecuación (59):

$$\text{Contenido de betacianinas o betaxantinas} = [(A \times FD \times PM \times 1000 / \epsilon \times l)]$$

Dónde:

A = Absorbancia de 535 o 480 nm.

FD = Factor de dilución.

PM = Peso molecular (Betacianina = 550 g/mol; Betaxantina = 308 g/mol).

ϵ = Coeficiente de extinción (Betacianinas = 60,000 L/mol; Betaxantinas = 48,000 L/mol).

l = Ancho de la microcelda del espectrofotómetro (1 cm).

5.2.4 Determinación de la actividad antirradicalaria por el método DPPH.

Para la determinación de actividad antirradical se empleó el método DPPH (2,2-Difenil-1-Picril hidrolizado), el cual es un radical libre estable que en una solución etanólica que presenta una coloración violeta intenso, si a esta solución se le agrega una sustancia susceptible de atrapar radicales libres (Trolox), el electrón no apareado del DPPH se aparea e inmediatamente presentará una decoloración que puede ir hasta un tono amarillo. Se elaboró la solución de DPPH al 0.07% en metanol y una solución de Trolox, la cual es la molécula de referencia, con la que se obtuvo una curva estándar con las siguientes concentraciones en etanol: 0, 50, 100, 200 y 300 μmol Trolox/L. Para realizar la técnica para la curva y la muestra de estudio, se vertieron 100 μL de la muestra diluida y 500 μL de la solución de DPPH, se agitaron en vortex y se reposaron a temperatura ambiente durante 60 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 10,000 rpm/5 min, a 4 °C y se midió la Abs del sobrenadante a 520 nm (112). La actividad antioxidante por DPPH se reportó en μmol equivalente de Trolox por litro (μmol ET/L).

5.2.5 Determinación de actividad antioxidante por ABTS^{•+}.

Para esta determinación se preparó una solución de ABTS^{•+} (Ácido 2,2' Azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) al 7 mM/L con persulfato de potasio al 2.45 mM/L, se incubó durante 16 h a temperatura ambiente en la oscuridad y transcurrido el tiempo, se diluyó en agua desionizada hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.9 . Posteriormente se tomaron 20 μL de muestra y 980 μL de la dilución de ABTS^{•+}, se dejó reposar 7 min, la Abs se midió a 754 nm (113), la cual fue comparada con una curva estándar de ácido ascórbico a concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μmol /L. La capacidad antioxidante se expresó como μmol de equivalentes de vitamina C por cada litro de jugo (mg EVC/L) (113).

Todas las absorbancias se realizaron utilizando un lector de microplacas Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA.

5.3 Determinación de bioaccesibilidad intestinal in vitro de compuestos antioxidantes.

La bioaccesibilidad intestinal *in vitro* de los compuestos antioxidantes y capacidad antioxidante, fue determinada mediante una fase inicial de simulación de digestión intraluminal, seguida por una fase de diálisis simulando la absorción intestinal. Lo anterior se llevó a cabo utilizando un modelo de digestión *in vitro*, siguiendo el método descrito por Miller y colaboradores, (1981) con algunas modificaciones (Trinidad y col., 1996). 500 mg de muestra fueron manualmente homogenizados en 20 mL de agua, y se ajustó a un pH de 2 con HCl 6 M. La muestra con 120 μ L de pepsina (40 mg pepsina -Sigma Aldrich P-7000 por mL de HCL 0,1 M), fue incubada en un baño de agitación (Lab Tech., LSI-3016^a, USA) a 37 °C por 2 h. Después de la incubación, se agregaron 1,5 mL de una disolución bilis-pancreatina, la cual se elaboró con 5 mg de enzima pancreatina (P-1750 Sigma Aldrich), 25 mg de bilis porcina (B-8631 Sigma Aldrich) con un mL de NaHCO₃ 0,1 M. Las muestras digeridas por las enzimas fueron colocadas en una bolsa de diálisis con tamaño de corte de 12 KDa, y fueron dializadas en una solución de bicarbonato de sodio (pH 7,5) durante 12 h.

Los valores de bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes (fenólicos, ácido ascórbico y betalaínas) y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) de las tres muestras (control, pasteurizado y TUS), fue determinada como la diferencia de los parámetros obtenidos antes y después del tratamiento de digestión *in vitro* (muestra dializada) (114, 115).

5.4 Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios

5.4.1 Obtención de extractos

Se procedió a obtener los extractos de jugo liofilizado por hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH), mediante la dilución de 500 g de muestra en 1 L del disolvente, posteriormente se agitó, y sometió a filtrado y concentrado en rotavapor (BÜCHI Labortechnik AG CH-9230, Suiza).

5.4.2 Obtención de compuestos puros

Los extractos obtenidos fueron sometidos a separación mediante cromatografía en columna y cromatografía rápida, para obtener metabolitos puros. Utilizando columnas de 2 cm de diámetro interno y sílice gel (Sigma-Aldrich) con un poro de 60 Å, con tamaño de partícula de 40-63 µm. Estas sustancias se analizaron mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos, principalmente Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos de naturaleza de carbono (APT; Attached Proton Test), acoplamiento entre protones (COSY, correlation spectroscopy; NOESY, Nuclear Overhauser effect spectroscopy), acoplamiento entre protones y carbono trece a uno (HETCOR, heteronuclear correlated spectroscopy; HMQC, Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) y a dos y tres enlaces (HMBC, Heteronuclear Multiple Bond Coherence) (116), utilizando un espectrómetro (Jeol Eclipse 400, USA).

5.5 Análisis Estadístico

Se asumieron como variables independientes: los tratamientos dados al jugo (control, pasteurizado, y termoultrasonificado); variables dependientes: compuestos fenólicos totales, ácido ascórbico, pigmentos, actividad antioxidante por $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y DPPH.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias para determinar diferencias entre tratamientos. También se realizó un estudio de correlación bilateral, para encontrar diferencias estadísticamente significativas entre el jugo inicial y después de ser sometidos a un modelo de digestión *in vitro*. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado, asumiendo varianzas iguales por Tukey ($p \leq 0.05$) con el Software SPSS V-15.0

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Actividad Antioxidante de Jugos.

6.1.1 Ácido Ascórbico

Los valores de la muestra control (286 mg EAA/L) fueron más altos ($p \leq 0.05$) comparados con las muestras del jugo pasteurizado y el termoultrasonificado (259 y 236 mg EAA/L, respectivamente) (Tabla 11). La concentración de ácido ascórbico encontrado en este estudio, fue menor a los reportados en jugo sonicado de tuna verde y púrpura no clarificado (510 mg EAA/L y 352 mg EAA/L, respectivamente) (101, 117), cabe mencionar que estos estudios se realizaron por ultrasonido además de no haber sido clarificado, a diferencia de este estudio que fue parcialmente clarificado, esto permite tener un jugo con mejores características sensoriales, pero al mismo tiempo disminuye la cantidad de compuestos bioactivos (118).

El jugo pasteurizado presentó valores menores a los encontrados en jugo control, pero mayores a los del jugo TUS ($p \leq 0.05$). La disminución de ácido ascórbico durante la pasteurización, puede ser debido a que este es un compuesto termolábil en presencia de oxígeno, obteniendo una degradación por vía aeróbica a ácido 2,3-dicetogulónico, el cual es una reducción irreversible del ácido ascórbico, oxidación que es predominante a temperaturas superiores de los 60 °C (119).

La pérdida de ácido ascórbico también ha sido reportada en jugo de jitomate y naranja sonicados (120, 121), esta disminución se debe principalmente a reacciones sonoquímicas y a las condiciones físicas extremas que ocurren durante la sonicación. Se ha reportado que iones de hidrógeno (H^+), radicales libres (O^- , OH^- , HO_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), son formados durante la sonólisis de moléculas de agua presentes en jugos de diferentes frutas y verduras (122). De esta forma, la degradación de ácido ascórbico puede estar relacionado con las reacciones de oxidación, promovidas por la interacción de radicales libres formados durante la cavitación, obteniendo una degradación de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico (119), el cual también tiene una fuerte actividad fisiológica, debido a que las células del cuerpo humano reduce fácilmente el ácido dehidroascórbico a ácido

ascórbico, por reducción enzimática o reducción por glutatión, el cual queda disponible para su reuso (123). Esto aunado con las temperaturas controladas utilizadas durante la termoultrasonificación, podrían ser las responsables de una mayor pérdida de ácido ascórbico que en la muestra pasteurizada. Por otro lado, se ha reportado una mejor conservación y aumento del ácido ascórbico durante una vida de anaquel de hasta 28 días en jugo de tuna púrpura termoultrasonificado, lo que lo haría una tecnología de conservación de jugos óptima (109).

Tabla 11. Compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de jugo combinado de tuno con diferentes tratamientos

Determinación	Control	Pasteurizado	TUS
Ácido Ascórbico mg EAA/L	286.4±10.8 ^c	259.4±10.8 ^b	236.8±3.1 ^a
Polifenoles totales mg EAG/L	411.5±7.9 ^a	499.6±23.1 ^b	575.8±11.1 ^c
Betacianinas mgE betanina/L	371.51±8.8 ^b	335.6±4.6 ^a	392.78±4.1 ^c
Betaxantinas gE indicaxantinas/L	176.07±1.2 ^b	164.52±2.7 ^a	176.42±0.4 ^b
ABTS ^{•+} mg EVC/L	30.5±0.9 ^a	35.8±0 ^b	39.5±0.3 ^c
DPPH μmol ET/L	426.8±29.9 ^a	434.3±16.6 ^a	673.8±41.6 ^b

^{a-c} Diferentes letras indica diferencia significativa por Tukey ($p \leq 0.05$) entre los jugos en la misma determinación.

6.1.2 Polifenoles Totales

El contenido de polifenoles totales se muestra en la tabla 11, donde la muestra control presentó los valores más bajo (411 mg EAG/L), mientras que la muestra de jugo

pasteurizado mostró un aumento del 21% comparado con jugo control ($p \leq 0.05$). La muestra termoultrasonificada tuvo un aumento estadísticamente significativo, comparado con el jugo control, del 40% a valores de hasta 575 mg EAG/L (Tabla 11). Dicho aumento ya ha sido reportado en jugos de uva y manzana sonicados (82, 83), en jugo de tuna sonificado, se reportó un aumento de polifenoles totales del 25% en jugo de tuna púrpura y del 39% en jugo de tuna verde, después de someter el jugo a sonicación, y de 35% por termoultrasonificación en jugo de tuna púrpura (101, 109, 117). Este aumento es debido que durante el ultrasonido se generan microburbujas, las cuales implosionan y alteran la pared celular biológica y enlaces que pueden existir entre compuestos fenólicos y hemicelulosa, lignina y pectina, liberando compuestos bioactivos (124, 125).

Respecto al aumento de compuestos fenólicos en la muestra pasteurizada, se ha encontrado que al someter un extracto de naranja china a altas temperaturas, aumentaba considerablemente la cantidad de compuestos fenólicos polares y no polares, esto debido a la posible destrucción de la pared celular que contiene estos compuestos (126). De igual forma, se ha encontrado, que la mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en vino son estables a temperaturas mayores de 100°C, temperaturas que no se alcanzaron en el jugo pasteurizado en este estudio (127).

6.1.3 Betalaínas

Como ya se mencionó anteriormente, las betalaínas son un grupo de pigmentos que se encuentran en los frutos de *Opuntia spp.* En un estudio donde evaluaron tunas mexicanas comerciales, reportaron una concentración de 50-144.4 EB/L, mientras que de indicaxantinas presentaron valores de 80-240 EI/L (128). Todas las muestras estudiadas, mostraron más del doble de betacianinas de 335 a 392 mg EB/L, y las indicaxantinas se encontraron en los parámetros antes mencionados (Tabla 11). Por lo que la combinación de ambas tunas permitió una alta concentración de betacianinas. Comparando con el fruto de la pitahaya el cual se ha reportado como un fruto rico en betalaínas (199 mg EB/L y 147 mg EI/L), el jugo de tuna combinado tiene mayores concentraciones.

El jugo termoultrasonificado obtuvo valores significativamente elevados de betacianinas comparados con los jugos control y pasteurizado (392 mg, 371 mg y 335 mg EB/L,

respectivamente). Mientras que en indicaxantinas, los jugos control y termoultrasonificado fueron similares, presentando valores altos comparados con el jugo pasteurizado (Tabla 11). Estos resultados pueden ser debido a que las betalaínas son moléculas termolábiles, y su descomposición sigue una reacción de primer orden en un intervalo de pH 3.5 a 7 (129). Por lo que la combinación de temperatura y ultrasonido, reduce la necesidad de altas temperaturas de un 25% hasta un 50%, disminuyendo los cambios de coloración (130), lo que da como resultado un jugo con mayor concentración de pigmentos, que el jugo tratado con pasteurización.

Los resultados encontrados en este estudio son mayores a lo reportado en jugo de tuna púrpura termoultrasonificado, en donde encontraron menor concentración de betalaínas en el jugo termoultrasonificado (109). Esto quizá debido a que el jugo utilizado en este trabajo fue parcialmente clarificado, permitiendo una mayor concentración de betalaínas.

6.1.4 Actividad Antioxidante.

Como se observa en la tabla 11, el jugo termoultrasonificado fue el que contó con mayor actividad antioxidante (39 mg EVC/L por ABTS^{•+} y 673 μ mol ET/L por DPPH). Este comportamiento también fue reportado en jugos de tuna sonicados y termoultrasonificados, en los que estipularon que el incremento de actividad antioxidante se debe a la amplitud utilizada y al tiempo sometido al ultrasonido (101, 109). Al mismo tiempo que la actividad antirradical en la tuna, al igual que en otros frutos, es el resultado de la suma de todos los compuestos antioxidantes contenidos como la taurina, ácido ascórbico, compuestos fenólicos y betalaínas (131).

Son múltiples autores los que discuten que el responsable de hasta el 15% de la actividad antioxidante es debido a la presencia de ácido ascórbico (132), otros indican que el responsable principal son los polifenoles totales (133, 134), mientras que en otros estudios no encuentran correlación alguna entre los compuestos y la actividad antioxidante (135). En la tabla 12 se puede observar que existió correlación positiva entre la actividad antioxidante por DPPH y los polifenoles totales ($r=0.820$, $p\leq 0.01$) y betacianinas ($r=0.726$, $p\leq 0.05$), y la actividad antioxidante por ABTS tuvo correlación con polifenoles totales ($r=0.959$, $p\leq 0.01$), por lo que se puede inferir que los polifenoles totales son los principales

responsables de la actividad antioxidante del jugo combinado de tuna. Respecto a ácido ascórbico, éste presentó una correlación negativa con la actividad antioxidante por DPPH y ABTS ($r=-0.778$, $p\leq 0.05$ y $r=-0.912$, $p\leq 0.01$, respectivamente), por lo que el ácido ascórbico disminuyó mientras que la actividad antioxidante aumentaba, por otro lado, se ha encontrado que existiría correlación positiva entre ácido ascórbico y actividad antioxidante siempre y cuando se tratara de un fruto cítrico, como lo es el limón, la naranja y la toronja, esto debido a su alto contenido en este ácido, por lo que no se esperaría una correlación positiva entre actividad antioxidante y el ácido ascórbico en el jugo de tuna debido a su bajo contenido en este compuesto (136). Por último, también existió correlación entre ambos métodos para medir actividad antioxidante ($r=0.789$, $p\leq 0.05$), dicha correlación ha sido reportada para una gran variedad de frutos y bebidas, por lo que ambas determinaciones son eficientes para un correcto cálculo de la actividad antioxidante en jugo de tuna (30, 31).

Tabla 12. Correlación entre compuestos antioxidantes y actividad antirradical en jugo de tuna combinado

	DPPH	ABTS
Ácido ascórbico	-0.778 (*)	-0.912(**)
Polifenoles Totales	0.820 (**)	0.959 (**)
Betacianinas	0.726 (*)	----
DPPH	1	0.789 (*)

**La correlación es significativa al nivel $p\leq 0.01$ * La correlación es significativa al nivel $p\leq 0.05$.

6.2 Bioaccesibilidad intestinal *in vitro*

6.2.1 Actividad antioxidante y compuestos antioxidantes del jugo después de digestión *in vitro*

Como ya se mencionó anteriormente, los frutos de *Opuntia ficus indica* son una fuente importante de compuestos con actividad antioxidante. Dentro de estos compuestos destacan el ácido ascórbico, polifenoles como el kaempferol e isorhamnetina, y los pigmentos

conocidos como betalaínas (20, 59). Las tunas púrpuras cuentan con mayor actividad antioxidante y concentración de los compuestos bioactivos, comparados con los de la tuna verde (54).

Debido a su contenido en compuestos bioactivos, es importante conocer el porcentaje de los mismos que puedan ser bioaccesibles. Los estudios de bioaccesibilidad *in vitro* son simples, rápidos, de bajo costo y pueden predecir la biodisponibilidad relativa en estudios del procesamiento en alimentos (102).

6.2.1.1. Ácido Ascórbico

Las muestras en este estudio presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 13), siendo el jugo TUS el que mostró la mayor cantidad de ácido ascórbico bioaccesible (150 mg EAA/L). El jugo control, arrojó valores menores al jugo TUS pero mayores al jugo pasteurizado, de 143 mg EAA/L y 124 mg EAA/L, respectivamente ($p \leq 0.05$). Estudios en pacientes sanos que consumieron jugo de naranja fresco y sometido a campos eléctricos, para determinar los efectos de este tratamiento sobre la biodisponibilidad *in vivo* de ácido ascórbico, hallaron incremento en el valor de ácido ascórbico sérico, sin que existiera diferencia significativa entre ambos grupos (137). Sin embargo, en este estudio *in vitro*, el jugo de tuna tratado con TUS presentó mayor bioaccesibilidad de ácido ascórbico. Es posible que el tratamiento de termoultrasonido permita una mayor bioaccesibilidad de ácido ascórbico, debido a la liberación de estos compuestos partir del rompimiento de diferentes estructuras celulares, principalmente vacuolas, donde se encuentran contenidos estos compuestos (70).

Por otro lado, en los tres jugos existió una disminución en el porcentaje de ácido ascórbico bioaccesible, siendo el jugo TUS (63%) la muestra con mayor porcentaje, seguido por el control (50%) y finalizando con el pasteurizado (47%) ($p \leq 0.05$) (Figura 19). Los porcentajes de bioaccesibilidad de ácido ascórbico en este estudio son mayores a los reportados en jugo de marañón y granada, sometidos a un modelo de digestión *in vitro*, con una bioaccesibilidad del 25% y 5% de ácido ascórbico, respectivamente (138, 139), esta disminución en el ácido ascórbico bioaccesible, pudiera ser debido a la baja estabilidad del compuesto a los cambios de pH y a la presencia de oxígeno durante el proceso gastrointestinal (138, 139), lo que provocaría la oxidación del ácido ascórbico (123).

Tabla 13. Comparación de compuestos antioxidantes y actividad antioxidante de jugo combinado de tuna antes y después de digestión *in vitro*.

Determinación	Digestión <i>in vitro</i>	Control	Pasteurizado	TUS
AA (mg EAA/L)	Antes	286.4±10.8***	259.4±10.8***	236.8±3.1***
	Después	143.58±1.68 ^b	124.43±0.97 ^a	150.55±0 ^c
PT (mg EAG/L)	Antes	411.5±7.9***	499.6±23.1***	575.8±11.1***
	Después	342.01±1.25 ^c	245.5±1.25 ^a	312.90±7.112 ^b
BC (mg E betanina/L)	Antes	371.51±8.8***	335.6±4.6***	392.78±4.1***
	Después	192.6±1.1 ^c	170.49±1.99 ^a	188.49±1.81 ^b
BX (mg E indicacaxantinas/L)	Antes	176.07±1.2***	164.52±2.7***	176.42±0.4***
	Después	129.74±0.77 ^b	107.92±0.63 ^a	128.47±1.14 ^b
ABTS ^{•+} (mg EVC/L)	Antes	30.5±0.9***	35.8±0***	39.5±0.3**
	Después	17.64±.49 ^a	15.03±1.03 ^a	26.16±0.84 ^b
DPPH (μmol E Trolox/L)	Antes	426.8±29.9***	434.3±16.6***	673.8±41.6**
	Después	297.75±17.82 ^b	220.97±8.67 ^a	391.8±2.4 ^c

AA; Ácido Ascórbico en **PT**; Polifenoles Totales, **BC**; Betacianinas, **BX**; Betaxantinas

Promedios con diferentes símbolos son estadísticamente significativos (** = $p \leq 0.001$; *** = $p \leq 0.0001$), entre el jugo antes y después de digestión *in vitro*. ^{a-c} Diferentes letras indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre tratamientos.

6.2.1.2 Compuestos Fenólicos Totales

La absorción intestinal de polifenoles es muy variada, lenta e incompleta dependiendo el tipo de fenol que se consuma, siendo la quercetina y keampferol absorbidos extensamente en el intestino. Otros, permanecen intactos hasta el colon, donde tienen otras funciones fisiológicas, impactando en la salud del colon, seleccionando las bacterias probióticas e inhibiendo la proliferación de células cancerosas, entre otras (108).

Los fenoles mayoritarios en tuna son la quercetina y el keampferol (20), por lo que los principales constituyentes fenólicos de esta fruta son altamente bioaccesibles en intestino (108). El jugo TUS tuvo una bioaccesibilidad en polifenoles totales de 312.90±7.112 EAG/L (Tabla 13), la muestra control fue la que obtuvo una mayor bioaccesibilidad de

polifenoles totales (342 mg EAG/L), mientras que la muestra pasteurizada fue en la que se encontró menor bioaccesibilidad (245 mg EAG/L) ($p \leq 0.05$). La disminución de polifenoles totales después de que la muestra fue sometida a ultrasonificación y a un proceso de digestión *in vitro*, ha sido reportada en pulpa de jitomate, donde se comenta que el ultrasonido promueve la formación de nuevas redes de hidrógeno, lo que provocaría la unión de fenoles liberados a estas nuevas redes, inhibiendo la bioaccesibilidad de estos compuestos en muestras tratadas con dicha tecnología (140).

El metabolismo de los polifenoles inicia principalmente en el estómago y la mayor parte en el intestino delgado, donde se presentan algunas reacciones para su liberación. La transición del medio estomacal al intestinal induce a cambios estructurales de los compuestos fenólicos (hidroxilación, glicosilación, acilación). Por otro lado, el grado de polimerización y la solubilidad, son elementos para determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles. La relación de estos factores conlleva a una mayor absorción y metabolismo y a la formación de metabolitos como ácido gálico, isoflavonas, catequinas, flavononas y quercetina sustancias con actividad biológica importante (130,132).

El porcentaje de polifenoles totales bioaccesibles obtenidos en la muestra control (83%), son similares a los reportados en la bioaccesibilidad *in vitro* de polifenoles de pulpa de tuna verde y púrpura, donde se encontraron porcentajes de entre 69-83% (60). Sin embargo, son varios los estudios en los que se encuentran porcentajes de bioaccesibilidad de polifenoles menores que los encontrados en este estudio, siendo estos realizados en diferentes frutos como lo son manzana, uva y naranja. Este comportamiento es quizá debido a que algunos polifenoles se encuentran unidos a compuestos macromoleculares que no son digeribles, como pueden ser fibras insolubles (141-143), o que pueden formar minerales complejos, disminuyendo aún más su solubilidad (138). Algunos autores establecen que una parte de la degradación de estos compuestos se debe a la transición de la acidez gástrica hacia el medio alcalino intestinal, que ocasiona un cambio en la polaridad de los fenoles así como la unión a otras sustancias (107, 144, 145) y el impedimento en el paso de moléculas de mayor tamaño por la barrera de la membrana de celulosa semipermeable (134). Razones por las que pudiera existir una disminución en la bioaccesibilidad de los polifenoles totales.

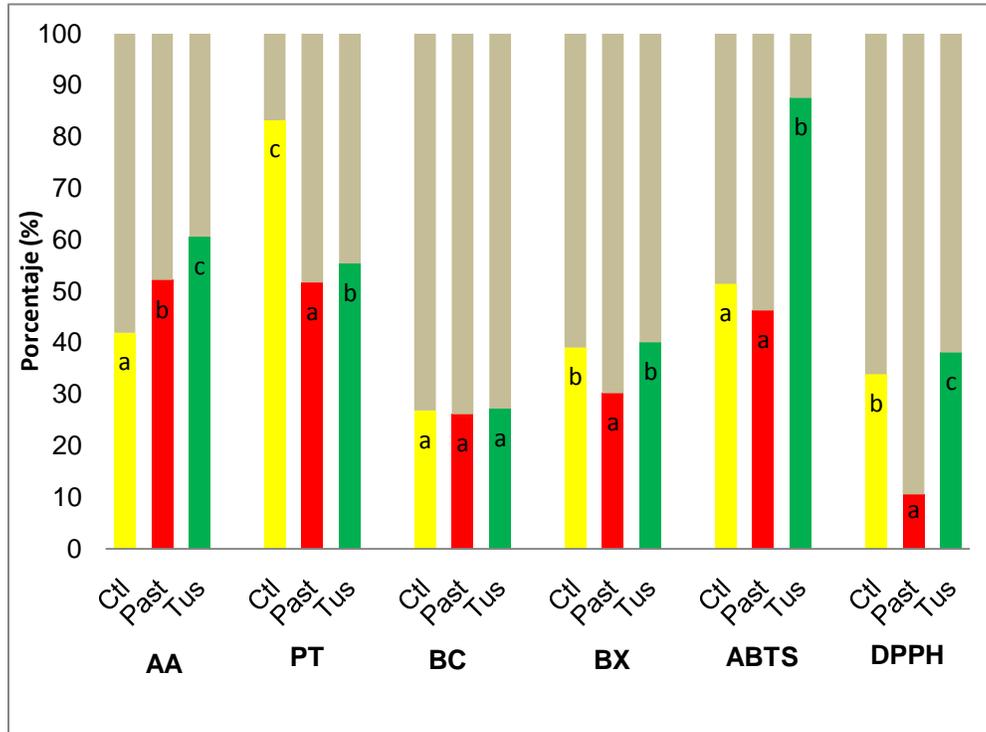


Figura 10. Porcentaje bioaccesible de compuestos y actividad antioxidante. AA, Ácido Ascórbico; PT, Polifenoles Totales; BC, betacianinas; BX, Betaxantinas, Ctl, Control; Past, Pasteurizado; TUS, Termoultrasonico. ^{a-c}Diferentes letras indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tres tratamientos.

6.2.1.3. Betalaínas

El estudio de las betalaínas y sus beneficios hacia la salud, es un tema de reciente estudio, debido a que son un grupo de pigmentos asociados con pocos alimentos como lo son las tunas y el betabel (146). En la tabla 13 y figura 10 se pueden observar los valores y porcentajes de pigmentos obtenidos en los jugos después de ser sometidos a un modelo de digestión *in vitro*. El jugo TUS presentó la mayor cantidad de betacianinas bioaccesibles (396 ± 4.1 mg EB/L), seguido por el jugo control (371 ± 8.8 mg E betanina/L), obteniendo los menores valores en el jugo pasteurizado (335 ± 4.6 mg EB/L) ($p \leq 0.05$). Las betacianinas no presentaron diferencia significativa entre los tres jugos, existiendo entre 48% y 51% de betacianinas bioaccesibles.

Por otro lado, las betaxantinas bioaccesibles en los jugos control y TUS no mostraron diferencias estadísticamente significativas, con valores de 176 ± 1.76 mg EI/L, siendo el

jugo pasteurizado el que tuvo la menor cantidad de betaxantinas bioaccesibles (164 ± 2.4 mg EI/L), al mismo tiempo, en los jugos control y TUS se hallaron mayores porcentajes de betaxantinas bioaccesibles, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, entre 70% y 72%. Estos resultados concuerdan con estudios de bioaccesibilidad *in vivo* e *in vitro* realizados con jugo de tuna y otros alimentos italianos ricos en betalaínas (147, 148).

La disminución en pigmentos bioaccesibles puede ser debido a que las betalaínas son estables a un pH de entre 3.5 y 7. Durante el modelo de digestión *in vitro*, la muestra se somete a ambientes muy ácidos, lo que produce la descarboxilación de la molécula y la formación de nuevos productos (149). Por otro lado, también se observó que las betacianinas presentaron menor bioaccesibilidad. Lo anterior, debido a que las indicaxantinas son más estables que las betacianinas durante el proceso digestivo y que es una molécula soluble en el tracto digestivo. Estos resultados fueron similares a aquellos hallados en betabel en estudios *in vivo*, donde la bioaccesibilidad de betaxantinas (76%) fue mayor a aquella del de las betacianinas (3.7%). Es posible que la estabilidad de la molécula juega un rol importante durante su absorción *in vivo* (147). Por otro lado, la presencia de glucosidasas y otras enzimas a nivel intestinal y/o los mecanismos de captación intestinal que no pueden ser 100% reproducidos en un modelo *in vitro*, podrían ser la causa por la que se hallan porcentajes de bioaccesibilidad de betacianinas mayores que aquellos realizados *in vivo* (148).

Por último, el jugo pasteurizado presentó valores de bioaccesibilidad menores ($p \leq 0.05$), puede ser debido a que durante el proceso de pasteurización puede llevar a la degradación de estos compuestos disminuyendo la cantidad de compuestos bioactivos bioaccesibles (149).

6.2.1.4 Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante disminuyó en los tres jugos después del proceso digestivo. El jugo TUS obtuvo los valores más altos por ABTS y DPPH (26.16 mg EVC/L y 391.8 μ mol ET/L, respectivamente). Esto se debe a que el tratamiento de termoultrasonido genera el rompimiento de membranas de las vacuolas, liberando compuestos con actividad antioxidante que pudieran ser bioaccesibles en esta muestra TUS (70). Dicha disminución fue mayor en el jugo pasteurizado, el cuál fue más del 50% de su actividad antioxidante

medido por ABTS y DPPH. El jugo control tuvo una pérdida del 44% por ABTS y 31% por DPPH, y el jugo tratado por termoultrasonificado tuvo una menor pérdida del 34% y 42% ($p \leq 0.05$) por ABTS y DPPH, respectivamente (Figura 10).

La disminución de actividad antioxidante durante el proceso de digestión *in vitro* ha sido reportado en diferentes estudios. Esta disminución es debido a la correlación que pudiera existir entre los compuestos con actividad antioxidante y la actividad antioxidante total, debido a múltiples razones como son cambios de pH, formación de compuestos macromoleculares no dializables, cambios de estructura, etc. (60, 107, 138, 141-143, 149). Por lo que la pérdida ya reportada con anterioridad de ácido ascórbico, polifenoles totales y betalainas, supondría una disminución de actividad antioxidante.

Como ya se había mencionado, son múltiples los estudios en los que se discute la correlación de los compuestos con capacidad antioxidante y la propia actividad antioxidante, especialmente entre el ácido ascórbico y los polifenoles totales contenidos en el alimento (132-135). En estudios previos de bioaccesibilidad *in vitro* de pulpa de tuna, se halló correlación entre la actividad antioxidante y los polifenoles (60), sin embargo como se muestra en la tabla 14, se puede observar que existe correlación entre la actividad antioxidante por DPPH y pigmentos (betacianinas $r=0.715$, $p \leq 0.05$; betaxantinas $r=0.794$, $p \leq 0.05$) y ácido ascórbico ($r=0.929$, $p \leq 0.01$), mientras que por ABTS solo existe correlación con el ácido ascórbico ($r=0.713$, $p \leq 0.05$), por lo que se puede inferir que el ácido ascórbico es el mayor contribuyente de la actividad antioxidante bioaccesible en este estudio.

Tabla 14. Correlación entre compuestos antioxidantes y actividad antirradical después de digestión *in vitro*

	DPPH	ABTS
Ácido ascórbico	0.929 (**)	0.713(*)
Betacianinas	0.715 (*)	----
Betaxantinas	0.794(*)	----

**La correlación es significativa al nivel $p \leq 0.01$. * La correlación es significativa al nivel $p \leq 0.05$.

6.3 Extractos.

6.3.1 Rendimiento y Actividad Antioxidante

Los jugos control, pasteurizado y TUS fueron liofilizados, de los cuales se obtuvieron 90% de humedad. De estos jugos liofilizados, se realizaron extracciones por disolventes, hexano, acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). En la tabla 15 se ilustran los rendimientos de las extracciones, se puede observar que la muestra tiene una buena solubilidad en solventes polares (MeOH), por lo que se tiene un mayor rendimiento, y poca solubilidad en solventes medianamente polares y no polares como el AcOEt y Hexano. Lo que indica la presencia de sustancias de mediana y alta polaridad.

Tabla 15. Valores de rendimiento de extractos por disolvente de jugos liofilizados (g/50g).

Tratamiento	Hexano	AcOEt	MeOH	Residuo
Control	0.009 ± 0.002 ^d	0.028 ± 0.010 ^c	44.735 ± 1.400 ^a	3.580 ± 0.610 ^b
Pasteurizado	0.012 ± 0.003 ^d	0.039 ± 0.010 ^c	43.307 ± 1.600 ^a	3.010 ± 0.580 ^b
TUS	0.024 ± 0.003 ^d	0.041 ± 0.020 ^c	41.605 ± 1.300 ^a	3.350 ± 0.490 ^b

^{a-d} Diferentes letras indica diferencia significativa por Tukey ($p \leq 0.05$) entre las extracciones de jugo liofilizado. AcOEt= Acetato de Etilo; MeOH= Metanol

La capacidad antioxidante de los extractos se muestra en las figuras 11 y 12, donde se observa que existe un aumento conforme se utilizan disolventes con mayor polaridad. Para la determinación por ABTS, aumenta de 1.45 mg EVC/L en la extracción de jugo pasteurizado con hexano, hasta 50 mg EVC/L para la extracción de jugo TUS extraído por MeOH; en el caso de la determinación por DPPH aumenta de 16 $\mu\text{mol ET/L}$ en el extracto obtenido por hexano del jugo control, a 622 $\mu\text{mol ET/L}$ en el extracto de MeOH del jugo pasteurizado, la mayor actividad antioxidante obtenidas en las extracciones de metanol es debido, a que los compuestos antioxidantes tienden a ser más polares(150), ya que estos tienen un gran número de enlaces polares, carbono-oxígeno-hidrógeno, al mismo tiempo que el metanol tiene la propiedad de formar puentes de hidrógeno, lo que explica la gran solubilidad de estos compuestos en solventes polares (151).

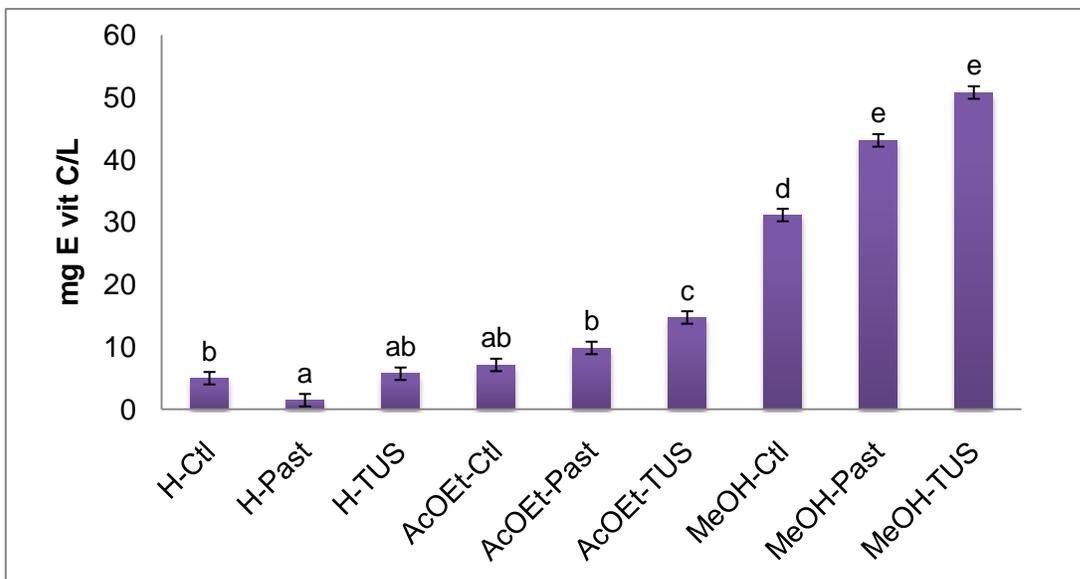


Figura 11. Actividad Antioxidante por ABTS^{•+} de extractos de jugos. ^{a-c} Diferentes letras indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las extracciones. H= hexano; AcOET= Acetato de etilo; MeOH= Metanol; Ctl= Control; Past= Pasteurizado; TUS= Termoultrasonico

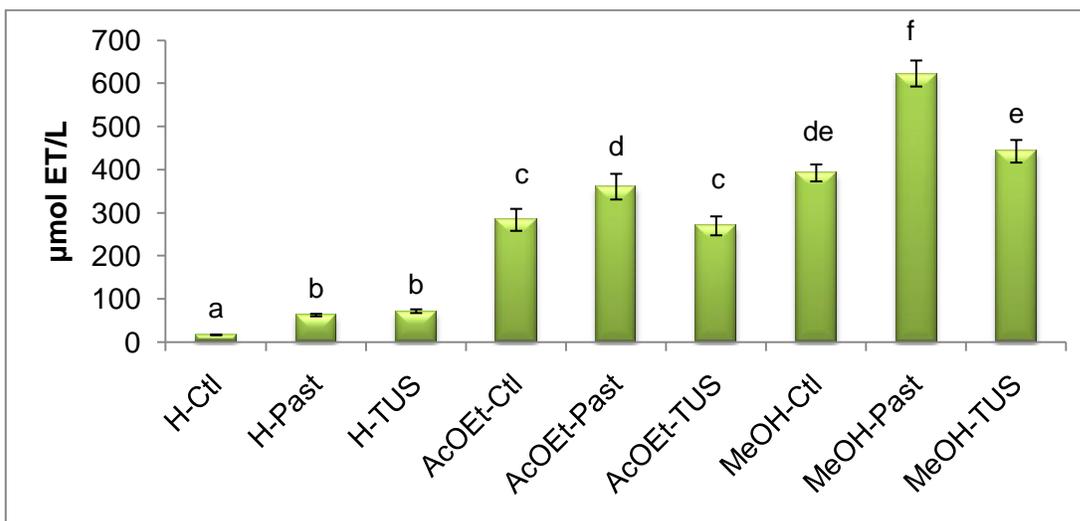


Figura 12. Actividad Antioxidante por DPPH de extractos de jugos. ^{a-c} Diferentes letras indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las extracciones. H= hexano; AcOET= Acetato de etilo; MeOH= Metanol; Ctl= Control; Past= Pasteurizado; TUS= Termoultrasonico

6.4 Fracciones

Debido a que la actividad antioxidante de la tuna es la suma de todos los compuestos antioxidantes del fruto (131), se dividió el extracto con mayor actividad antioxidante por

cromatografía de columna con sílice gel, para encontrar los compuestos responsables de la actividad, el cual fue el extracto metanólico. La división se elaboró con tres distintas concentraciones de disolvente 1) AcOEt; 2) AcOEt:MeOH (1:1); y 3) AcOEt:MeOH (1:9), para purificar y determinar dichos compuestos.

6.4.1 Rendimiento y Actividad Antioxidante de las fracciones

De la columna de cromatografía con sílice gel, se obtuvieron tres distintas fracciones, en la tabla 14 se ilustra el rendimiento y en las figuras 14 y 15 la actividad antioxidante de estas fracciones.

Tabla 16. Valores de rendimiento de fracciones de extracción metanólica (%)

Tratamiento	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3
Control	3.8±0.5 ^a	81.71±3.1 ^c	6.71±0.5 ^b
Pasteurizado	4.3±0.5 ^a	84.755±3.4 ^c	6.2±.06 ^b
TUS	4.58±0.6 ^a	78.87±3.8 ^c	6.8±.03 ^b

^{a-b}Diferentes letras indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las fracciones.

En estas se puede observar, que la fracción 1 presentó valores estadísticamente mayores de actividad antioxidante (265.68±44.28 mg E Vit C/L y 3238±114 µmol ET/L, para las determinaciones de ABTS y DPPH, respectivamente) comparada con las fracciones 2 (5.68±0.04 mg E Vit C/L y 113.12±0.38 µmol ET/L, para las determinaciones de ABTS y DPPH, respectivamente) y 3 (48.25±2.58 mg E Vit C/L y 600.78±2.67 µmol ET/L, para las determinaciones de ABTS y DPPH, respectivamente), sin embargo es la fracción con menor rendimiento (Tabla 16), lo contrario sucede con la fracción 2 cuyo rendimiento fue el mayor pero su actividad antioxidante fue la que presentó los valores más bajos, por lo que primero se caracterizaron los compuestos en la fracción dos para conocer los compuestos mayoritarios.

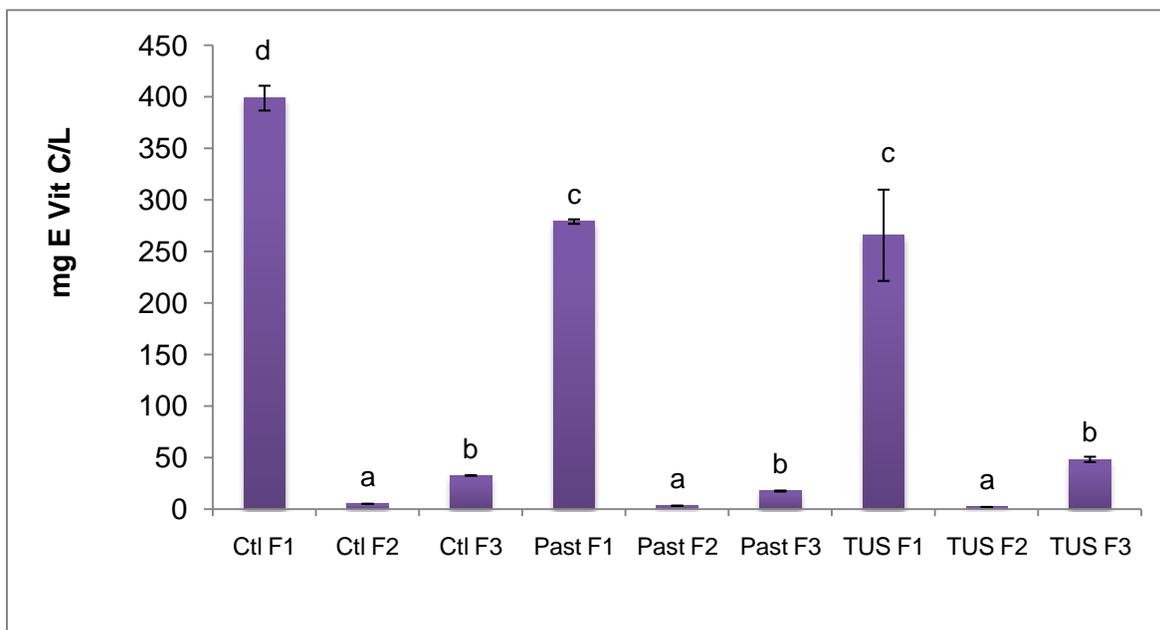


Figura 13. Actividad Antioxidante por ABTS^{•+} de fracciones de extracto metanólico. ^{a-c} Diferentes letras indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las fracciones de extracto metanólico.

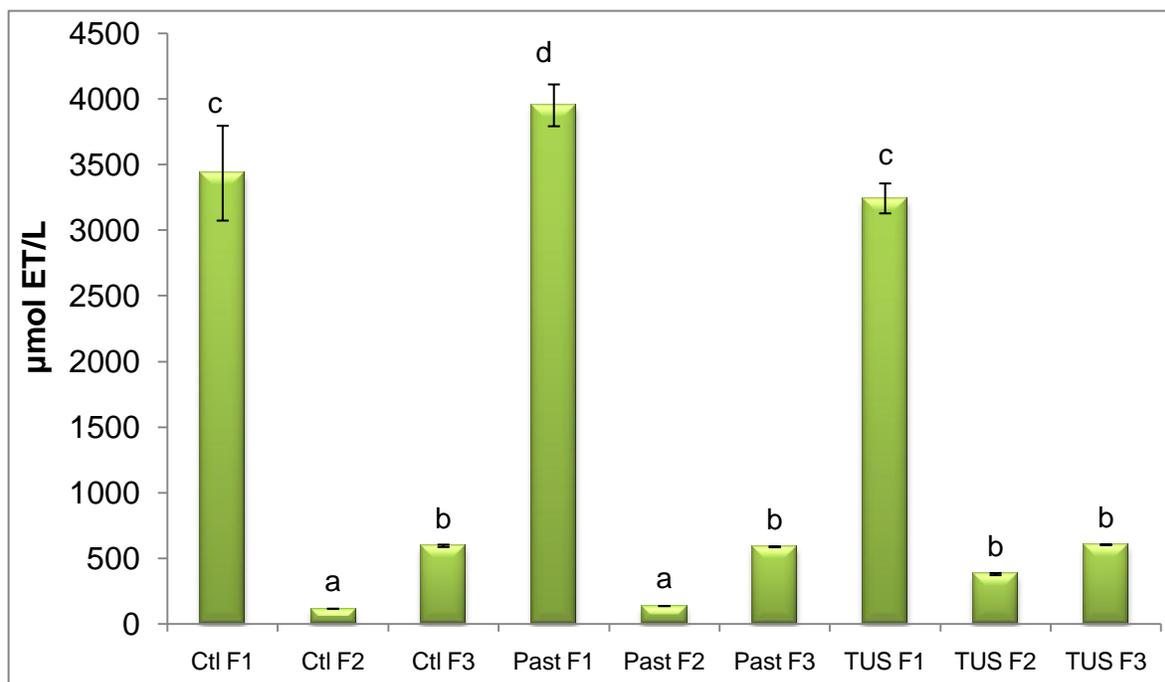


Figura 14. Actividad Antioxidante por DPPH de fracciones de extracto metanólico. ^{a-c} Diferentes letras indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las fracciones de extracto metanólico

6.5. Descripción de Compuestos Aislados

Para describir los compuestos de la fracción dos, este se dividió mediante columna en gel de sílice utilizando AcOEt-MeOH (1:1). La muestra resultante se mantuvo en reposo a temperatura ambiente en matraz durante 2 semanas, en donde se comenzaron a formar una serie de cristales color blanco-transparente, estos fueron recuperados y lavados con MeOH, siendo ésta la primera muestra obtenida (500 mg). Lo restante se mantuvo en reposo, hasta obtener una sustancia viscosa semitransparente color amarillo (segunda muestra, 500 mg), ambas muestras se sometieron a RMN, obteniendo como resultado dos disacáridos.

6.5.1. Disacárido 1

El disacárido 1 (cristales blanco-transparente) fue sometido RMN de ^1H (400 MHz D_2O) (figura 16). Dos de sus regiones son típicas, la primera entre 3.00 ppm y 3.75 ppm, la cual cuenta con una serie de señales, la segunda entre 4.40 ppm y 5.40 ppm, en la cual se presentan las siguientes señales: protones anoméricos de las dos glucopiranosas, β -glucopiranososa (4.48 ppm con J 8) y α -glucopiranososa (5.12 ppm con J 4). En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz D_2O) se muestran los carbonos base de protón anomérico el de α -glucopiranososa a 91.97 ppm y el de β -glucopiranososa a 96.78 ppm (figura 17). Sus datos espectroscópicos (tabla 17) fueron comparados con los de la literatura (152), correspondiendo a α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-glucopiranosido (α - β trehalosa).

400MHz

D₂O

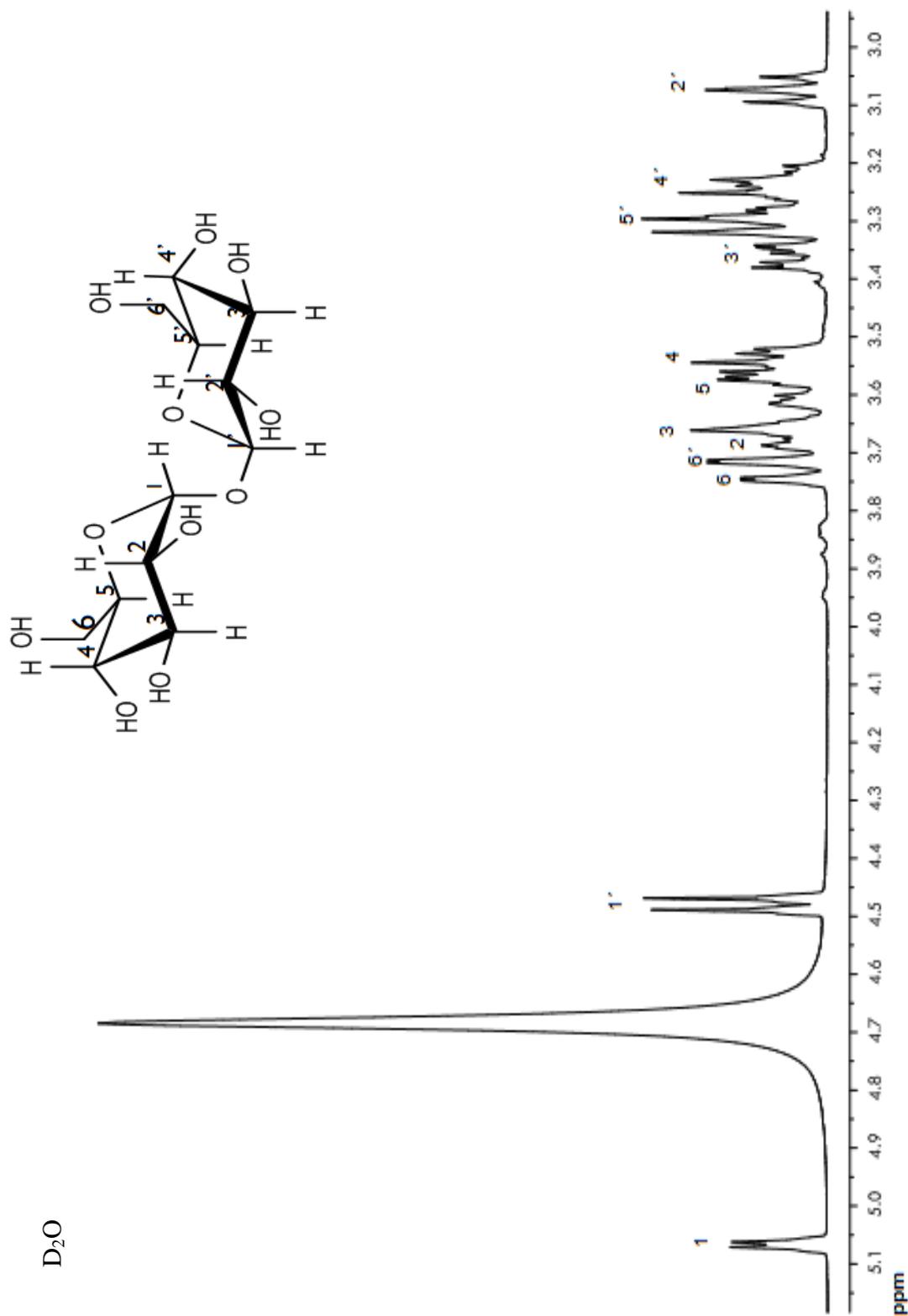


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H de α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-glucopiranosido

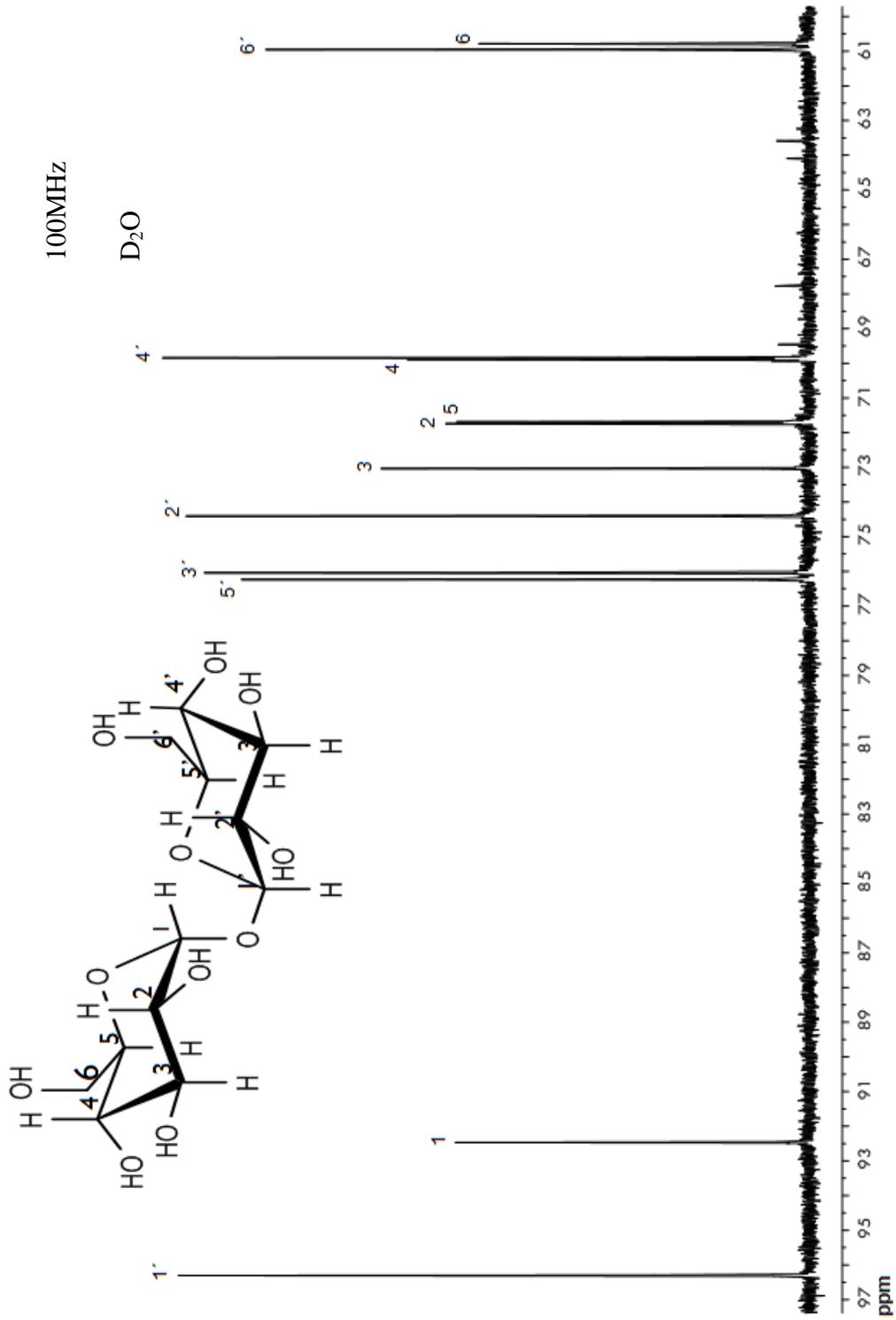


Figura 16. Espectro de RMN den ¹³C de α-D-Glucopiranosil-(1→1)-β-D-glucopiranosido

Tabla 17. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz de α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 1)- β -D-glucopiranosido

Compuesto	^{13}C ppm	^1H ppm
<i>α</i> -Glucoripanosil		
1	91.97	5.16
2	71.35	3.67
3	72.63	3.65
4	69.51	3.54
5	71.30	3.56
6	60.45	3.74
<i>β</i> -Glucopiranosido		
1'	96.78	4.48
2'	74.00	3.15
3'	75.62	3.38
4'	69.46	3.28
5'	75.82	3.31
6'	60.52	3.71

Es la primera evidencia que existe de una α - β -trehalosa en jugo de tuna. En un estudio realizado en *Opuntia ficus-indica*, se observó por primera vez la presencia de un glucano neutral y dos fracciones de polisacáridos ácidos de los cladodios de *Opuntia ficus indica*. De la fracción neutra sólo una pequeña cantidad de glucano fue aislado, la cual no fue suficiente para realizar una detallada caracterización estructural (153). En un trabajo más reciente, se aisló y caracterizó un disacárido novedoso en los frutos de *Opuntia ficus indica* (L.) Miller, (1 \rightarrow 4) - α -D-glucano (154), sin embargo no encontraron evidencia de un α -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 1) - β -D-glucopiranosido que es la trehalosa aislada en este trabajo.

6.5.2 β -sitosterol

La fracción 1 de la extracción metanólica (500 mg) se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice, usando mezclas de hexano-AcOEt-MeOH en orden creciente de polaridad como eluyente, aislándose una serie de cristales blancos en la fracción 3 (15 mg), los cuales fueron lavados cuidadosamente con hexano. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz CDCl_3) mostró señales de metilenos entre 0.6 y 1.2 ppm, una señal de protón base de hidroxilo en 3.5 ppm y una señal de alqueno a 5.4 ppm (Figura 18). En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz CDCl_3) se observan señales correspondientes de los metilos presentes en la molécula entre 11.8 y 20 ppm, en 121.79 ppm las señales pertenecientes al carbono de alqueno y el resto de las señales perteneciente a la molécula entre 21 y 43 ppm (Figura 189). Los espectros de RMN (tabla 18) fueron consistentes con los de la literatura (155) y correspondieron a β -sitosterol.

El β -sitosterol es un esteroide vegetal, que tiene una relativamente fuerte evidencia de un efecto beneficioso sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular (156), también puede jugar un importante papel en la atenuación de cáncer de mama, próstata y colon, así como un papel quimioterapéutico (157, 158).

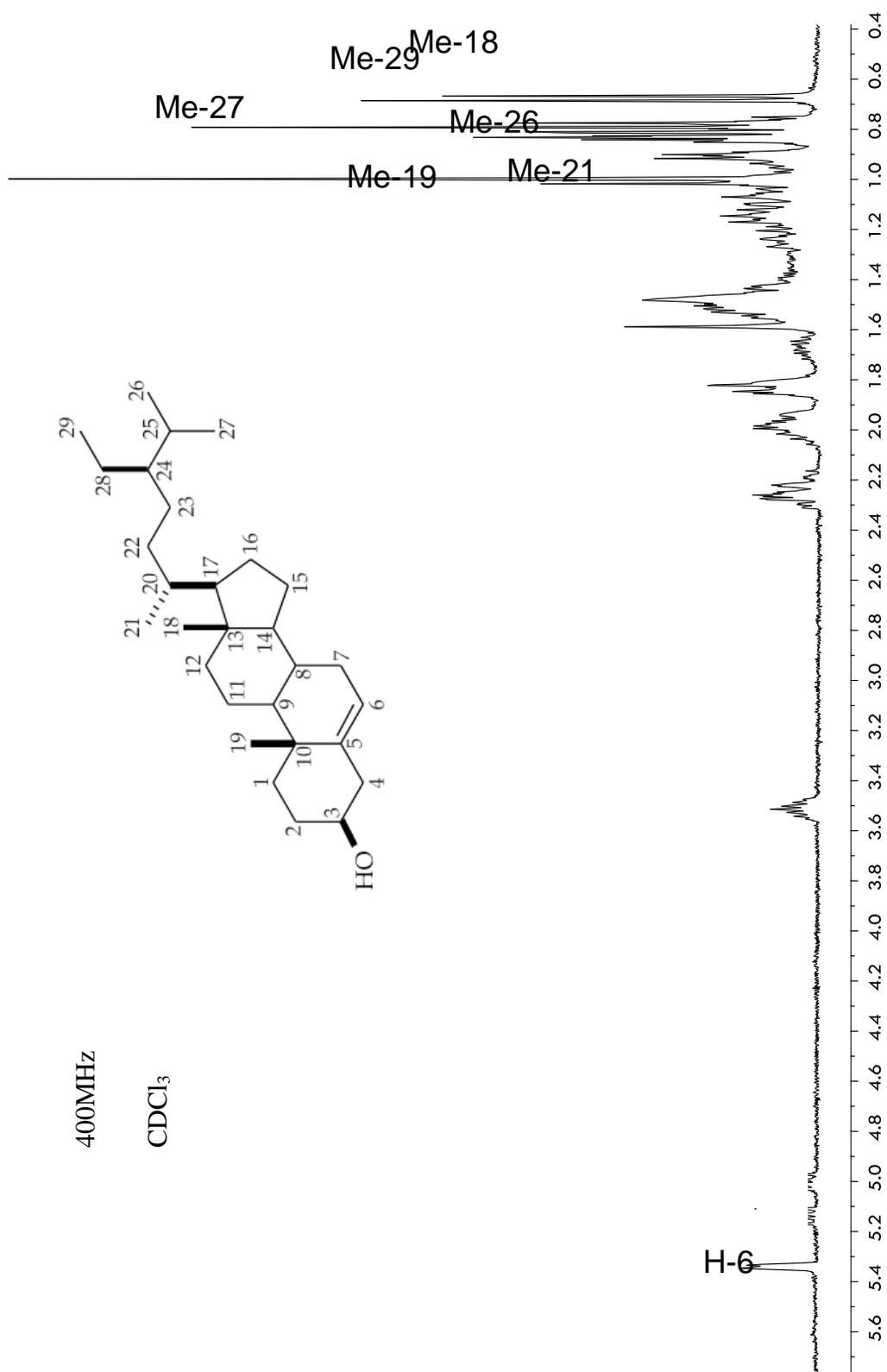


Figura 17. Espectro RMN ¹H β-sitosterol

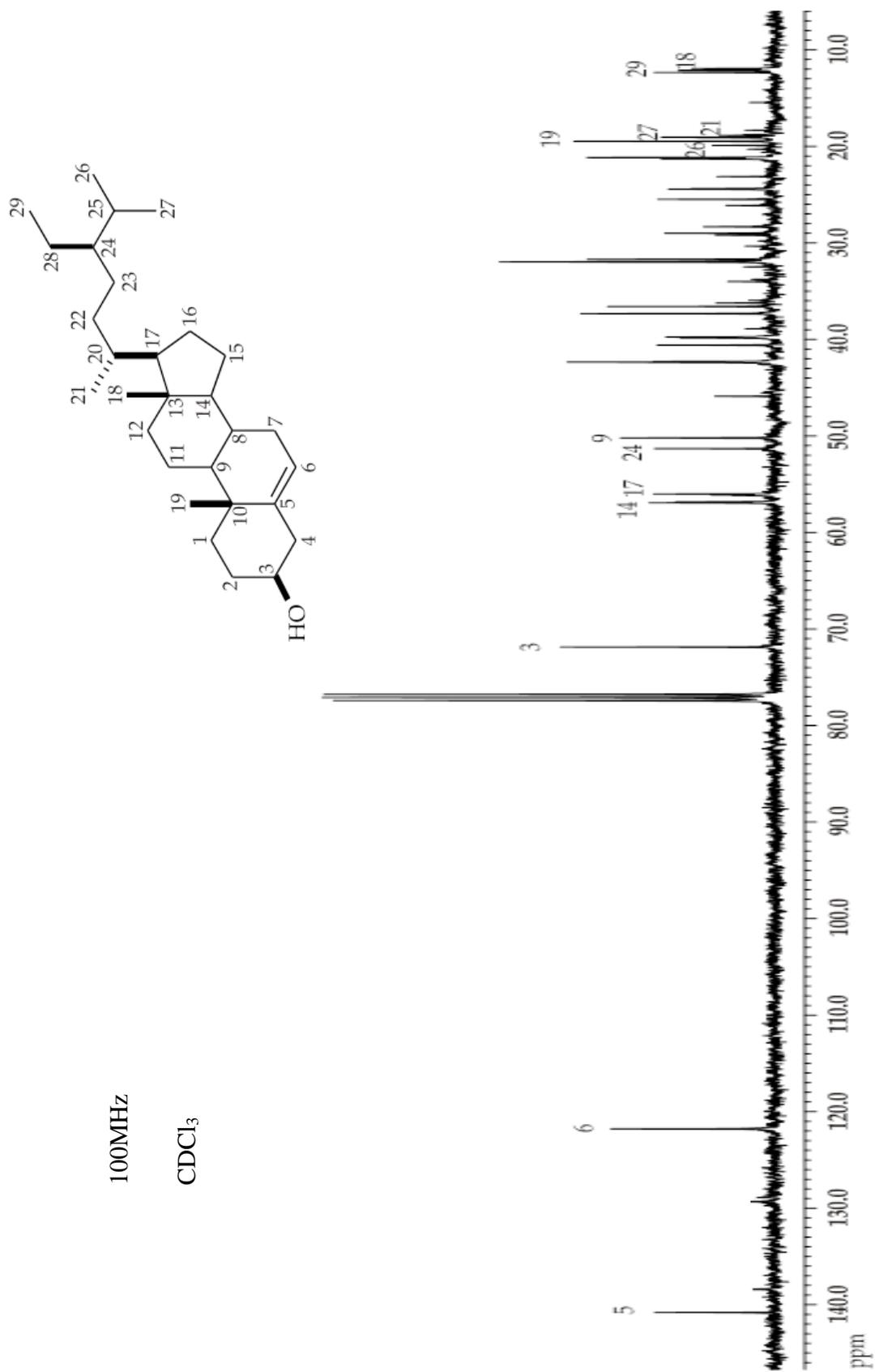


Figura 18. Espectro RMN ¹³C β-sitosterol

Tabla 18. Datos espectroscópicos de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz de β -sitosterol en CDCl_3

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ ppm (mult., J en HZ)
1	37.3	-
2	31.7	-
3	71.9	3.5 (m)
4	42.4	-
5	140.8	-
6	121.8	5.4 (m)
7	31.7	-
8	32.0	-
9	50.2	-
10	36.7	-
11	21.2	-
12	39.9	-
13	42.3	-
14	57.0	-
15	24.4	-
16	28.3	-
17	56.1	-
18	12.0	0.7 (s)
19	19.5	1.0 (s)
20	36.2	-
21	18.9	1.0 (d, 7.1 Hz)
22	34.0	-
23	26.1	-
24	45.9	-
25	29.2	-
26	19.9	0.8 (m)
27	19.1	0.8 (s)
28	23.1	-
29	12.1	0.9 (m)

VII CONCLUSIONES

- Comparado con el jugo control, el tratamiento por termoultrasonido permite la liberación de compuestos con actividad antioxidante en el jugo de tuna combinado, aumentando 40% la cantidad de polifenoles totales, 5% de betacianinas, 30% y 60% de actividad antioxidante por ABTS y DPPH, respectivamente, existiendo pérdida de los pigmentos (BT, 10%; BX, 7%) durante el proceso de pasteurización.
- Existió correlación entre AA ($r=0.778$; $p\leq 0.05$), FT ($r=0.820$; $p\leq 0.05$) y BT ($r=0.726$; $p\leq 0.05$) con la actividad antioxidante por DPPH, y también de AA ($r=0.912$; $p\leq 0.05$) y FT ($r=0.959$; $p\leq 0.05$) con la actividad antioxidante por ABTS, por lo que estos compuestos son los responsables mayoritarios de la actividad antioxidante del jugo de tuna combinado.
- Después de someter las muestras a un modelo de digestión *in vitro*, se observa que existe una disminución de hasta el 62% de AA, 50% de FT, 53% de BC, 35% de BX, 58% de actividad antioxidante por ABTS y 52% de actividad antioxidante por DPPH.
- A pesar de que los porcentajes bioaccesibles no eran los mayores, una elevada cantidad de AA, BX y actividad antioxidante por ABTS y DPPH, fueron bioaccesible en jugo termoultrasonido, por lo que la liberación de compuestos bioactivos durante el proceso de termoultrasonificación, permite un aumento en la concentración de los compuestos bioaccesibles.
- El jugo pasteurizado cuenta con las menores cantidades de compuestos y actividad antioxidante, así como menores porcentajes de los mismos, por lo que el tratamiento de pasteurización daña los compuestos bioactivos, existiendo una menor cantidad de los mismos en su bioaccesibilidad.
- Existe correlación entre AA ($r=0.929$; $p\leq 0.05$), BT ($r = 0.715$; $p\leq 0.05$) y BX ($r=0.715$; $p \leq 0.05$) con la actividad antioxidante por DPPH, y de AA ($r=0.714$; $p\leq 0.05$) con la actividad antioxidante por ABTS, asumiendo que dichos compuestos son los principales responsables de la actividad antioxidante bioaccesible, siendo el mayor contribuyente el AA en el jugo de tuna combinado

- De las 3 extracciones que se elaboraron a los jugos, hexano, AcOEt y MeOH, los compuestos con mayor actividad antioxidante de los jugos son polares, debido a que la mayor actividad antioxidante se encuentra en los extractos metanólicos (3800 μ mol ET/L y 400 mg EVC/L), al mismo tiempo que es la extracción con mayor rendimiento (MeOH, 44g, de 50 g de jugo liofilizado).
- El extracto metanólico se pudo dividir en 3 fracciones, la fracción menos polar es la que obtuvo valores más altos de actividad antioxidante (DPPH, 3800 μ mol ET/L; ABTS, 400 mg E vit C/L), siendo esta fracción la que cuenta con el menor rendimiento (4%). Mientras que en la segunda fracción tiene el mayor rendimiento (81%), aunque presenta la menor actividad antioxidante (DPPH, 400 μ mol ET/L; ABTS, 5 mg EVC/L).
- De la fracción 1 del extracto metanólico de los 3 jugos, se extrajo el β sitosterol, el cual es un compuesto bioactivo encontrado en la mayoría del reino plantae, con diversos beneficios hacia la salud cardiovascular del consumidor.
- En la en la segunda fracción se encuentran 2 disacáridos mayoritarios, de los cuales es identificada por primera vez la α - β trehalosa en la tuna

IX BIBLIOGRAFÍA.

1. Nobel SP. Cacti, biology and uses. Nobel SP, editor. Estados Unidos de América: California University Press; 2002.
2. Shaw JJ, Ferguson, D.J., Hussey, N. Opuntia Web. USA: Shaw, J.J. Citado: septiembre 2014 Disponible en: <http://opuntiads.com/>.
3. Mendez-Gallegos SJ, García-Herrera J. La tuna: Producción y diversidad. CANABIO Biodiversitas. 2006;68:1-5.
4. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Monografía del Nopal y Tuna. Mexico: Financiera Rural, 2011.
5. Esparza-Sandoval S. Distribución geográfica del género *Opuntia* (cactaceae) en México. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2010.
6. Santos-Zea L, Gutierrez-Urbe JA, Serna-Saldivar SO. Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. J Agric Food Chem. 2011;59(13):7054-61.
7. Yahia EM, Mondragon-Jacobo C. Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). Food Res Intl. 2011;44(7):2311-8.
8. Trejo-González A, Gabriel-Ortiz G, Puebla-Pérez AM, Huízar-Contreras MD, del Rosario Munguía-Mazariegos M, Mejía-Arreguín S. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. J Ethnopharmacol. 1996;55(1):27-33.
9. Bwititi P, Musabayane CT, Nhachi CFB. Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. J Ethnopharmacol. 2000;69(3):247-52.
10. Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. Anti-hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lem. J Ethnopharmacol. 2011;133(2):940-3.
11. Budinsky A, Wolfram R, Oguogho A, Efthimiou Y, Stamatopoulos Y, Sinzinger H. Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2001;65(1):45-50.

12. Serra AT, Poejo J, Matias AA, Bronze MR, Duarte CMM. Evaluation of *Opuntia* spp. derived products as antiproliferative agents in human colon cancer cell line (HT29). *Food Res Int.* 2013;54(1):892-901.
13. Loro JF, del Rio I, Pérez-Santana L. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 1999;67(2):213-8.
14. Reyes-Agüero A, Aguirre-Rivera R, Hernández H. Systematic notes and detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. (Cactaceae). *Agrociencia.* 2005;39(4):395-408.
15. Flores-Valdez C, De Luna-Esquivel J, Ramírez-Moreno P, Corrales-García J, Ponce-Javana P. Mercado Mundial de la Tuna. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). Universidad Autónoma Chapingo (UACH). 1995.
16. SIAP. Producción Anual. Citado: Diciembre 2014; Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/>.
17. Betancourt-Dominguez MA, Hernandez-Perez T, Garcia-Saucedo P, Cruz-Hernandez A, Paredes-Lopez O. Physico-chemical changes in cladodes (nopalitos) from cultivated and wild cacti (*Opuntia* spp.). *Qual Plant.* 2006;61(3):115-9.
18. Cantwell M. Composition and nutritive value of cactus fruits and stems. In: Felker P, Moss JR, editors. Fifth Annual Texas Prickly Pear Council; Kinsville, TX.1994.
19. Abdel-Hameed el SS, Nagaty MA, Salman MS, Bazaid SA. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chem.* 2014;160:31-8.
20. Stintzing F.C. AS, R. Carle. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. *Eur Food Res Technol.* 2001;212:396-407.
21. Sawaya W. N. HAK, W. M. Safi, H. M. Al-Hammad. Chemical characterization of prickly pear pulp, *Opuntia ficus indica*, and the manufacturing of prickly pear jam. *J Food Technol.* 1983;18:183-93.
22. Ramadan M.F. JTM. Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: A good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. *Food Chem.* 2003;83:447-56.

23. Coskuner Y. T, A. composition of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L) fruits during maturation period. *J Sci Food Agr.* 2003;83:846-9.
24. Tan C.P. CM, Y.B. Differential scanning calorimetric analysis of edible oils: comparison of thermal properties and chemical composition. *J Am Oil Chem Soc.* 2000;77:143-55.
25. Pérez-Lizaur AB, Palacios-González B, Marván-Laborde L, Castro-Becerra AL. Frutas. In: Salud FdNy, editor. Sistema mexicano de alimentos equivalentes. México2008. p. 108.
26. FAO. TUNA (*Opuntia ficus indica*). FAO; Citado: Agosto 2014; Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/TUNA.HTM.
27. Sumaya-Martínez MT, Suárez Diéguez T, Cruz-Cansino NS, Alanís-García E, José G. Sampedro J. Innovación de Productos de Alto Valor Agregado a partir de Tuna Mexicana. *Revista Mexicana de Agronegocios.* 2010;4:435-41.
28. Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias. Memoria Estadística. CANAINCA. 2003.
29. Halsted CH. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *Am J Clin Nutr.* 2003;77(4 Suppl):1001S-7S.
30. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J Food Comp Anal.* 2011;24(7):1043-8.
31. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem.* 2009;11:1768-74.
32. Shimizu T. Newly established regulation in Japan: foods with health claims. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2002;11(2):S94-6.
33. Zink DL. The impact of consumer demands and trends on food processing. *Emer Infect Dis.* 1997;3(4):467-9.

34. Vieira AR, Vingeliene S, Chan DS, Aune D, Abar L, Navarro Rosenblatt D. Fruits, vegetables, and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2015;4(1):136-46.
35. Malin AS, Qi D, Shu XO, Gao YT, Friedmann JM, Jin F. Intake of fruits, vegetables and selected micronutrients in relation to the risk of breast cancer. *Int J Cancer.* 2003;105(3):413-8.
36. Kinsella JE, Frankiel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* 1993;47(4):85-90.
37. Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):840-60.
38. Rimbach G, Hohler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv fur Tierernahrung.* 1999;52(3):203-22.
39. Li X, P. F, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol.* 2013;6(19):1-19.
40. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews.* 2002;82(1):47-95.
41. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Med.* 2006;23(5):469-80.
42. Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *BJA.* 2013;110(3):472-80.
43. INEGI. Cuéntame... Población. Mortalidad. 2011 Citado: Septiembre 2014, Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/defunciones.aspx?tema=P>.
44. UICC. Global Cancer Control. Citado: Septiembre 2014, Disponible en: <http://www.uicc.org/>.

45. Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M, Stassi G. Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Seminars in cancer biology*. 2013.
46. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*. 2007;2(2):219-36.
47. Janicki-Deverts D, Cohen S, Matthews KA, Gross MD, Jacobs DR, Jr. Socioeconomic status, antioxidant micronutrients, and correlates of oxidative damage: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Psychosom Med*. 2009;71(5):541-8.
48. Tutel'ian VA, Lashneva NV. [Biologically active substances of plant origin. Flavonols and flavones: prevalence, dietary sources and consumption]. *Voprosy Pitaniia*. 2013;82(1):4-22.
49. Juraschek SP, Guallar E, Appel LJ, Miller ER, 3rd. Effects of vitamin C supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(5):1079-88.
50. Nikolaidis MG, Kerksick CM, Lamprecht M, McAnulty SR. Does vitamin C and E supplementation impair the favorable adaptations of regular exercise? *Oxid Med Cell Longev*. 2012;12:70-79.
51. Pasinetti GM. Novel Role of Red Wine-Derived Polyphenols in the Prevention of Alzheimer's Disease Dementia and Brain Pathology: Experimental Approaches and Clinical Implications. *Plant Med*. 2012;78:1614-9.
52. Tamura T, Inoue N, Ozawa M, Shimizu-Ibuka A, Arai S, Abe N. Peanut-Skin Polyphenols, Procyanidin A1 and Epicatechin-(4 beta-->6)-epicatechin-(2 beta-->O-->7, 4 beta-->8)-catechin, Exert Cholesterol Micelle-Degrading Activity in Vitro. *Biosci Biotechno Biochem*. 2013;77(6):1306-9.
53. Ogawa S, Matsumae T, Kataoka T, Yazaki Y, Yamaguchi H. Effect of acacia polyphenol on glucose homeostasis in subjects with impaired glucose tolerance: A randomized multicenter feeding trial. *Exp Ther Med*. 2013;5(6):1566-72.
54. Kuti JO. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *Food Chem*. 2004;85(4):527-33.
55. Stintzing FC, Schieber A, Carle R. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance

liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2002;50(8):2302-7.

56. Fernandez-Lopez JA, Almela L, Obon JM, Castellar R. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010;65(3):253-9.

57. Alimi H, Hfaiedh N, Bouoni Z, Sakly M, Ben Rhouma K. Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* flowers extract in rats. *Environ Toxicol Pharm.* 2011;32(3):406-16.

58. El Gharras H. Betalain: a particular class of antioxidant pigment. *Nat Prod Commun.* 2011;6(10):1425-31.

59. Stintzing FC, Herbach KM, Mosshammer MR, Carle R, Yi W, Sellappan S. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J Agric Food Chem.* 2005;53(2):442-51.

60. Ramírez-Moreno E, Hervert-Hernández D, Sánchez-Mata MC, Díez-Márques C, Goñi I. Intestinal bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity of pulp and seeds of cactus pear. *Int J Food Sci Nutr.* 2011;62(8):839-43.

61. Alimi H, Hfaiedh N, Mbarki S, Bouoni Z, Sakly M, Ben Rouma K. Evaluation of *Opuntia ficus indica* f. *inermis* fruit juice hepatoprotective effect upon ethanol toxicity in rats. *Gen Physiol Biophys.* 2012;31(3):335-42.

62. Dok-Go H, Lee KH, Kim HJ, Lee EH, Lee J, Song YS. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* 2003;965(1-2):130-6.

63. Galati EM, Tripodo MM, Trovato A, Miceli N, Monforte MT. Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter. Note I: diuretic activity. *J ethnopharmacol.* 2002;79(1):17-21.

64. Tesoriere L, Butera D, Pintaudi AM, Allegra M, Livrea MA. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(2):391-5.

65. Tesoriere L, Fazzari M, Allegra M, Livrea MA. Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of Sicilian cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. *J Agric Food Chem.* 2005;53(20):7851-5.

66. Marín EB, Lemus RM, Flores MV, Vega AG. Rehidratación de alimentos deshidratados. *Rev Chil Nutr.* 2006;33(3).
67. Lee SH, Coates GA. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Food Sci Tech.* 2003;36(1):153-6.
68. Wells JH, Singh RP. Application of Time-Temperature Indicators in Monitoring Changes in Quality Attributes of Perishable and Semiperishable Foods. *J Food Sci.* 1988;53(1):148-52.
69. Cardello AV. Consumer concerns and expectations about novel food processing technologies: effects on product liking. *Appetite.* 2003;40(3):217-33.
70. Herrero LM, Romero de Avila MD. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Rev Med Unive Navarra.* 2006;50(4):71-4.
71. Xia T, Shi S, Wan X. Impact of ultrasonic-assisted extraction on the chemical and sensory quality of tea infusion. *J Food Eng.* 2006;74(4):557-60.
72. Balachandran S, Kentish SE, Mawson R, Ashokkumar M. Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrason Sonochem.* 2006;13(6):471-9.
73. Moulton KJ, Wang LC. A pilot plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein. *J Food Sci.* 1982;47(4):1127-9.
74. Riera E, Golás Y, Blanco A, Gallego JA, Blasco M, Mulet A. Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 2004;11(3-4):241-4.
75. Baumann AR, Martin SE, Feng H. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms from stainless steel by use of ultrasound and ozone. *J Food Prot.* 2009;76(6):1306-9.
76. Chai X, Kobayashi T, Fujii N. Ultrasound-associated cleaning of polymeric membranes for water treatment. *Sep Purif Technol.* 1999;15(2):139-46.
77. Feng H, Yang W. Ultrasonic Processing. In: Zhang HQ, Barbosa-Cánovas GV, Balasubramaniam VM, Dunne CP, Farkas DF, J.T.C. Y, editors. *Nonthermal Processing Technologies for Food.* United States of America: Wiley-Blackwell; 2011.
78. Soria AC, Villamiel M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci Tech.* 2010;21(7):323-31.
79. Kentish S, Feng H. Applications of power ultrasound in food processing. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2014;5:263-84.

80. Gabriel AA. Microbial inactivation in cloudy apple juice by multi-frequency Dynashock power ultrasound. *Ultrason Sonochem.* 2012;19(2):346-51.
81. Valero M, Recrosio N, Saura D, Muñoz N, Martí N, Lizama V. Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *J Food Eng.* 2007;80(2):509-16.
82. Aadil RM, Zeng X-A, Han Z, Sun D-W. Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chem.* 2013;141(3):3201-6.
83. Abid M, Jabbar S, Wu T, Hashim MM, Hu B, Lei S. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrason Sonochem.* 2013;20(5):1182-7.
84. Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Cullen PJ, O'Donnell CP. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason Sonochem.* 2010;17(3):598-604.
85. Hoover DG. Minimally processed fruits and vegetables: reducing microbial load by nonthermal physical treatments. *Food Tech.* 1997;51:66-71.
86. Wong E, Vaillant F, Perez A. Osmosonication of blackberry juice: impact on selected pathogens, spoilage microorganisms, and main quality parameters. *J Food Sci.* 2010;75(7):M468-74.
87. Raso J, Palop A, Pagan R, Condon S. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *J Appl Microbiol.* 1998;85(5):849-54.
88. Raso J, Pagan R, Condon S, Sala FJ. Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(2):465-71.
89. Raso J, Gongora-Nieto MM, Barbosa-Canovas GV, Swanson BG. Influence of several environmental factors on the initiation of germination and inactivation of *Bacillus cereus* by high hydrostatic pressure. *Int J Food Microbiol.* 1998;44(1-2):125-32.
90. Demirdoven A, Baysal T. The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation. *Food Rev Intl.* 2009;25:1-11.
91. Vercet A, Lopez P, Burgos J. Inactivation of heat-resistant pectinmethylesterase from orange by manothermosonication. *J Agric Food Chem.* 1999;47(2):432-7.
92. Lopez P, Sala FJ, de la Fuente JL, Condon S, J. R, J.J. B. Inactivation of peroxidase, lipoxygenase, and polyphenol oxidase by manothermosonication. *J Agric Food Chem.* 1994; 42(2) 252-56.

93. Caminiti IM, Noci F, Morgan DJ, Cronin DA. The effect of pulsed electric fields, ultraviolet light or high intensity light pulses in combination with manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. *Food Bioprod Process* 2012;0:442-8.
94. Guzel BH, Arroyo C, Condón S, Pagán R, Bayindirli A, Alpas H. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by Ultrasonic Waves Under Pressure at Nonlethal (Manosonication) and Lethal Temperatures (Manothermosonication) in Acidic Fruit Juices. *Food Bioprocess Tech.* 2014;7:1701.
95. Terefe NS, Gamage M, Vilku K, Simons L, Mawson R, Versteeg C. The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Food Chem.* 2009;117(1):20-7.
96. Muñoz A, Caminiti IM, Palgan I, Pataro G, Noci F, Morgan DJ. Effects on *Escherichia coli* inactivation and quality attributes in apple juice treated by combinations of pulsed light and thermosonication. *Food Res Int.* 2012;45(1):299-305.
97. Muñoz A, Palgan I, Noci F, Morgan DJ, Cronin DA, Whyte P. Combinations of High Intensity Light Pulses and Thermosonication for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. *Food Microbiol.* 2011;28(6):1200-4.
98. Rawson A, Tiwari BK, Patras A, Brunton N, Brennan C, Cullen PJ. Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Res Int.* 2011;44(5):1168-73.
99. Walkling-Ribeiro M, Noci F, Cronin DA, Lyng JG, Morgan DJ. Shelf life and sensory evaluation of orange juice after exposure to thermosonication and pulsed electric fields. *Food Bioprod Process.* 2009;87(2):102-7.
100. Wu J, Gamage TV, Vilku KS, Simons LK, Mawson R. Effect of thermosonication on quality improvement of tomato juice. *Innov Food Sci Emerg.* 2008;9(2):186-95.
101. Zafra-Rojas QY, Cruz-Cansino N, Ramirez-Moreno E, Delgado-Olivares L, Villanueva-Sanchez J, Alanis-Garcia E. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrason Sonochem.* 2013;20(5):1283-8.
102. Saura-Calixto F, Garcia-Alonso A, Goni I, Bravo L. In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *J Agric Food Chem.* 2000;48(8):3342-7.

103. Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Van Dyck K, Robberecht H, Van Cauwenbergh R, Deelstra H. Thickening infant formula with digestible and indigestible carbohydrate: availability of calcium, iron, and zinc in vitro. *JPGN*. 2000;30(4):373-8.
104. Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomed Pharmacother*. 2002;56(6):276-82.
105. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1 Suppl):230S-42S.
106. Rio DD, Costa LG, Lean MEJ, Crozier A. Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010;20(1):1-60.
107. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.
108. Parkar SG, Stevenson DE, Skinner MA. The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(3):295-8.
109. Cruz-Cansino NdS, Ramírez-Moreno E, León-Rivera JE, Delgado-Olivares L, Alanís-García E, Ariza-Ortega JA, et al. Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrasonic Sonochem*. 2015;27:277-86.
110. Dürüst N, Dogan S, Dürüst Y. Ascorbic acid and element contents of food of Trabzon (Turkey). *J Agric Food Chem*. 1997;45(6):2085-7.
111. Georgé S BP, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*. 2005;53(5):1370-3.
112. Delgado-Andrade C, Rufian-Henares JA, Morales FJ. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. *J Agric Food Chem*. 2005;53(20):7832-6.
113. Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de fruto. *CiêncTecnol Aliment*. 25(4): 726-32.
114. Miller DD, Schriker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr*. 1981;34(10):2248-56.

115. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU. Availability of calcium for absorption in the small intestine and colon from diets containing available and unavailable carbohydrates: an in vitro assessment. *Int J Food Sci Nutr.* 1996;47(1):83-8.
116. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* Brennan D, editor. New York, USA: John Wiley and sons, Inc.; 2005.
117. Cruz-Cansino N, Zafra-Rojas Q, Delgado-Olivares L, Alanís-García E, Ramírez-Moreno E. Ultrasound processing on Green Cactus Pear (*Opuntia ficus Indica*) Juice: Physical, Microbiological and Antioxidant Properties. *J Food Process Technol.* 2013;4:9.
118. Cassano A, Conidi C, Timpone R, D'Avella M, Drioli E. A membrane-based process for the clarification and the concentration of the cactus pear juice. *J Food Eng.* 2007;80(3):914-21.
119. Santhirasegaram V, Razali Z, George DS, Somasundram C. Comparison of UV-C treatment and thermal pasteurization on quality of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Food Bioprod Process.* 2015; 94:313-21.
120. Adekunle AO, Tiwari BK, Cullen PJ, Scannell AGM, O'Donnell CP. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chem.* 2010;122(3):500-7.
121. Tiwari BK, O' Donnell CP, Muthukumarappan K, Cullen PJ. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT - Food Sci Technol.* 2009;42(3):700-4.
122. Adekunle AO, Tiwari BK, Cullen PJ, Scannell AGM, O'Donnell CP. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chem.* 2010;122(3):500-7.
123. Petrier C, Combet E, Mason T. Oxygen-induced concurrent ultrasonic degradation of volatile and non-volatile aromatic compounds. *Ultrason Sonochem.* 2007;14(2):117-21.
124. Cheng LH, Soh CY, Liew SC, Teh FF. Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chem.* 2007;104(4):1396-401.
125. Escarpa A, González MC. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal Chim Acta.* 2001;427(1):119-27.

126. Lou S-N, Lin Y-S, Hsu Y-S, Chiu EM, Ho C-T. Soluble and insoluble phenolic compounds and antioxidant activity of immature calamondin affected by solvents and heat treatment. *Food Chem.* 2014;161(0):246-53.
127. Palma M, Piñeiro Z, Barroso CG. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *J Chromatogr Sci.* 2001;921(2):169-74.
128. Jiménez-Aguilar DM, López-Martínez JM, Hernández-Brenes C, Gutiérrez-Urbe JA, Welte-Chanes J. Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear. *J Food Compost Anal.* 2015: 66-73.
129. Badui-Dergal S. Pigmentos. En: *Química de los Alimentos.* Mexico: Pearson Educación; 2006. 715 p.
130. Villamiel M, van Hamersveld EH, de Jong P. Review: Effect of ultrasound processing on the quality of dairy products. *Milchwissenschaft.* 1999;54(2):69-73.
131. Sumaya-Martínez MT, Cruz-Jaime S, Madrigal-Santillán E, Garcia-Paredes JD, Cariño-Cortes R, Cruz-Cansino N. Betalain, acid ascorbic, phenolics contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. *Int J Mol Sci.* 2011;12(10):6452-68.
132. Murillo E, Britton GB, Durant AA. Antioxidant activity and polyphenol content in cultivated and wild edible fruits grown in Panama. *J Pharm Bioall Sci.* 2012;4(4):313-7.
133. Almeida MMB, de Sousa PHM, Arriaga ÂMC, do Prado GM, Magalhães CEdC, Maia GA. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int.* 2011;44(7):2155-9.
134. Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem.* 2007;101(3):1012-8.
135. Ismail A, Marjan ZM, Foong CW. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.* 2004;87(4):581-6.
136. Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem.* 2000;68(4):471-4.
- 137.

137. Sanchez-Moreno C, Cano MP, de Ancos B, Plaza L, Olmedilla B, Granado F. Pulsed electric fields-processed orange juice consumption increases plasma vitamin C and decreases F2-isoprostanes in healthy humans. *J Nutr Biochem.* 2004;15(10):601-7.
138. de Lima ACS, Soares DJ, da Silva LMR, de Figueiredo RW, de Sousa PHM, de Abreu Menezes E. In vitro bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chem.* 2014;161(0):142-7.
139. Perez-Vicente A, Gil-Izquierdo A, Garcia-Viguera C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J Agric Food Chem.* 2002;50(8):2308-12.
140. Anese M, Mirolo G, Beraldo P, Lippe G. Effect of ultrasound treatments of tomato pulp on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. *Food Chem.* 2013;136:458-63.
141. Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem.* 2011;128(1):14-21.
142. Tagliazucchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* 2010;120(2):599-606.
143. Cilla A, Perales S, Lagarda MJ, Barberá R, Clemente G, Farré R. Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages. *J Food Compost Anal.* 2011;24(1):87-94.
144. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-33.
145. Liang L, Wu X, Zhao T, Zhao J, Li F, Zou Y. In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Res Int.* 2012;46(1):76-82.
146. Frank T, Stintzing FC, Carle R, Bitsch I, Quaas D, Straß G. Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharm Res.* 2005;52(4):290-7.

147. Tesoriere L, Allegra M, Butera D, Livrea MA. Absorption, excretion, and distribution of dietary antioxidant betalains in LDLs: potential health effects of betalains in humans. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(4):941-5.
148. Tesoriere L, Fazzari M, Angileri F, Gentile C, Livrea MA. In vitro digestion of betalainic foods. Stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta. *J Agric Food Chem.* 2008;56(22):10487-92.
149. Herbach KM, F.C. S, Carle R. Betalain stability and degradation. Structural and chromatic aspects. *J Food Sci.* 2006;71:R41-R50.
150. Aderogba MA, Kgatle DT, McGaw LJ, Eloff JN. Isolation of antioxidant constituents from *Combretum apiculatum* subsp. *apiculatum*. *S Afr J Bot.* 2012;79(0):125-31.
151. Murray, R.K. Agua y pH. En: *Bioquímica Harper. Bioquímica Ilustrada. 28ª*, editor: McGraw-Hill; 2010.19-22.
152. Marta K Jamroz K, Katarzyna Zawada, Katerina Makarova, Sławomir Kazmierskia, Iwona Wawera. ¹H and ¹³C NMR-based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoneys and honeys. *J Sci Food Agric.* 2013;9:4246-255.
153. Paulsen BS, Lund PS. Water-soluble polysaccharides of *Opuntia ficus-indica* cv “Burbank's Spineless”. *Phytochemistry.* 1979;18(4):569-71.
154. Ishurd O, Zgheel F, Elghazoun M, Elmabruk M, Kermagi A, Kennedy JF. A novel (1→4)- α -D-glucan isolated from the fruits of *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. *Carbohydrate polymers.* 2010;82(3):848-53.
155. Subhadhirasakul S, Pechpongs P. A terpenoid and two steroids from the flowers of *Mammea siamensis*. *J Sci Technol.* 2005;27:555-61.
156. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. *Mayo Clinic Proceedings.* 78(8):965-78.
157. Baskar AA, Al Numair KS, Paulraj GM, Alsaif MA, Muamar MA, Ignacimuthu S. Beta-sitosterol prevents lipid peroxidation and improves antioxidant status and histoarchitecture in rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer. *J Med Food.* 2012(15):335–43.
158. Grattan BJ. Plant Sterols as Anticancer Nutrients: Evidence for Their Role in Breast Cancer. *Nutrients.* 2013(5):359-87.