

# EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE PITAYA ROJA (*Stenocereus stellatus*) APLICANDO PRETRATAMIENTOS CON MICROONDAS, ULTRASONIDO Y ENZIMÁTICOS

## EXTRACTION OF RED PITAYA (*Stenocereus stellatus*) BIOACTIVE COMPOUNDS APPLYING MICROWAVE, ULTRASOUND AND ENZYMATIC PRETREATMENTS

María G. Pérez-Loredo, Lourdes Hernández-De Jesús, Blanca E. Barragán-Huerta\*

Departamento de Ingeniería en Sistemas Ambientales, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Avenida Wilfrido Massieu, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, D.F. 07738, México. (bbarraga59@hotmail.com) (bbarraganh@ipn.mx)

### RESUMEN

La demanda de aditivos naturales en alimentos ha aumentado en años recientes. La pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) se puede usar como fuente de betalaínas y compuestos fenólicos, pero no existen informes sobre la extracción de estos compuestos usando estos frutos. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los pretratamientos por microondas, ultrasonido y enzimáticos en el aumento de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalaínas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y la capacidad antioxidante (CA) en los extractos de pulpa con y sin semillas del fruto de *S. stellatus*. El diseño experimental fue completamente al azar y los resultados se analizaron mediante un ANDEVA y un análisis de componentes principales (ACP). La mayor concentración de compuestos bioactivos se obtuvo utilizando la pulpa sin semillas y, para esta muestra, el pretratamiento con ultrasonido por 15 min aumentó ( $p \leq 0.05$ ) la cantidad de Bc, Bx y BT 13.5, 12.7 y 13.1 % respecto al testigo. La aplicación de pectinasa al 0.5 % aumentó ( $p \leq 0.05$ ) los valores de CFT en un 109.7 % y CA en 102.6 %. El pretratamiento con ultrasonido maximizó el contenido de pigmentos (480.3 mg BT 100 g<sup>-1</sup> de pulpa seca) y con 0.5 % pectinasa, 2 h, 40 °C, pH 4.0 se maximizó el contenido de CFT (804.5 mg equivalentes de ácido gálico 100 g<sup>-1</sup> de pulpa seca) y la CA (4925.7 mg equivalentes de Trolox g<sup>-1</sup> de pulpa seca). De acuerdo con el ACP existe una relación directa entre el contenido de CFT y la CA de la pitaya roja *S. stellatus*. Por lo tanto, se concluye que el uso combinado de los tratamientos de ultrasonido y pectinasa maximiza la extracción de compuestos bioactivos de la pitaya.

### ABSTRACT

In recent years, the demand for natural food additives has increased. Although they can be used as a source of betalains and phenolic compounds, there is no information about the extraction of these compounds from red pitayas (*Stenocereus stellatus*). Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of microwave, ultrasound, and enzymatic pretreatments in the increase of betacyanins (Bc), betaxanthins (Bx), total betalains (TB), total phenolic compounds (TPC), and antioxidant capacity (AC) in the extracts of *S. stellatus* fruit pulp (with and without seeds). The experimental design was completely randomized and the results were analyzed using ANOVA and Principal Components Analysis (PCA). The highest concentration of bioactive compounds was obtained using seedless pulp. In this sample, 15 min ultrasound pretreatment increased ( $p \leq 0.05$ ) the amount of Bc, Bx, and TB by 13.5, 12.7, and 13.1 %, respectively, in relation to control. The application of 0.5 % pectinase increased ( $p \leq 0.05$ ) TPC and AC values by 109.7 %, and 102.6 %, respectively. The ultrasound pretreatment maximized the pigment content (480.3 mg TB 100 g<sup>-1</sup> dry pulp) and with 0.5 % pectinase, 2 h, 40 °C, pH 4.0, the TPC content was maximized (804.5 mg equivalents of Gallic acid 100 g<sup>-1</sup> dry pulp), as well as the AC (4925.7 mg equivalents of Trolox g<sup>-1</sup> dry pulp). According to the PCA, there is a direct relation between the red pitaya *S. stellatus* TPC and AC content. Therefore, we conclude that the combined use of ultrasound and pectinase treatments maximizes the extraction of bioactive compounds from the pitaya.

\*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2016. Aprobado: diciembre, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 135-151. 2017.

**Key words:** extraction, *Stenocereus stellatus*, betalain, ultrasound, microwaves, enzymatic.

**Palabras clave:** Extracción, *Stenocereus stellatus*, betalaínas, ultrasonido, microondas, enzimáticos.

## INTRODUCCIÓN

La pitaya (*Stenocereus stellatus*) se consume como producto fresco y no se encontraron estudios sobre la aplicación de este fruto en productos industrializados que permitan su explotación comercial. La obtención de extractos de pitaya con concentraciones altas de compuestos bioactivos puede ayudar a superar este inconveniente al permitir su aprovechamiento como fuente de pigmentos y antioxidantes para la industria de los alimentos.

Las investigaciones en frutos del género *Stenocereus*, o pitayas, son escasas. García-Cruz *et al.* (2012) y García-Cruz *et al.* (2013) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante, betalaínas y minerales en pitayas *S. griseus* y *S. pruinosus*, respectivamente. Pérez-Loredo *et al.* (2016) clasificaron como pobres, buenas y excelentes fuentes de betalaínas a los frutos de 30 cactáceas de diversos géneros, e indican que los frutos rojos de *S. stellatus* de Puebla, México, son una buena fuente de pigmentos. Para extraer betalaínas de frutos de *Opuntia* se usa el fruto sin semillas, aunque éstas contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante que la pulpa (Morales *et al.*, 2012). Esto sugiere que sería más conveniente usar el fruto completo para obtener la mayor cantidad posible de compuestos bioactivos.

Las semillas del fruto de la pitaya son pequeñas y frágiles, durante la maceración de la fruta se rompen fácilmente y le confieren un color oscuro a la pulpa macerada, lo cual puede afectar la extracción de los pigmentos. Las semillas representan 31 % en peso de la fracción comestible de la pitaya y si son separadas de la pulpa podrían eliminarse del extracto algunos componentes bioactivos de la fruta. Por lo tanto, es necesario determinar el efecto de la presencia de semillas en los rendimientos de extracción de pigmentos y otros compuestos de interés.

Los frutos de cactáceas son fuente de diversos fitoquímicos, en especial pigmentos, por lo cual hay varios estudios sobre frutos de cactáceas para establecer las mejores condiciones para su extracción y aplicación. Los frutos más estudiados como fuente de compuestos bioactivos son del género *Hylocereus*

## INTRODUCTION

The pitaya (*Stenocereus stellatus*) is consumed as a fresh product. No studies were found about its application in industrialized products that would enable its commercial exploitation. Obtaining pitaya extracts with high bioactive compounds concentrations may help to overcome this disadvantage by allowing its exploitation as a source of pigments and anti-oxidants for the food industry.

Research on *Stenocereus* genus fruits (pitayas) is limited. García-Cruz *et al.* (2012) and García-Cruz *et al.* (2013) evaluated the content of total phenolic compounds, antioxidant capacity, betalains, and minerals in *S. griseus* and *S. pruinosus* pitayas. Pérez-Loredo *et al.* (2016) classified the fruits of 30 cactaceous from different genera as poor, good, and excellent sources of betalains. According to this study, the *S. stellatus* red fruits from Puebla, Mexico, are a good source of pigments. Seedless *Opuntia* fruits are used to extract betalains, although seeds contain more total phenolic compounds and antioxidant capacity than the pulp (Morales *et al.*, 2012). This suggests that it would be more convenient to use the whole fruit to obtain the largest possible number of bioactive compounds.

Pitaya seeds are small and fragile; they break easily during the fruit maceration, and give a dark color to the macerated pulp, which can affect pigment extraction. Weight-wise, the seeds represent 31 % of the pitaya's edible fraction and, if they are separated from the pulp, some fruit bioactive compounds could be removed from the extract. Therefore, we need to determine the effect of the seeds' presence on the extraction performance of the pigments and other compounds of interest.

Cactaceae fruits are the source of various phytochemicals (particularly pigments); for that reason, there are several studies about Cactaceae fruits in order to establish the best extraction and application conditions. The most studied fruits as a bioactive compounds source belong to the *Hylocereus* (Naderi *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2011) and *Opuntia* genera (Prakash and Manikandan, 2012; Cejudo-Bastante *et al.*, 2015).

Conventional extraction methods (maceration, reflux, or Soxhlet extraction) require long extraction times, their performances are low, and their energy

(Naderi *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2011) y *Opuntia* (Prakash y Manikandan, 2012; Cejudo-Bastante *et al.*, 2015).

Los métodos de extracción convencionales (maceración, reflujo o extracción Soxhlet) requieren tiempos largos de extracción, los rendimientos son bajos y el consumo energético es alto, pero son populares porque son fáciles de operar y el costo es bajo (Yang *et al.*, 2011). Los métodos de extracción no convencionales son más amigables con el medio ambiente porque reducen el uso de químicos y el tiempo de extracción, además mejoran el rendimiento y la calidad del extracto. Los métodos de ultrasonido, pulsos eléctricos, digestión enzimática, extrusión, microondas y fluidos supercríticos se usan para mejorar el rendimiento y la selectividad de la extracción de compuestos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013).

El ultrasonido es un tipo especial de onda sonora, su frecuencia de 20-100 MHz está más allá de la audición humana, y al igual que otras ondas comprime y expande el material expuesto. Al aplicar ultrasonido se favorece la difusión a través de la pared celular y el lavado del contenido celular una vez que las células están rotas (Azmir *et al.*, 2013). El ultrasonido se ha estudiado para extraer pigmentos naturales de betabel y otras fuentes vegetales (Sivakumar *et al.*, 2009).

Las microondas son campos electromagnéticos en un rango de frecuencia de 300 Mhz a 300 GHz. Alupului *et al.* (2012) propusieron tres etapas secuenciales de la extracción asistida por microondas: 1) separación de los solutos de los sitios activos de la matriz debido al incremento de temperatura y presión, 2) difusión del disolvente a través de la matriz y, 3) liberación de solutos de la matriz al disolvente. La extracción con microondas se estudia para obtener polifenoles en cáscara de cítricos (Nayak *et al.*, 2015), como pretratamiento en la extracción de astaxantina de *Phaffia rhodozyma* (Villalobos-Castillejos *et al.*, 2013) y en la extracción de betalainas de betabel (Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

La adición de celulasa,  $\alpha$ -amilasa y pectinasa mejora la extracción de algunos compuestos bioactivos al romper las paredes celulares e hidrolizar estructuras de polisacáridos donde se encuentran enlazados (Puri *et al.*, 2012). Además de la composición, concentración y tipo de enzima, otros factores como el tamaño de partícula de los materiales vegetales, la

consumption is high, but they are popular because they are easy to operate and they are economical (Yang *et al.*, 2011). Non-conventional extraction methods are more environmentally-friendly, because they reduce the use of chemicals and the extraction time, and they also improve the extract's performance and quality. Methods such as ultrasound, electrical pulses, enzymatic digestion, extrusion, microwaves, and supercritical fluids are used to improve the performance and selectivity of bioactive compounds extraction (Azmir *et al.*, 2013).

Ultrasound is a special kind of sound wave: its 20-100 MHz frequency is beyond human hearing, and —like other waves— it compresses and expands the exposed material. When ultrasound is used, the breaking down of the cells contributes to the diffusion through the cell wall and the cell content washing (Azmir *et al.*, 2013). Other studies have considered the use of ultrasound to extract natural pigments from beetroot and other vegetal sources (Sivakumar *et al.*, 2009).

Microwaves are electromagnetic fields with a frequency range of 300 MHz to 300 GHz. Alupului *et al.* (2012) proposed three sequential stages for microwave assisted extraction: 1) solutes separation from the matrix' active sites, due to temperature and pressure increase; 2) solvent diffusion through the matrix and, 3) solutes release, from the matrix to the solvent. Microwave extraction has been studied to obtain polyphenols in citrus peels (Nayak *et al.*, 2015), as pretreatment in the extracion of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* (Villalobos-Castillejos *et al.*, 2013), and the extraction of betalains from beetroot (Cardoso-Ugarte *et al.*, 2014).

The addition of cellulase,  $\alpha$ -amylase, and pectinase improves the extraction of some bioactive compounds, because it breaks down cell walls and hydrolyzes the polysaccharide structures that connect them (Puri *et al.*, 2012). Besides the enzyme composition, concentration, and kind, other factors —such as the particle size of the plant materials, the solid-water ratio, and the hydrolysis time— also affect the extraction process (Azmir *et al.*, 2013). The enzymatic hydrolysis has been studied in order to extract phenolic compounds from grape residues (Gómez-García *et al.*, 2012), raspberry solid residues (Laroze *et al.*, 2010) and betalains in fruits of the *Hylocereus* genus (Naderi *et al.*, 2010).

relación sólido-agua y el tiempo de hidrólisis afectan el proceso de extracción (Azmir *et al.*, 2013). La hidrólisis enzimática se ha estudiado para extraer compuestos fenólicos desde desperdicios de uva (Gómez-García *et al.*, 2012), residuos sólidos de frambuesa (Laroze *et al.*, 2010) y betalainas en frutos del género *Hylocereus* (Naderi *et al.*, 2010).

La demanda de compuestos naturales ha aumentado por sus propiedades benéficas en la salud, pero los procesos de extracción con temperaturas altas o con ciertos disolventes pueden ser inadecuados. La extracción de esos compuestos debe realizarse en condiciones que no alteren sus propiedades bioactivas, y un método de extracción ideal debe ser rápido, cuantitativo y no destructivo (Yang *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue aplicar los pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimas (proteasa, celulasa, pectinasa) para aumentar el rendimiento de extracción de los compuestos bioactivos de la pitaya roja (*S. stellatus*) y determinar el efecto de la presencia de semillas sobre la extracción de betacianinas, betaxantinas, betalainas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Ácido gálico, ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazolina 6-ácido sulfónico)] y Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México). Para los tratamientos enzimáticos se usaron preparaciones comerciales de proteasa, celulasa y pectinasa de grado alimentario adquiridas en ENMEX (México).

### Material vegetal

Los frutos de pitaya roja se recolectaron durante la temporada de cosecha de agosto a septiembre del 2013 en Santiago Tonahuixtla, Puebla (18° 12' 5.35" N, 97° 53' 50.75" O). Las características físicas de los frutos fueron: peso de 45.1 a 103.1 g, longitud de 4.6 a 5.6 cm y diámetro de 3.9 a 5.8 cm. Los frutos seleccionados eran sanos, sin daños o manchas. Para almacenar los frutos se retiraron las espinas y se empacaron en bolsas de polietileno al vacío y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

The demand for natural compounds has increased due to their beneficial health properties, but extraction processes with high temperatures or with certain solvents may be inadequate. The extraction of these compounds must be carried out under conditions that do not affect their bioactive properties. An ideal extraction method should be quick, quantitative, and non-destructive (Yang *et al.*, 2011).

Therefore, the objective of this study was to apply microwaves, ultrasound, and enzymes (protease, cellulase, pectinase) pretreatments, in order to increase the extraction performance of the red pitaya (*S. stellatus*)'s bioactive compounds and to determine the effect of the seeds' presence in the extraction of betacyanins, betaxanthins, total betalains, and total phenolic compounds, as well as their antioxidant capacity.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

All reagents used were analytical grade reagents. Gallic Acid, ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)], and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were obtained from Sigma-Aldrich (Mexico). For the enzymatic treatments, food-grade commercial protease, cellulose, and pectinase preparations purchased in ENMEX (Mexico) were used.

### Vegetal material

The red pitaya fruits were harvested during the harvest season (from August to September 2013), in Santiago Tonahuixtla, Puebla (18° 12' 5.35" N, 97° 53' 50.75" W). The fruits had the following physical characteristics: weight (45.1-103.1 g), length (4.6-5.6 cm), and diameter (3.9-5.8 cm). The selected fruits were healthy, without damage or spots. In order to store the pitayas, their spines were removed, the fruits were vacuum-packed in polyethylene bags, and stored at -20 °C until they were analyzed.

### Preparation of samples

Before they were analyzed, samples were removed from the freezer and placed 24 h in cooling conditions (4-10 °C). The studies were carried out in pulp with and without seeds. For that purpose, the peel was separated from the fruits and the pulp was

### Preparación de las muestras

Las muestras se retiraron del congelador y se colocaron 24 h en refrigeración (4-10 °C) antes de su análisis. Los estudios se realizaron en pulpa con o sin semillas, para lo cual se separó la piel de los frutos y la pulpa se separó en dos porciones. Una de ellas se tamizó con una malla del # 25 (710  $\mu\text{m}$ ) para eliminar las semillas y después se homogeneizó con un procesador de alimentos para obtener la muestra de pulpa sin semillas. La otra parte se homogeneizó completa y se tamizó para obtener la pulpa con semillas.

### Contenido de agua

El contenido de agua se determinó en la pulpa con y sin semillas, con la pérdida de peso de las muestras después de secar en horno a 110 °C (método AOAC 942.05) (AOAC, 1990).

### Determinación de pH

El pH se midió en una solución acuosa de pulpa macerada con y sin semillas al 10 % p v<sup>-1</sup> usando un potenciómetro (Denver Instrument UB-10 Colorado, EE.UU.; método AOAC 981.12).

### Pretratamientos de la muestra

Los tres tipos de pretratamientos evaluados fueron: microondas, ultrasonido e hidrólisis enzimática. Porciones de 6.2 g de muestra se colocaron en tubos de ensayo de 20 mL con tapa de rosca y se sometieron a los diversos pretratamientos. En todos los casos se analizó una muestra sin pretratamiento o muestra control (C), usada para evaluar el efecto del pretratamiento.

#### Microondas

La muestra se colocó en el centro de un horno de microondas de uso doméstico (Acros AM1007Q, China, 1050 W) y se aplicó el pretratamiento a 105 W (10 % de la potencia máxima) por 62 min (M1, M2). Después del tratamiento la temperatura fue  $36 \pm 1$  °C para M1 y  $45 \pm 1$  °C para M2.

#### Ultrasonido

Las muestras se mantuvieron dentro de un baño de ultrasonido con control de temperatura (Bransonic CPX5800H, EE.UU., 40 KHz) a 20 °C durante 5 (U1), 10 (U2), 15 (U3), 20 (U4), 25 (U5), 30 (U6) y 35 (U7) min.

divided in two portions. One of them was sieved with a #25 mesh (710  $\mu\text{m}$ ) to remove the seeds and then homogenized with a food processor, in order to obtain the seedless pulp sample. The other part was homogenized as a whole and sieved to obtain the pulp with seeds.

### Water content

The water content—in pulp with and without seeds—was determined by weight loss after samples had been oven-dried at 110 °C (AOAC method 942.05) (AOAC, 1990).

### Determination of pH

The pH was measured using a potentiometer in a 10 % p v<sup>-1</sup> aqueous solution of macerated pulp with and without seeds (Denver Instrument UB-10 Colorado, USA; AOAC official method 981.12).

### Pretreatment of the sample

The three kinds of pretreatments evaluated were: microwave, ultrasound, and enzymatic hydrolysis. Sample portions of 6.2 g were placed in 20 mL test tubes with screw caps and underwent various pretreatments. In all cases, a sample was analyzed without pretreatment or control sample (C), in order to evaluate the pretreatment effect.

#### Microwaves

The sample was placed in the center of a domestic microwave oven (Acros AM1007Q, China, 1050 W) and the pretreatment was applied at 105 W (10 % of the maximum power) during 62 min (M1, M2). After the treatment, the temperature was  $36 \pm 1$  °C for M1 and  $45 \pm 1$  °C for M2.

#### Ultrasound

The samples were kept in an ultrasonic bath (Bransonic CPX5800H, USA 40 KHz), with temperature control at 20 °C, for 5 (U1), 10 (U2), 15 (U3), 20 (U4), 25 (U5), 30 (U6) and 35 (U7) minutes.

#### Enzymatic hydrolysis

Prior to the pretreatment, the pH of the samples was measured and the result was  $4.0 \pm 0.5$  (within the range recommended by the enzymes supplier). Samples of pulp (with and without seeds) were mixed separately with a 0.5 % p v<sup>-1</sup> rate

### Hidrólisis enzimática

Previo al pretratamiento, se midió el pH de las muestras y fue  $4.0 \pm 0.5$ , el cual está dentro del intervalo recomendado por el proveedor de las enzimas. Las muestras de pulpa con y sin semillas se mezclaron por separado con las preparaciones enzimáticas de proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL) y las tres enzimas juntas (PPC) en una proporción de 0.5% p p<sup>-1</sup>. Las mezclas se incubaron en un baño de calentamiento con agitación (Aquatherm G-86, New Brunswick Scientific, EE. UU.) por 2 h y 24 h a 150 rpm y  $40 \pm 1$  °C. Al terminar la incubación, la reacción enzimática se detuvo calentando la mezcla de reacción en un baño maría a 95 °C por 5 min y luego enfriamiento con baño de hielo a  $2 \pm 2$  °C por 10 min (Naderi *et al.*, 2010).

Después de la aplicación de los pretratamientos, las muestras se extrajeron según el procedimiento descrito en la sección "Preparación de los extractos" y se midieron betacianinas, betaxantinas, betalainas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

#### Preparación de los extractos

Muestras de 6.2 g de pulpa con o sin semillas, con o sin pretratamiento se colocaron por separado en un tubo de 50 mL con tapa de rosca y se adicionaron 10 mL de agua destilada. Las mezclas se agitaron en vortex (GEMMY VM-300 Taipei, Taiwan) por 1 min a velocidad máxima (3200 rpm) y después se centrifugaron a 10576 xg por 20 min (Dynamica Velocity 14R, Londres, Reino Unido). El sobrenadante se separó y los sólidos remanentes se usaron para una segunda extracción bajo las mismas condiciones, adicionando 5 mL de agua. Los extractos obtenidos de la primera y segunda extracción se colocaron en un matraz volumétrico de 25 mL, se aforó el volumen con agua y la solución se usó para determinar betacianinas, betaxantinas, betalainas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante.

#### Cuantificación de los pigmentos

El contenido de betaxantinas (Bx) y betacianinas (Bc) se cuantificó midiendo la absorbancia a 483 y 538 nm, respectivamente (Castellanos-Santiago y Yahia, 2008) con un espectrofotómetro UV-Vis (HACH DR5000, México). Las concentraciones de cada pigmento se calcularon con la Ecuación 1. Las betalainas totales se calcularon sumando Bc y Bx.

$$B = \frac{(A \times FD \times PM \times V)}{(\epsilon \times P \times L)} \quad (1)$$

enzymatic preparation of protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), and the three enzymes together (PPC). The mixtures were incubated in a stirring heating bath (Aquatherm G-86, New Brunswick Scientific, USA) for 2 h and 24 h, at 150 rpm, and  $40 \pm 1$  °C. At the end of the incubation, the enzymatic reaction was stopped, heating the reaction mixture in a water bath at 95 °C for 5 min and then cooled with an ice-water bath at 2 °C for 10 min (Naderi *et al.*, 2010).

After the pretreatments were applied, the samples were extracted according to the procedure described in the "Preparation of the extracts" section below and the betacyanins, betaxanthins, total betalains, total phenolic compounds, and antioxidant capacity were measured.

#### Preparation of the extracts

Pulp samples of 6.2 g —with or without seeds, with or without pretreatment— were placed separately in a 50 mL tube with screw cap and 10 mL of distilled water were added. The mixtures were vortexed (GEMMY VM-300 Taipei, Taiwan) for 1 min at full speed (3200 rpm) and then centrifuged at 10576 xg for 20 min (Dynamica Velocity 14R, London, UK). The supernatant was removed and the remaining solids were used for a second extraction under the same conditions, adding 5 mL of water. The extracts obtained from the first and second extractions were placed in a 25 mL volumetric flask; the volume was adjusted with water and the solution was used to determine betacyanins, betaxanthins, total betalains, total phenolic compounds, and antioxidant capacity.

#### Quantification of pigments

The betaxanthins (Bx) and betacyanins (Bc) content was quantified by measuring absorbance at 483 and 538 nm, respectively (Castellanos-Santiago and Yahia, 2008), with a UV-Vis spectrophotometer (HACH DR5000, Mexico). Each pigment's concentration was calculated using Equation 1. Total betalains were calculated by adding Bc and Bx.

$$B = \frac{(A \times DF \times MW \times V)}{(\epsilon \times P \times L)} \quad (1)$$

where *B*: Bx or Bc were expressed in terms of indicaxanthin or betanin mg, respectively, per 100 g of sample in dry weight (dw); *A*: absorbance at 483 nm for Bx and at 538 nm for Bc; *DF*: dilution factor; *MW*: molecular weight (indicaxanthin 308 g mol<sup>-1</sup> and betanin 550 g mol<sup>-1</sup>); *V*: Extract volume (mL); *ε*: molar attenuation coefficient (indicaxanthin=48 000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and betanin=60 000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>); *P*: quantity of sample (g); *L*: cell length (1 cm).

donde  $B$ :  $B_x$  o  $B_c$  se expresaron en términos de mg de indicaxantina o betanina, respectivamente, por 100 g de muestra en peso seco (ps);  $A$ : absorbancia a 483 nm para  $B_x$  y a 538 nm para  $B_c$ ;  $FD$ : factor de dilución;  $PM$ : peso molecular (indicaxantina 308 g mol<sup>-1</sup> y betanina 550 g mol<sup>-1</sup>);  $V$ : volumen del extracto (mL);  $\epsilon$ : coeficiente de extinción molar (indicaxantina=48 000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y betanina=60 000 L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $P$ : cantidad de muestra (g);  $L$ : la longitud de la celda (1 cm).

#### Cuantificación de los compuestos fenólicos totales

Para esta cuantificación 400  $\mu$ L del extracto se mezclaron con 3 mL de agua destilada, 200  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 400  $\mu$ L de solución de carbonato de sodio al 20 % (Singleton *et al.*, 1999). La mezcla se agitó en vortex por 30 s, se mantuvo en la oscuridad por 30 min a  $20 \pm 2$  °C y se midió la absorbancia a 765 nm. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva estándar de ácido gálico. Los valores de compuestos fenólicos totales se presentan como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) 100 g<sup>-1</sup> de muestra ps.

#### Determinación de la capacidad antioxidante mediante el ensayo del ABTS

El radical ABTS<sup>•+</sup> se preparó mezclando la solución de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2.45 mM) (Re *et al.*, 1999), la mezcla con el radical se mantuvo en oscuridad por 16 h antes de usarlo. Un mililitro del radical ABTS<sup>•+</sup> se diluyó con 100 mL de regulador fosfato de sodio (PBS) 0.01 M pH 7.4, hasta obtener una absorbancia aproximada de  $0.7 \pm 0.02$  a 734 nm. Del extracto se tomó una alícuota de 200  $\mu$ L y se adicionó 3.8 mL de la solución del radical ABST, la mezcla se agitó en vortex por 10 s, se mantuvo en oscuridad por 7 min a  $20 \pm 2$  °C y se midió su absorbancia a 734 nm ( $A_f$ ). Para cada muestra se realizó un blanco con 200  $\mu$ L de metanol ( $A_0$ ). El porcentaje de inhibición se calculó y se interpoló en la curva de calibración de 30-300 mg mL<sup>-1</sup> Trolox. Los resultados se expresan como mg equivalentes de Trolox (ET) 100 g<sup>-1</sup> de muestra ps.

#### Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados

El diseño experimental fue completamente al azar para los pretratamientos y se evaluaron dos factores: 1) tipo de muestra (pulpa con o sin semillas) y 2) tipo de pretratamiento; la unidad experimental fue el extracto de 25 mL obtenido bajo cada condición experimental y todos los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se reportan como el promedio  $\pm$  desviación estándar (DE), se realizó un ANDEVA y las medias

#### Quantification of total phenolic compounds

For this quantification, 400  $\mu$ L of the extract were mixed with 3 mL of distilled water, 200  $\mu$ L of the Folin-Ciocalteu reagent, and 400  $\mu$ L of 20 % sodium carbonate solution (Singleton *et al.*, 1999). The mixture was vortexed for 30 s, kept in the dark for 30 min at  $20 \pm 2$  °C, and the absorbance measured at 765 nm. Absorbance values were interpolated in a gallic acid standard curve. The values of total phenolic compounds are shown as mg of gallic acid equivalent (GAE) 100 g<sup>-1</sup> of dw simple.

#### Determination of antioxidant capacity by the ABTS test

The ABTS<sup>•+</sup> radical was prepared mixing the ABTS solution (7 mM) with potassium persulfate (2.45 mM) (Re *et al.*, 1999); the radical mixture was kept in the dark for 16 h before being used. One milliliter of the ABTS<sup>•+</sup> radical was diluted with 100 mL of 0.01 M, pH 7.4 phosphate buffer saline (PBS), until an approximate absorbance of  $0.7 \pm 0.02$  at 734 nm was obtained. A 200  $\mu$ L aliquot was taken from the extract, and 3.8 mL of the ABTS radical solution was added; afterwards, the mixture was vortexed for 10 s, kept in the dark for 7 min at  $20 \pm 2$  °C, and its absorbance was measured at 734 nm ( $A_f$ ). For each sample, a 200  $\mu$ L of methanol ( $A_0$ ) blank was prepared. The percentage inhibition was calculated and interpolated in a 30-300 mg mL<sup>-1</sup> Trolox calibration curve. The results are expressed as mg equivalents of Trolox (ET) 100 g<sup>-1</sup> of dw sample.

#### Experimental design and statistical analysis of the results

The experimental design of pretreatments was completely randomized. Two factors were evaluated: 1) kind of sample (pulp with or without seeds) and 2) kind of pretreatment. The experimental unit was the 25 mL extract obtained under each experimental condition and all analysis were performed in triplicate. Results were reported as the average  $\pm$  standard deviation (SD), an ANOVA was performed, and the means were compared using Fisher's method ( $p \leq 0.05$ ). To compare the effect of the kind of sample and pretreatment, a two-way analysis was performed, as well as a principal component analysis (PCA), in order to analyze the correlation between the variables evaluated and pretreatments. Data processing was carried out with the Minitab 16 (Minitab Inc., Pennsylvania, USA) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, California, USA) softwares.

se compararon con el método de Fisher ( $p \leq 0.05$ ). Para comparar el efecto del tipo de muestra y de pretratamientos se realizó un análisis de dos vías, así como un análisis de componentes principales (ACP) para analizar la correlación entre las variables evaluadas y los pretratamientos. El procesamiento de datos se efectuó con el programa Minitab 16 (Minitab Inc., Pennsylvania EE. UU.) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, California EE. UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del pretratamiento en la extracción de los compuestos bioactivos en pulpa con y sin semillas de pitaya roja

#### Extracción de las betalaínas en pulpa con y sin semillas de pitaya roja

En todos los extractos obtenidos de pulpa con y sin semillas tratadas enzimáticamente, el contenido de betalaínas totales se redujo ( $p \leq 0.05$ ) respecto al testigo sin pretratamiento (Figura 1). Al comparar los valores de pigmentos extraídos en los testigos sin

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effect of the pretreatments in the extraction of bioactive compounds in red pitaya pulp (with and without seeds)

#### Betalains extraction in red pitaya pulp (with and without seeds)

In all the extracts obtained from pulp (with and without seeds that received an enzymatic treatment), the total betalain content was reduced ( $p \leq 0.05$ ) in relation to the control without pretreatment (Figure 1). When we compare the extracted pigments values from the controls without enzymatic treatment (CEA and CEB), as the incubation period increases from 2 h to 24 h, the total betalains decrease 28-42 % and 9-34 %, in pulp with and without seeds, respectively. This decrease may be the result of the samples heating during the incubation period with the different enzymes, which destroys thermosensitive pigments present in the pitaya pulp.

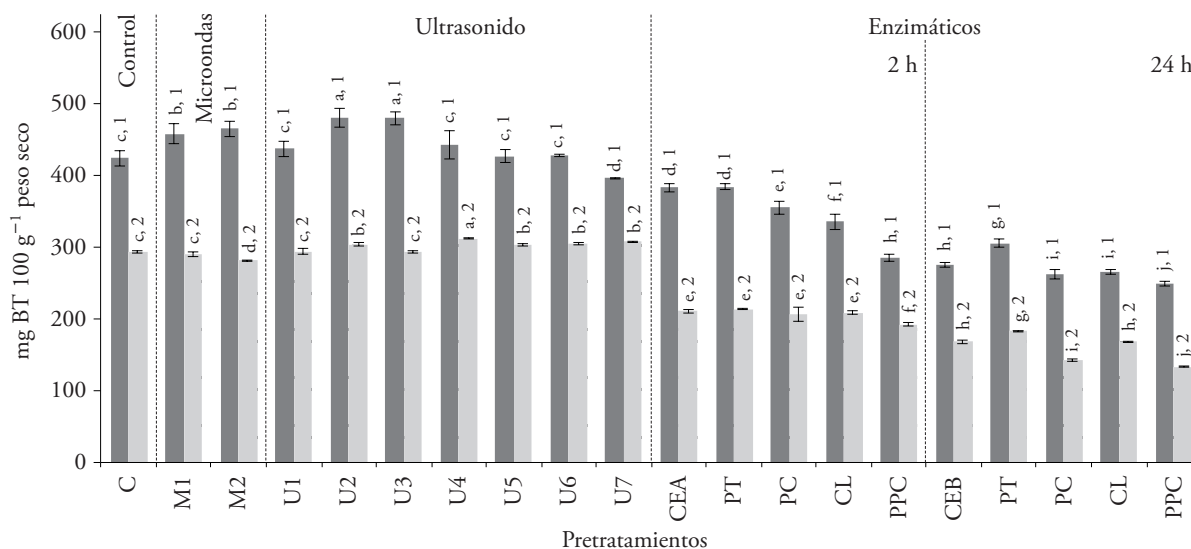


Figura 1. Contenido de betalaínas totales de los extractos de pulpa sin semillas (■) y pulpa con semillas (□) obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos: microondas (M), ultrasonido (U), proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC), comparados con los testigos sin tratamiento (C, CEA, CEB). Los números indican diferencia significativa entre las muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

Figure 1. Total betalain content of the seedless pulp (■) and pulp with seeds (□) extracts obtained after applying pre-treatments: microwaves (M), ultrasound (U), protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), and enzyme mixture (PPC). All compared with controls without treatment (C, CEA, CEB). Numbers indicate a significant difference between the samples; letters indicate a significant difference between pretreatments ( $p \leq 0.05$ ).



tratamiento enzimático (CEA y CEB), se observa que al aumentar el tiempo de incubación de 2 h a 24 h, la cantidad de betalaínas totales disminuyen del 9-34 % en pulpa sin semillas y del 28-42 % en pulpa con semillas. Esta disminución se puede deber al calentamiento de las muestras durante el periodo de incubación con las diferentes enzimas, lo cual destruye pigmentos termosensibles presentes en la pulpa de pitaya.

Herbach *et al.* (2007) observaron una pérdida de betalaínas totales de 24 % al realizar una hidrólisis parcial del mucilago de pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) con una preparación enzimática a 40 °C por 2 h. El valor 9.4-32.7 % obtenido en nuestro estudio para la extracción de esos pigmentos en *S. stellatus* es similar al reportado por esos autores.

Respecto al pretratamiento con ultrasonido, el contenido de betalaínas totales aumentó 13.1% en los extractos de pulpa sin semillas a los 15 min, pero tiempos mayores de exposición al ultrasonido no aumentaron la eficiencia de extracción (Figura 1). Este efecto se puede deber a la alteración de las paredes celulares que facilita el proceso de extracción de los pigmentos (Panchev *et al.*, 1988; Bagherian *et al.*, 2011). El efecto en la pulpa con semillas fue prácticamente despreciable en todos los tiempos de exposición (Figura 1). El aumento obtenido para la pulpa sin semillas, fue mayor al observado por Sivakumar *et al.* (2009), quienes muestran que el rendimiento de la extracción de pigmentos del betabel aumentó sólo 8 % al aplicar el mismo pretratamiento.

La presencia de las semillas de pitaya tuvo un efecto negativo en la extracción de pigmentos: el contenido de betalaínas totales disminuyó 22.3-46.7 % en la pulpa con semillas, respecto a la pulpa sin semillas.

### **Extracción de compuestos fenólicos totales en pulpa con y sin semillas de pitaya roja**

En contraste con los resultados para betalaínas, el contenido de compuestos fenólicos totales en los extractos de ambos tipos de pulpas aumentó ( $p \leq 0.05$ ) al aplicar los pretratamientos enzimáticos a las 2 h, en especial con la aplicación de PC. Al igual que en la extracción de betalaínas, tiempos de 24 h de incubación tienen un efecto negativo sobre la extracción de fenoles totales (Figura 2), debido

Herbach *et al.* (2007) observed a 24 % loss of total betalains, when they performed a partial hydrolysis of the pitaya mucilage (*Hylocereus polyrhizus*), with an enzymatic preparation at 40 °C for 2 h. The 9.4-32.7 % value for the extraction of these pigments in *S. stellatus* obtained in our study is similar to the value reported by those authors.

With regard to the ultrasound pretreatment, the total betalain content increased 13.1 % in the seedless pulp extracts after 15 min, but longer exposure to ultrasound did not increase the extraction efficiency (Figure 1). This effect may be due to cell walls alteration that facilitates the pigment extraction process (Panchev *et al.*, 1988; Bagherian *et al.*, 2011). The effect on the pulp with seeds was practically negligible in all exposure times (Figure 1). The increase obtained for seedless pulp was higher than the one observed by Sivakumar *et al.* (2009), who showed that the performance of the beet pigment extraction increased only by 8 % when the same pretreatment was applied.

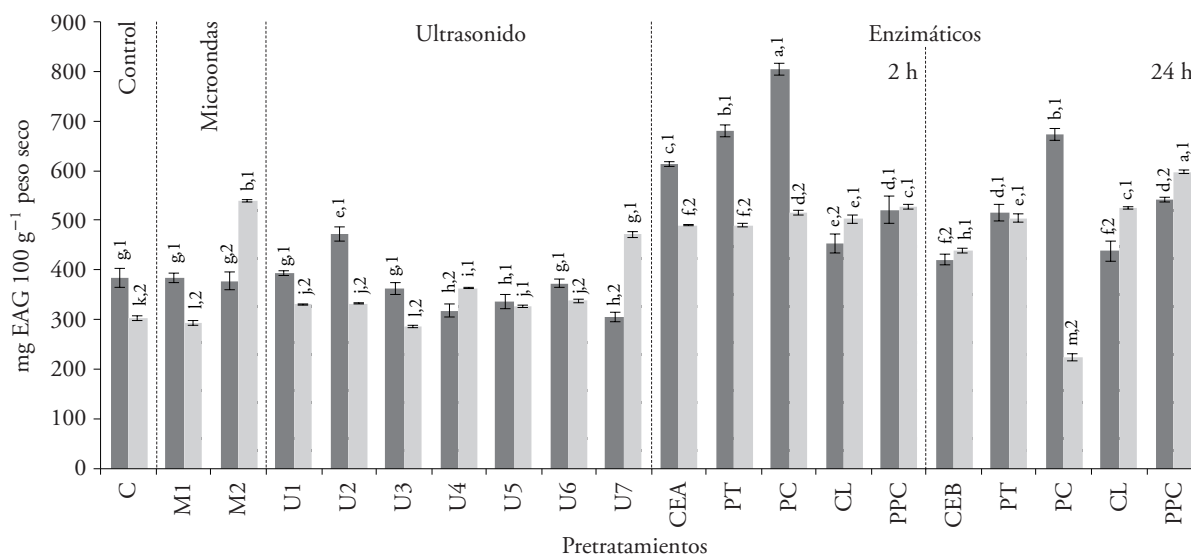
The presence of pitaya seeds had a negative effect on pigment extraction: the content of total betalain in the pulp with seeds decreased by 22.3-46.7 %, in relation to seedless pulp.

### **Extraction of total phenolic compounds in red pitaya pulp (with and without seeds)**

In contrast to the betalain results, the content of total phenolic compounds in both kinds of pulps extracts increased ( $p \leq 0.05$ ) when enzymatic pretreatments were applied after 2 h, especially with PC application. As with betalain extraction, 24 h incubation had a negative effect on the total phenols extraction (Figure 2), also due to the heating effect (CEA *vs* CEB pretreatment).

Hydrolytic enzymes application increases the extraction of total phenolic compounds. In our study, the content of these compounds increased 70.4 % and 109.8 %, in pulp extracts with and without seeds, respectively, when we applied the pectinase pretreatment for 2 h (Figure 2). Gómez-García *et al.* (2012) reported 25 % increases in phenolic compounds in grape residues and 28-35 % in raspberry residues (Laroze *et al.*, 2010); both figures are lower than the values in our study.

According to Puri *et al.* (2012), when enzymatic treatments are applied, the partial hydrolysis of the



**Figura 2.** Compuestos fenólicos totales de los extractos de pulpa sin semillas (■) y pulpa con semillas (□) obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos: microondas (M), ultrasonido (U), proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC), comparados con los testigos sin tratamiento (C, CEA, CEB). Los números indican diferencia significativa entre las muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 2.** Total phenolic compounds of the seedless pulp (■) and pulp with seeds (□) extracts obtained after applying pretreatments: microwaves (M), ultrasound (U), protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), and enzyme mixture (PPC). All compared with controls without treatment (C, CEA, CEB). Numbers indicate a significant difference between the samples; letters indicate a significant difference between pretreatments ( $p \leq 0.05$ ).

también a la acción del calentamiento (pretratamiento CEA *vs* CEB).

La aplicación de enzimas hidrolíticas aumenta la extracción de compuestos fenólicos totales y en nuestro estudio el contenido de estos compuestos aumentó 109.8 y 70.4 % en los extractos de pulpa sin semillas y con semillas, respectivamente, cuando se utilizó el pretratamiento con pectinasa por 2 h (Figura 2). Gómez-García *et al.* (2012) reportan incrementos de compuestos fenólicos de 25 % en residuos de uva y de 28-35 % en desechos de frambuesa (Laroze *et al.*, 2010), los cuales son valores inferiores a los de nuestro estudio.

Según Puri *et al.* (2012), al aplicar tratamientos enzimáticos, la hidrólisis parcial del mucílago permite extraer los compuestos ligados a la matriz polimérica lo cual facilita el procesamiento de muestras. El ácido galacturónico es un componente abundante del mucílago que puede ser liberado durante la hidrólisis enzimática y la exposición de los grupos funcionales (hidroxilo y carboxilo) puede aumentar el valor de fenoles totales (Combo *et al.*, 2011).

Respecto a los pretratamientos con microondas, se observaron diferencias significativas en la

mucílago enables the extraction of the compounds bound to the polymeric matrix, which facilitates samples processing. Galacturonic acid is an abundant mucilage compound that can be released during enzymatic hydrolysis; meanwhile, functional groups exposure (hydroxyl and carboxyl) may increase the total phenols value (Combo *et al.*, 2011).

With regard to microwave pretreatments, significant differences were observed between the pulp with and without seeds during the extraction of phenolic compounds. The application of microwave for 2 min (M2) resulted in a 78.1 % ( $p \leq 0.05$ ) increase in the extraction of phenolic compounds from pulp with seeds, which may be the result of tissue rupture and greater interaction between the solvent and the matrix (Bagherian *et al.*, 2011). However, this pretreatment had no effect in the seedless pulp (Figure 2).

In addition, exposure to ultrasonic waves did not result in significant increases ( $p \leq 0.05$ ) in the total phenolic compounds content, in most of the conditions tested for both samples.

The extraction of phenolic compounds from pitayas using microwaves as pretreatment is more

extracción de compuestos fenólicos entre la pulpa con y sin semillas. La aplicación de microondas por 2 min (M2) aumentó 78.1 % ( $p \leq 0.05$ ) la extracción de los compuestos fenólicos desde la pulpa con semillas, lo cual se puede deber a la ruptura de tejidos y mayor interacción entre el disolvente y la matriz (Bagherian *et al.*, 2011). Sin embargo, en la pulpa sin semillas este pretratamiento no tuvo efecto (Figura 2).

Además, la exposición a ondas ultrasónicas no causó incrementos significativos ( $p > 0.05$ ) en el contenido de compuestos fenólicos totales en la mayoría de las condiciones probadas para ambas muestras.

La extracción de compuestos fenólicos en pitayas usando microondas como pretratamiento es más eficiente que la obtenida por Nayak *et al.* (2015), quienes reportan un aumento de 20.5 % en cáscaras de cítricos, comparada con la extracción convencional por disolventes. Esto significa que el efecto de los pretratamientos sobre el rendimiento de compuestos fenólicos totales en los extractos depende del tipo de material vegetal sobre el cual se aplique. En la pitaya, la extracción de compuestos fenólicos es mayor con pectinasa, y mejor en la pulpa sin semillas.

### Valores de capacidad antioxidante en los extractos de pulpa con y sin semillas de pitaya roja

Los tratamientos enzimáticos en pulpa con y sin semillas aumentaron los valores de capacidad antioxidante en los extractos obtenidos de ambas muestras (Figura 3), y el efecto fue mayor por la acción de la pectinasa (PC) por 2 h. De manera similar a lo observado en la extracción de compuesto fenólicos, el aumento de la temperatura tiene un efecto positivo ya que aumentó la capacidad antioxidante de los extractos, pero solo a tiempos cortos de incubación.

La extracción de compuestos antioxidantes en la pitaya se mejora con los tratamientos de proteasa y pectinasa, pero se obtiene una mayor extracción al eliminar las semillas de la pulpa (Figura 3). El uso de pectinasa aumentó la capacidad antioxidante de los extractos de pulpa sin semillas hasta 74.8 % y 25.3 % en la pulpa con semillas. Estos valores son mayores a los obtenidos en los tratamientos por microondas o ultrasonido (Figura 3).

efficient than the one obtained by Nayak *et al.* (2015), who reported a 20.5 % increase in citrus peels, in comparison with conventional solvent extraction. This means that the effect of pretreatments over the performance of total phenolic compounds in extracts depends on which kind of vegetal material it is applied on. In pitaya, the extraction of phenolic compounds is greater with pectinase treatment, and better in seedless pulp.

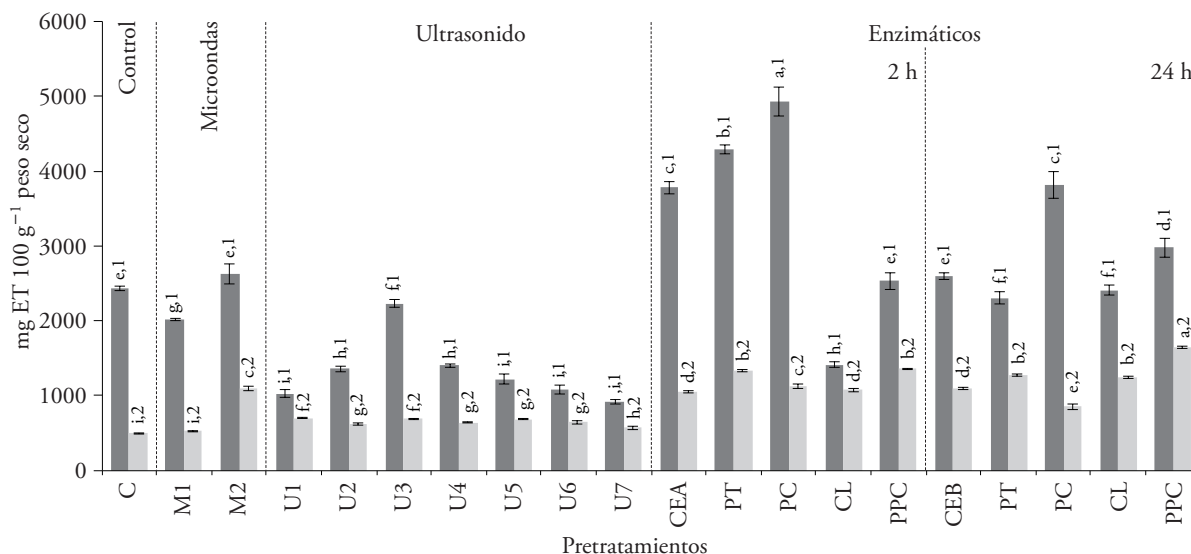
### Antioxidant capacity values in red pitaya pulp extracts (with and without seeds)

Enzymatic treatments in pulp (with and without seeds) increased the antioxidant capacity values in the extracts obtained from both samples (Figure 3), and the effect was greater due to the action of pectinase (PC) for 2 h. In a similar way to what was observed in phenolic compounds extraction, the increase in temperature had a positive effect, because it increased the extracts' antioxidant capacity, but only in short incubation times.

The antioxidant compounds extraction in pitaya improves with protease and pectinase treatments, but a higher extraction is obtained when the seeds are removed from the pulp (Figure 3). The use of pectinase increased the antioxidant capacity up to 74.8 % in seedless pulp extracts and 25.3 % in extracts of pulp with seeds. These values are higher than those obtained with microwave or ultrasound treatments (Figure 3).

The increase of the extracts's antioxidant capacity—after applying the pectinase treatment—can be caused by the pectin hydrolysis or the pitaya pulp mucilage, which can release fragments with greater antioxidant capacity than the polymers from which they originate (Chaouch *et al.*, 2015), or by the polymer networks break down, which releases antioxidant compounds, including phenolic compounds (Kunnika and Pranee, 2011).

In order to determine if the differences between the bioactive compounds concentrations in the extracts were caused by the presence of seeds in the pulp or a dilution effect, we had to calculate the corrected values of the pigments, antioxidant capacity, and total phenolic compounds per 100 g of pulp, considering the seeds proportion in the samples. Table 1 shows the results obtained for samples without pretreatment (control) and with ultrasound pretreatments for 15



**Figura 3.** Capacidad antioxidante de los extractos de pulpa sin semillas (■) y pulpa con semillas (□) obtenidos después de la aplicación de los pretratamientos: microondas (M), ultrasonido (U), proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), mezcla de enzimas (PPC), comparados con los testigos sin tratamiento (C, CEA, CEB). Los números indican diferencia significativa entre las muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3.** Antioxidant capacity of the seedless pulp (■) and pulp with seeds (□) extracts obtained after applying pretreatments: microwaves (M), ultrasound (U), protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL) and enzyme mixture (PPC). All compared with controls without treatment (C, CEA, CEB). Numbers indicate a significant difference between the samples; letters indicate a significant difference between pretreatments ( $p \leq 0.05$ ).

El aumento en la capacidad antioxidante en los extractos al aplicar el tratamiento con pectinasa puede ser causado por la hidrólisis de la pectina o el mucílago de la pulpa de la pitaya, lo cual puede liberar fragmentos con mayor capacidad antioxidante que los polímeros que les dieron origen (Chaouch *et al.*, 2015), o bien a la ruptura de las redes poliméricas que libera compuestos antioxidantes, incluso compuestos fenólicos (Kunnika and Pranee, 2011).

Para determinar si las diferencias en las concentraciones de componentes bioactivos en los extractos se debían a la presencia de las semillas en la pulpa o a un efecto de dilución, se calcularon los valores corregidos de pigmentos, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales por 100 g de pulpa, considerando la proporción de semillas en las muestras. Los resultados obtenidos para las muestras sin pretratamiento (testigo) y con los pretratamientos de ultrasonido por 15 min y pectinasa a 2 h, están en el Cuadro 1. Según los resultados habría un contenido mayor de pigmentos amarillos (Bx) que de pigmentos rojos (Bc) en las pulpas estudiadas, aunque según Pérez-Loredo *et al.* (2016) los parámetros cromáticos  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de los frutos *S. stellatus* confirman la coloración de la pulpa en las pitayas rojas. Esta discrepancia también

min and pectinase after 2 h. According to the results, there would be a higher content of yellow pigments (Bx) than red pigments (Bc) in the studied pulps, although, according to Pérez-Loredo *et al.* (2016), the  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  chromatic parameters of *S. stellatus* fruits confirm the pulp coloration in red pitayas. This discrepancy is also observed in betalains studies in red *Opuntia ficus-indica* prickly pears (Fernández-López *et al.*, 2010), and it may be due to the overestimation of Bx values, as a result of the overlap of the bands of the Bx and Bc absorption spectrum, or the use of mean extinction coefficients.

Our working group is carrying out a research about the number and kind of betalains present in pitayas of the *Stenocereus* genus using HPLC-DAD. Preliminary results indicate that there are four kinds of betaxanthins and five of betacyanins in the pulp extract (although the latter predominate). Despite a likely bias in the results, we can appreciate the level of betalains in cactaceae fruit extracts using spectrophotometric methods (Fernández-López *et al.*, 2002). In our study, the total betalain values allowed us to evaluate and compare the effect of different pretreatments in red pitaya pigment extraction.

**Cuadro 1. Valores de pigmentos (Bc, Bx, BT), fenoles (CFT) y capacidad antioxidante (CA) de los extractos acuosos de la pulpa sin semillas y con semillas obtenidos con los mejores pretratamientos.****Table 1. Pigments values (Bc, Bx, and TB), phenols (TPC), and antioxidant capacity (AC) from the aqueous extracts of pulp (with and without seeds) obtained with the best pretreatments.**

Tratamiento	Pulpa sin semillas		
	Ultrasonido 15 min	Pectinasa 2 h	Testigo
Bc (mg 100 g <sup>-1</sup> ps)	227.6 ± 3.7 <sup>1, A</sup>	194.9 ± 8.2 <sup>1, B</sup>	200.4 ± 2.2 <sup>1, B</sup>
Bx (mg 100 g <sup>-1</sup> ps)	251.7 ± 4.7 <sup>1, A</sup>	159.7 ± 3.9 <sup>1, C</sup>	223.2 ± 12.9 <sup>1, B</sup>
BT (mg 100 g <sup>-1</sup> ps)	479.3 ± 8.4 <sup>1, A</sup>	354.6 ± 8.5 <sup>1, C</sup>	423.6 ± 10.9 <sup>1, B</sup>
CFT (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> ps)	361.8 ± 11.5 <sup>2, E</sup>	804.5 ± 19.5 <sup>1, A</sup>	383.5 ± 18.4 <sup>2, E</sup>
CA (mg ET 100 g <sup>-1</sup> ps)	2230.1 ± 52.6 <sup>1, C</sup>	4925.7 ± 192.7 <sup>1, A</sup>	2430.3 ± 30.0 <sup>1, B</sup>
	Pulpa con semillas (corregidos)*		
Bc (mg 100 g <sup>-1</sup> ps)	187.3 ± 1.5 <sup>2, C</sup>	156.0 ± 5.9 <sup>2, D</sup>	188.2 ± 1.5 <sup>2, C</sup>
Bx (mg 100 g <sup>-1</sup> ps)	232.4 ± 1.1 <sup>2, B</sup>	137.7 ± 5.6 <sup>2, D</sup>	231.6 ± 1.9 <sup>1, B</sup>
BT (mg 100 g <sup>-1</sup> ps)	419.6 ± 2.4 <sup>2, B</sup>	293.8 ± 10.8 <sup>2, D</sup>	419.8 ± 2.6 <sup>1, B</sup>
CFT (mg EAG 100g <sup>-1</sup> ps)	409.9 ± 3.0 <sup>1, D</sup>	738.4 ± 11.6 <sup>2, B</sup>	433.4 ± 5.4 <sup>1, C</sup>
CA (mg ET g <sup>-1</sup> ps)	983.6 ± 15.0 <sup>2, E</sup>	1611.9 ± 37.5 <sup>2, D</sup>	715.8 ± 10.0 <sup>2, F</sup>

Media ± la desviación estándar (DE), n=3. El contenido de humedad de las muestras fue 88.6 % en pulpa sin semillas y 87.5 % en pulpa con semillas. Valores expresados por 100 g de pulpa en peso seco (ps). Los superíndices indican diferencias significativas para cada variable ( $p \leq 0.05$ ); los números indican diferencia significativa entre muestras; las letras indican diferencia significativa entre los pretratamientos. \*Los valores corregidos fueron calculados considerando un contenido de semillas en la pulpa del fruto de 30.2 %. ❖ Mean ± standard deviation (SD), n=3. The samples' moisture content was 88.6 % in seedless pulp and 87.5 % in pulp with seeds. Values expressed per 100 g dry weight (dw) of pulp. Superscripts indicate significant differences for each variable ( $p \leq 0.05$ ); numbers indicate significant differences between samples; letters indicate significant differences between pretreatments. \*The corrected values were calculated considering a 30.2 % seed content in the fruit pulp.

se observa en estudios sobre betalaínas en tunas rojas de *Opuntia ficus-indica* (Fernández-López *et al.*, 2010), y se puede deber a la sobreestimación de los valores de Bx por el traslape de las bandas del espectro de absorción de Bx y Bc, o el uso de coeficientes de extinción medios.

Una investigación sobre el número y tipo de betalaínas presentes en las pitayas del género *Stenocereus* usando HPLC-DAD se realiza en nuestro grupo de trabajo. Los resultados preliminares indican que en el extracto de la pulpa hay cuatro tipos de betaxantinas y cinco de betacianinas (las últimas predominan). A pesar de la probabilidad de un sesgo en los resultados, es posible apreciar el nivel de betalaínas en los extractos de frutos de cactáceas con métodos espectrofotométricos (Fernández-López *et al.*, 2002). En nuestro estudio, los valores de betalaínas totales permitieron evaluar y comparar el efecto de diversos pretratamientos en la extracción de pigmentos en la pitaya roja.

The comparison of the corrected data from Table 1 confirms that the presence of seeds has a negative impact in pigment extraction and antioxidant capacity. Only a slight increase in total phenolic compounds extraction is obtained (<13 %) that way; therefore, using seedless pulp is more advisable. In addition, we observed that the extract of pulp with seeds was darker, which may be the result of the oxidation or degradation of some extract compounds. The presence of seeds could favor non-enzymatic browning or ascorbic acid oxidation (Suh *et al.*, 2003), both of which promote betalain decline.

In order to correlate the extraction efficiency of the pigments, phenolic compounds, and antioxidant capacity with the pretreatments used, we carried out a PCA. This statistical analysis allows to obtain graphs in which the grouping of data in quadrants helps to define the relations between variables.

La comparación de los datos corregidos del Cuadro 1 confirma que la presencia de semillas tiene un impacto negativo en la extracción de los pigmentos y la capacidad antioxidante, y sólo se obtiene un ligero aumento en la extracción de compuestos fenólicos totales (<13 %), por lo cual es más recomendable usar la pulpa sin semillas. Además, se observó un oscurecimiento de los extractos de la pulpa con semillas que se puede deber a la oxidación o degradación de algunos compuestos en el extracto. La presencia de semillas podría favorecer el pardeamiento no enzimático o la oxidación del ácido ascórbico (Suh *et al.*, 2003) que promueven el decaimiento de las betalainas.

Para correlacionar la eficiencia de extracción de los pigmentos, los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante con los pretratamientos usados, se aplicó un ACP. Este análisis estadístico permite obtener gráficos donde el agrupamiento de los datos en los cuadrantes ayuda a definir la relación entre las variables.

#### **Análisis de componentes principales (ACP) de la extracción de los compuestos bioactivos en relación al pretratamiento utilizado**

El ACP se usa en estudios de los alimentos para clasificar variables mediante la reducción estadística de los datos. Los grupos de datos originales se transforman en nuevos grupos de variables no correlacionadas llamados componentes principales (CP), con los cuales se elaboran gráficos que permiten evaluar visualmente similitudes entre las muestras, y determinar si esas muestras se pueden agrupar (Perez-Loredo *et al.*, 2016).

El análisis de los resultados de betacianinas (Bc), betaxantinas (Bx), betalainas totales (BT), compuestos fenólicos totales (CFT) y capacidad antioxidante (CA) mediante ACP, mostró que dos CP explican 96.3 % de la variación total de los resultados (CP1: 71.6 %; CP2: 24.7 %) en pulpa sin semillas (Figura 4), y 97.3 % (CP1: 82.1 %; CP2: 15.2 %) en pulpa con semillas (Figura 5).

Los gráficos de barras son útiles para análisis cuantitativos de las diferencias entre los tratamientos para cada muestra (Figura 1, 2 y 3). Pero el gráfico de CP permite analizar todos los resultados en conjunto y concluir en función de los agrupamientos (Figuras 4 y 5).

#### **Principal component analysis (PCA) of the bioactive compounds extraction with regard to the pretreatment used**

PCA is used in food studies to classify variables by means of the data statistical reduction. The original data groups are transformed into new groups of uncorrelated variables called principal components (PC), which are used to develop graphs that enable the visual evaluation of similarities between the samples, as well as determining if these samples can be grouped (Perez-Loredo *et al.*, 2016).

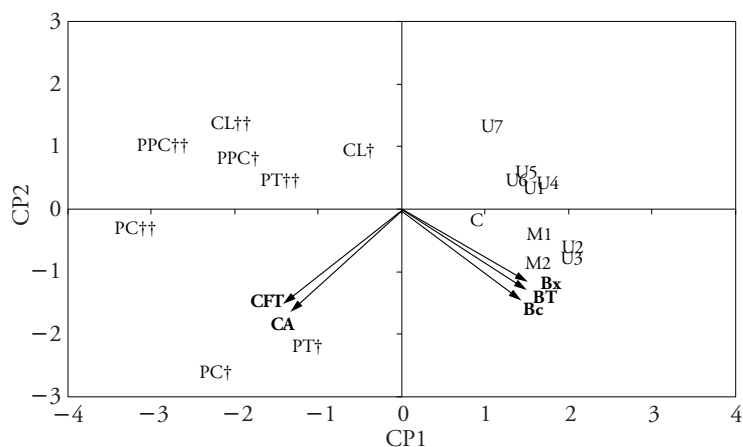
The analysis of the results for betacyanins (Bc), betaxanthins (Bx), total betalains (TB), total phenolic compounds (TPC), and antioxidant capacity (AC) through PCA showed that two PC explain 96.3 % of total result variations (PC1: 71.6 %, PC2: 24.7 %) in seedless pulp (Figure 4), and 97.3 % (PC1: 82.1 %; PC2: 15.2 %) in pulp with seeds (Figure 5).

Bar charts are useful for quantitative analysis of differences between the treatments for each sample (Figure 1, 2 and 3). However, the PC chart allowed us to analyze all the results as a whole and to reach a conclusion on the basis of the groupings (Figures 4 and 5).

The PCA graphs analysis regarding the pulp with and without seeds (Figure 4, 5) shows that enzymatic treatments (PC and PT) provide a higher performance in TPC and AC extraction, whereas ultrasound (U) and microwaves (M) result in higher pigments performance. For seedless pulp (Figure 4), enzymatic pretreatments with long incubation (24 h, ††) or ultrasonic with longer exposure times (U4-U7) are far away from the TB, TPC, and AC variables, (in the PC2 positive quadrants): this means that longer times do not favor extraction. This effect is not so obvious in pulp with seeds (Figure 5), because the TB, TPC, and AC extraction performances are very similar under the different treatments and there are no significant differences ( $p > 0.05$ ) between most of them (Figures 1, 2, 3).

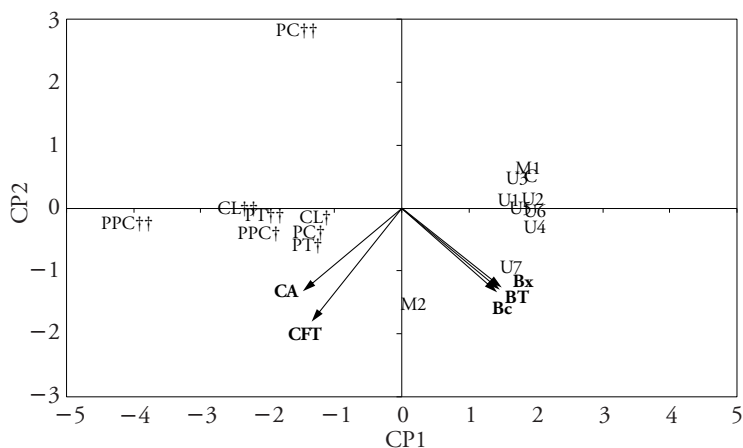
It is important to highlight that antioxidant capacity has a higher correlation with the amount of phenolic compounds (both in PC1 negative) than with the amount of betalains (in PC1 positive).

Based on these results, we suggest that—in order to use of pitaya as a source of bioactive compounds—the pulp must be separated from the seeds, and—in order to maximize the extraction of pigments,



**Figura 4.** Gráfica de dos dimensiones de los componentes principales CP1 y CP2 para las cargas y puntuaciones del ACP de Bc, Bx, BT, CFT y CA obtenidos en pulpa sin semillas sin pretratamiento (C) y con pretratamiento de microondas (M), ultrasonido (U), y con las enzimas proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), proteasa, pectinasa y celulasa (PPC) a 2 (†) y 24 h (††) de incubación.

**Figure 4.** Two-dimensional chart of PC1 and PC2 principal components for the PCA charges and scores for Bc, Bx, TB, TPC, and AC obtained in seedless pulp without (C) and with microwave (M), ultrasound (U) pretreatment and with protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), protease, pectinase and cellulase (PPC) enzymes after 2(†) and 24 (††) h of incubation.



**Figura 5.** Gráfica de dos dimensiones de los componentes principales CP1 y CP2 para las cargas y puntuaciones del ACP de Bc, Bx, BT, CFT y CA obtenidos en pulpa con semillas sin pretratamiento (C) y con pretratamiento de microondas (M), ultrasonido (U), y con las enzimas proteasa (PT), pectinasa (PC), celulasa (CL), proteasa, pectinasa y celulasa (PPC) a 2 (†) y 24 h (††) de incubación.

**Figure 5.** Two-dimensional chart of PC1 and PC2 principal components for the PCA charges and scores of Bc, Bx, TB, TPC, and AC obtained in pulp with seeds without (C) and with microwave (M), ultrasound (U) pretreatments and with protease (PT), pectinase (PC), cellulase (CL), protease, pectinase and cellulase (PPC) enzymes after 2(†) and 24 (††) h of incubation.

El análisis de los gráficos de ACP para la pulpa con y sin semillas (Figura 4, 5) permite observar que los tratamientos enzimáticos (PC y PT) ofrecen mayor rendimiento de extracción de CFT y CA, mientras que con el ultrasonido (U) y microondas (M) se obtiene mayor rendimiento para pigmentos. Para la pulpa sin semillas (Figura 4), los pretratamientos enzimáticos con periodos largos de incubación (24 h, ††) o los de ultrasonido con mayores tiempos de exposición (U4-U7), están alejados de las variables BT, CFT y CA (en los cuadrantes CP2 positivo); esto significa que mayores tiempos no favorecen la extracción. Este efecto no es tan notorio en la pulpa con semillas (Figura 5), porque los rendimientos de extracción de BT, CFT y CA son muy similares con los diferentes tratamientos y en la mayoría de ellos no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Figuras 1, 2, 3).

Cabe resaltar que la capacidad antioxidante tiene mayor correlación con la cantidad de compuestos fenólicos (ambas en CPI negativo), que con la cantidad de betalaínas (en CPI positivo).

Con base en estos resultados, se sugiere que para usar la pitaya como fuente de compuestos bioactivos, la pulpa debe separarse de las semillas y para maximizar la extracción de pigmentos, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, aquella se debe tratar primero con ultrasonido por 15 min y pectinasa al 0.5 %  $p\ p^{-1}$  por 2 h.

## CONCLUSIONES

La aplicación de pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimas hidrolíticas afecta el rendimiento de extracción de betalaínas, fenoles y actividad antioxidante de la pitaya roja (*S. stellatus*). La selección del mejor pretratamiento de la muestra para la extracción de compuestos bioactivos específicos dependerá de la matriz y el objetivo del estudio. Los valores de betacianinas, betaxantinas y betalaínas totales máximos se obtuvieron al aplicar ultrasonido por 15 min. El contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante máximos se obtuvieron al pretratar la pulpa con pectinasa.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Oscar Rene López-Mendiola por su ayuda con la cosecha de los frutos y a Luis Enrique Ruíz-Molina por la identificación taxonómica de los mismos.

phenolic compounds, and antioxidant capacity— the pulp must be treated previously with ultrasound for 15 min and pectinase at 0.5 %  $p\ p^{-1}$  for 2 h.

## CONCLUSIONS

The application of microwave, ultrasound, and hydrolytic enzymes pretreatments affects the performance of betalains, phenols, and the antioxidant activity of the red pitaya (*S. stellatus*). Choosing the best sample pretreatment for the extraction of specific bioactive compounds will depend on the study's matrix and purpose. The maximum total values of betacyanins, betaxanthins, and betalains were obtained applying ultrasound for 15 min. Total phenol content and maximum antioxidant capacity were obtained pretreating the pulp with pectinase.

—End of the English version—



La presente investigación fue financiada por el Instituto Politécnico Nacional (Proyecto SIP-20161310) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB-2011-01-169779). María Guadalupe Pérez-Loredo recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

## LITERATURA CITADA

- Alupului, A., I. Călinescu, and V. Lavric. 2012. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. U P B. Sci. Bull., Series B. 74: 129-142.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. (15<sup>th</sup> ed). Arlington, Virginia, USA. 1298 p.
- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, and A. K. M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. J. Food Eng. 117: 426-436.
- Bagherian, H., F. Z. Ashtiani, A. Fouladitajar, and M. Mohtashamy. 2011. Comparisons between conventional, microwave —and ultrasound— assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. Chem. Eng. Process. 50: 1237-1243.
- Cardoso-Ugarte, G. A., M. E. Sosa-Morales, T. Ballard, M. F. San Martín-Gonzalez, and A. Liceaga. 2014. Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). LWT - Food Sci Technol. 59: 276-282.
- Castellanos-Santiago, E., and E. M. Yahia. 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance



- liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 56: 5758-5764.
- Cejudo-Bastante, M. J., N. Hurtado, and F. J. Heredia. 2015. Potential use of new Colombian sources of betalains. Colorimetric study of red prickly pear (*Opuntia dillenii*) extracts under different technological conditions. *Food Res. Int.* 71: 91-99.
- Chaouch, M. A., J. Hafsa, C. Rihouey, D. Le Cerf, and H. Majdoub. 2015. Depolymerization of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*: Antioxidant and antiglycated activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 79: 779-786.
- Combo, A., M. Aguedo, and M. Paquot. 2011. Pectic oligosaccharides: production and potential applications. *Biotechno. Agron. Soc. Environ.* 15: 153-164.
- Fernández-López, J. A., R. Castellar, J. M. Obón, and L. Almela. 2002. Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia* 56: 591-595.
- Fernández-López, J. A., L. Almela, J. M. Obón, and R. Castellar. 2010. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65: 253-259.
- García-Cruz, L., Y. Salinas-Moreno, and S. Valle-Guadarrama. 2012. Betalainas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (*Stenocereus griseus* H.). *Rev. Fitotec. Mex.* 35: 1-5.
- García-Cruz, L., S. Valle-Guadarrama, Y. Salinas-Moreno, and E. Joaquín-Cruz. 2013. Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68: 403-410.
- Gómez-García, R., G. C. G. Martínez-Ávila, and C. N. Aguilar. 2012. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech.* 2: 297-300.
- Herbach, K. M., C. Maier, F. C. Stintzing, and R. Carle. 2007. Effects of processing and storage on juice color and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice. *Eur. Food Res. Technol.* 224: 649-658.
- Kunnika, S., and A. Pranee. 2011. Influence of enzyme treatment on bioactive compounds and colour stability of betacyanin in flesh and peel of red dragon fruit *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton and Rose. *Inter. Food Res. J.* 18: 1437-1448.
- Laroze, L., C. Soto, and M. E. Zúñiga. 2010. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electron. J. Biotechno.* 13 DOI: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-12.
- Morales, P., E. Ramírez-Moreno, M. C. Sanchez-Mata, A. M. Carvalho, and I. Ferreira. 2012. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xocostle cultivars (*Opuntia joconostle* F. A. C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Res. Int.* 46: 279-285.
- Naderi, N., F. C. Stintzing, H. M. Ghazali, Y. A. Manap, and S. D. Jazayeri. 2010. Betalain extraction from *Hylocereus polyrhizus* for natural food coloring purposes. *J. Prof. Assoc. Cactus* 12: 143-154.
- Nayak, B., F. Dahmoune, K. Moussi, H. Remini, S. Dairi, O. Aoun, and M. Khodir. 2015. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chem.* 187: 507-516.
- Panchev, I., N. Kirchev, and C. Kratchanov. 1988. Improving pectin technology: II. Extraction using ultrasonic treatment. *Int. J. Food Sci. Tech.* 23: 337-341.
- Pérez-Loredo, M. G., F. García-Ochoa, and B. E. Barragán-Huerta. 2016. Comparative analysis of betalain content in *Stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis. *Int. J. Food Prop.* 19: 326-338.
- Prakash M. J., and S. Manikandan. 2012. Response surface modeling and optimization of process parameters for aqueous extraction of pigments from prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit. *Dyes Pigments* 95: 465-472.
- Puri, M., D. Sharma, and C. J. Barrow. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* 30: 37-44.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 299: 152-178.
- Sivakumar V., Lakshmi J. A., Vijayeeswarri J., and Swaminathan G. 2009. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrason Sonochem.* 16: 782-789.
- Suh, H. J., D. O. Noh, C. S. Kang, J. M. Kim, and S. W. Lee. 2003. Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract. *Nahrung* 47: 132-135.
- Villalobos-Castillejos, F., P. Cereza-Mezquita, M. L. Hernández-De Jesús, and B. E. Barragán-Huerta. 2013. Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma*. *Int. J. Food Sci. Tech.* 48: 1243-1251.
- Woo, K. K., F. H. Ngou, L. S. Ngo, W. K. Soong, and P. Y. Tang. 2011. Stability of betalain pigment from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Am. J. Food Tech.* 6: 140-148.
- Yang, B., Y. Jiang, J. Shi, F. Chen, and M. Ashraf. 2011. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit —A review. *Food Res. Int.* 44: 1837-1842.