

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



UTILIZACION DE PIGMENTOS ROJOS DE Escontria
chiotilla COMO COLORANTE EN ALIMENTOS-

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:

VICTOR RAFAEL RAMOS BURBOA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

PAGINA

CAPITULO 1 (INTRODUCCION) 1
 CAPITULO 2 (ANTECEDENTES) 2

- 2.1 IMPORTANCIA DEL COLOR EN ALIMENTOS.
- 2.2 HISTORIA DE LOS COLORANTES DE ALIMENTOS.
- 2.3 ESTUDIOS TOXICOLOGICOS DE COLORANTES DE ALIMENTOS.
- 2.4 COLORANTES SINTETICOS FD&C ROJOS 2 Y 40.
- 2.5 LEGISLACION DE ALIMENTOS EN MEXICO.
- 2.6 ASPECTOS GENERALES Y ESTRUCTURA DE LAS BETALAINAS.
 - 2.6.1 ESTABILIDAD DE LA BETANINA
 - 2.6.2 APLICACION DE BETACIANINAS EN ALIMENTOS.
- 2.7 ASPECTOS GENERALES SOBRE Escontria chiotilla

CAPITULO 3 (MATERIALES Y METODOS) 16

- 3.1 OBTENCION Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.
- 3.2 ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA PARTE COMESTIBLE DEL FRUTO - DE E.chiotilla.
- 3.3 IDENTIFICACION DEL TIPO GENERAL DE PIGMENTOS.
 - 3.3.1 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL.
 - 3.3.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.
 - 3.3.3 ESPECTRO DE ABSORBANCIA EN LA REGION VISIBLE.
- 3.4 CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LOS PIGMENTOS ROJOS
- 3.5 PREPARACION DE EXTRACTOS ACUOSOS.
 - 3.5.1 EXTRACCION ACUOSA NO PURIFICADO.
 - 3.5.2 EXTRACCION ACUOSA PURIFICADO-CONCENTRADO.
- 3.6 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS -- DEL FRUTO DE E.chiotilla.
 - 3.6.1 EFECTO DEL pH.
 - 3.6.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA.
 - 3.6.3 EFECTO DE LA LUZ Y EL AIRE.
- 3.7 APLICACION DE EXTRACTOS PURIFICADO-CONCENTRADO Y NO PURIFICADO EN ALIMENTOS.

CAPITULO 4 (RESULTADOS Y DISCUSION) 28

- 4.1 ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA PARTE COMESTIBLE DE E.chiotilla.
- 4.2 IDENTIFICACION DEL TIPO GENERAL DE PIGMENTOS.
 - 4.2.1 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL.
 - 4.2.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.
 - 4.2.3 ESPECTRO DE ABSORBANCIA EN LA REGION VISIBLE.
- 4.3 PREPARACION DE EXTRACTOS ACUOSOS DE JIOTILLA.
 - 4.3.1 EXTRACCION ACUOSA NO PURIFICADO.
 - 4.3.2 EXTRACCION ACUOSA PURIFICADO-CONCENTRADO.
- 4.4 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS DE E.chiotilla.
 - 4.4.1 EFECTO DEL pH.

- 4.4.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA.
- 4.4.3 EFECTO DE LA LUZ Y EL AIRE.
- 4.5 APLICACION DE EXTRACTOS PURIFICADO-CONCENTRADO Y NO PURIFICADO.

CAPITULO 5 (CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES)	50
CAPITULO 6 (BIBLIOGRAFIA)	52
APENDICE A.	57
APENDICE B.	60
APENDICE C.	61
APENDICE D.	64

I) INTRODUCCION.

En los últimos años la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos de Norteamérica (USA), después de considerar los resultados obtenidos en diversos estudios toxicológicos, ha prohibido el uso en alimentos de varios colorantes sintéticos por considerarlos nocivos a la salud, estando entre ellos los Rojos 1, 2 y 4. Como consecuencia de lo anterior, ha crecido el interés por los pigmentos de origen natural como posibles sustitutos, pues hasta la fecha no hay evidencia de que resulte nocivo su uso.

Debido a que el clima semidesértico, característico de una gran parte del territorio mexicano, es propicio para el crecimiento y desarrollo de las cactáceas, existe en México una gran variedad, estando entre ellas la tuna cardona (Opuntia streptacantha) y la "jiotilla" (Escontria chiotilla).

En México se han efectuado diversos estudios (29,67) que indican la posibilidad de utilizar los pigmentos rojos de tuna cardona como colorante de alimentos.

Escontria chiotilla produce frutos de pulpa de color rojo, a partir de los cuales puede extraerse un colorante para alimentos, en forma semejante al efectuado con tuna cardona, y en caso de resultar favorable su uso, pudiera promoverse su cultivo.

Esta tesis tiene como objetivo estudiar la estabilidad de los pigmentos rojos de los frutos de E.chiotilla y la posibilidad de utilizarlos como colorantes de alimentos.

Para alcanzar el objetivo de esta tesis se consideraron los siguientes aspectos:

- 1) Preparación de extractos acuosos de la pulpa de la fruta, sin purificar, así como purificado por medio de una columna Dowex AG 50W-X8
- 2) Determinación del efecto del pH, temperatura, luz y aire en la estabilidad de los pigmentos rojos.

- 3) Comparación de los pigmentos rojos que presentan los frutos de E. chio tilla con los de la tuna cardona, betabel y pitaya
- 4) Utilización de los extractos acuosos purificado y no purificado en la elaboración de gelatinas y comparación con otras comerciales en las - cuales se emplean colorantes sintéticos, efectuando posteriormente una determinación de preferencia, utilizando con este fin a un grupo de - jueces no entrenados.

II) ANTECEDENTES.

2.1 IMPORTANCIA DEL COLOR EN ALIMENTOS.

Varios estudios han demostrado que los alimentos no tienen el sabor co- rrecto si no presentan la coloración adecuada; esto se debe a que el color es generalmente la primera impresión sensorial que tenemos de los alimentos, e in fluye en nuestra percepción de su olor, sabor, temperatura y textura.

Hall, en 1958 (24) trabajó con nieves de diversos sabores (limón, lima, - naranja, uva, piña y nuez); cuando las muestras se presentaron a un grupo de - jueces con un color blanco, estos no lograron determinar el sabor en la forma correcta; por otra parte, cuando las nieves presentaron un color diferente al que les correspondía de acuerdo a su sabor, los jueces emitieron opiniones in- correctas, por ejemplo, cuando la nieve sabor lima presentó color verde, 75% - de los jueces dijeron que era lima, pero cuando tuvo color púrpura (como la - uva), solo 47% identificaron el sabor en forma correcta. De estos estudios, - los investigadores concluyeron que el color, al menos en este caso, influye más que el sabor en la impresión global que produce un alimento en los consumi- dores, aún cuando el sabor sea agradable, y el alimento conocido y popular.

Por otro lado, otros experimentos demostraron que el color influye podero samente no solo en la habilidad del consumidor para identificar el sabor, sino también en la estimación de su intensidad y calidad.

También es posible cuantificar la relación entre color y otros factores - sensoriales, tales como dulzura y sensación agrídulce. Por ejemplo, un estu- dio efectuado por Kostyla y Clydesdale en 1979 (31) señala que la adición de -

una pequeña cantidad de FD&C (Food, Drug and Cosmetic) Rojo No. 40 a una bebida incrementa su dulzura aparente (al panel de prueba) entre un 5 y 10%, pudiéndose elaborar bebidas dietéticas disminuyendo el contenido de azúcar, y por consiguiente el contenido de calorías, sin que por ello disminuya su aceptabilidad. El estudio también demostró que la adición de FD&C Azul No. 1 a una bebida sabor cereza reduce hasta un 20% el sabor agridulce.

2.2 HISTORIA DE LOS COLORANTES DE ALIMENTOS.

El agregar colorantes a los alimentos para hacerlos atractivos no es una invención de la sociedad contemporánea. Especies y condimentos fueron probablemente usados como colorantes hace 3000 años (66)

Sin embargo, en los siglos XVIII y XIX algunos fabricantes de alimentos inescrupulosos comenzaron a explotar el valor que presentan los colorantes para vender alimentos que eran de mala calidad, o aún descompuestos. Por ejemplo, en 1820, Frederick Accum, en su libro "A Treatise on Adulterations of Food and Culinary Poisons", señaló las siguientes prácticas en Londres:

- Encurtidos frecuentemente deben su agradable color verde al sulfato de cobre.
- El apetecible color de algunos dulces se debe a sales de plomo y cobre altamente tóxicas.
- Espinas y hojas secas, después de colorearse con óxido de cobre se venden como té de China

La mayoría de los colorantes de alimentos que se utilizan en la actualidad son derivados del alquitrán de hulla. El primer colorante de este tipo fue el "Mauve" (color de malva), elaborado en 1856 por Sir William Henry Perkins, en Inglaterra. Su descubrimiento estimuló la investigación para encontrar otros colorantes del mismo tipo, los cuales comenzaron a usarse principalmente en fábricas textiles, pero cuando alguno de ellos no funcionaba bien en esta actividad, los productores lo vendían a los comerciantes de alimentos como un mercado secundario.

En 1900, la Oficina de Química del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América contrató al Dr. Bernhard C. Hesse, experto alemán en

colorantes, para que estudiara el efecto que tenían en la salud de los consumidores la ingestión de los pigmentos y conservadores empleados en alimentos. Su opinión fue que cualquier colorante sintético podía ser utilizado en alimentos siempre que fuera fisiológicamente inofensivo y tecnológicamente necesario (26). Después de estudiar la información disponible sobre 284 colorantes empleados en alimentos, solo aprobó la utilización de 7 de ellos. Esta lista — fue publicada en 1907 en el Acta de Alimentos y Medicamentos Puros, y contenía los siguientes colorantes:

OMBRE COMUN	OMBRE POSTERIOR UTILIZADO POR FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION)
Ponceau 3R	FD&C Rojo No. 1
Amaranto	FD&C Rojo No. 2
Eritrosina	FD&C Rojo No. 3
Naranja 1	FD&C Naranja No. 1
Amarillo Naftol S	FD&C Amarillo No. 1
Verde Claro Amarillento SF	FD&C Verde No. 2
Indigotina	FD&C Azul No. 2

Con el paso de los años la industria de alimentos necesitó más pigmentos, de tal manera que en 1938, ocho nuevos colorantes se añadieron a la lista original de siete, y el proceso de certificación se hizo obligatorio, es decir, — para permitir el uso en alimentos de un nuevo colorante se requería la presentación de un certificado que indicara que el pigmento en cuestión había sido estudiado por expertos competentes, y que después de realizarle análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos, se había comprobado que estaba libre de componentes nocivos para la salud.

Antes de 1938 los colorantes de alimentos eran conocidos por sus nombres — comunes, pero para asegurar que no se confundieran con pigmentos elaborados para otros usos, a los colorantes específicos para alimentos se les designó con una nueva nomenclatura; así Amaranto se convirtió en FD&C Rojo No. 2; Tartarazina, en FD&C Amarillo No. 5, etc. Los colorantes FD&C son más puros que los — utilizados con fines industriales, a los cuales se les conoce con sus nombres comunes.

Hasta 1980, solo 7 colorantes FD&C lograron sobrevivir las pruebas toxicológicas (19):

FD&C Rojo No. 3.
FD&C Azul No. 2
FD&C Amarillo No. 5
FD&C Verde No. 3
FD&C Amarillo No. 6
FD&C Azul No. 1
FD&C Rojo No. 40

(Enunciados en el orden en que fueron aprobados para uso en alimentos).

Otros 2 colorantes son permitidos para usos específicos:

Rojo cítrico No.2 se permite en un nivel que no exceda 2 ppm y únicamente para utilizarlo en cáscaras de naranja.

Naranja B se permite solo en salchichas y embutidos en una cantidad máxima de 150 ppm.

El resto de los colorantes permitidos en alimentos son extractos naturales.

2.3. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS DE COLORANTES DE ALIMENTOS.

A partir de 1938 en EUA se requiere que todos los colorantes de alimentos sean probados en animales bajo la supervisión de la FDA, que fue establecida formalmente ese mismo año. Estos estudios incluyen determinaciones de toxicidad aguda vía oral en ratas, toxicidad aguda intraperitoneal en ratones, y un mínimo de 60 días de pruebas de toxicidad mediante alimentación con el colorante.

En la actualidad, los estudios toxicológicos son más extensos, incluyendo:

a) Estudios de toxicidad aguda en ratas.

- b) Suministro prolongado del colorante en el alimento de 2 especies de roedores, generalmente ratas y ratones (una de las especies debe de constar de hembras preñadas).
- c) Suministro del colorante en el alimento de una especie diferente a los roedores (usualmente perro).
- d) Un estudio teratológico.
- e) Un estudio de reproducción múltiple.

Desde el punto de vista de la Toxicología, un resultado favorable significa simplemente que bajo ciertas condiciones particulares de experimentación, - el investigador no encuentre efectos adversos, pero esto no significa que otra persona, conduciendo un experimento diferente, utilizando diferentes métodos - y/o condiciones, o examinando a los animales desde otro punto de vista no pueda encontrar condiciones adversas (19).

De lo anterior podemos concluir que los colorantes que actualmente se con sideran inocuos pueden llegar a ser considerados nocivos, tal como ha ocurrido con algunos de ellos en los últimos años; es por esto que los pigmentos de ori gen natural presentan un gran futuro como aditivos en la industria de alimen- tos ya que el uso del alimento de que provienen otorga cierta seguridad respec to a su consumo como lo son las tunas, betabel, uvas, etc.

2.4 COLORANTES SINTETICOS FD&C 2 Y 40.

El FD&C Rojo No. 2 (Figura 1) ha sido usado como colorante de alimentos - en EUA desde 1907. En 1970, estudios efectuados por investigadores rusos suci taron dudas respecto al efecto de este colorante en la reproducción animal.

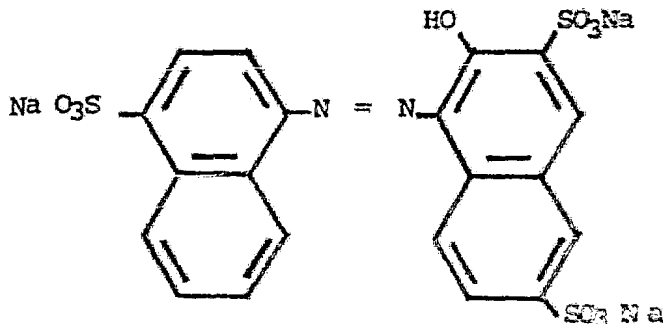


FIGURA 1. FD&C Rojo No. 2

En 1972, un Comité especial de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América recomendó que se hiciera un estudio teratológico por triplicado, conducido por la FDA, la industria y por el Centro Nacional para la Investigación Toxicológica.

La investigación efectuada por la FDA consistió en un estudio de toxicidad crónica por ingestión del colorante con ratas preñadas, a las cuales diariamente se les administró dicho colorante por medio de un tubo estomacal. Las dosis fueron 7.5, 15, 30, 100 y 200 mg de colorante/Kg de peso del animal, y la muerte de los fetos atribuida a la ingestión del pigmento. Esto ocurrió en todas las dosis, excepto en la de 7.5 mg/kg de peso (69, 70).

En 1975, la FDA nombró un Comité Consultivo de Toxicología para que analizara todos los datos y estudios disponibles sobre el FD&C Rojo No. 2. Este comité rechazó el estudio efectuado por la FDA debido a que la dosis de prueba no se mantuvo constante y el grado de extensión de la autólisis del tejido hacían difícil la evaluación patológica, por lo que no se podía demostrar en forma concluyente la toxicidad del colorante (19, 69, 70).

En 1976 la FDA señaló que debería efectuarse un estudio adecuado que disipara todas las dudas antes de que el colorante en cuestión pudiera ser señalado como inocuo, y con esto el Comisionado dio por terminado el registro provisional del colorante en protección de la salud pública (19).

En 1980 se rechazó una petición de registro permanente del FD&C Rojo No.-2 debido a que la información disponible era insuficiente para demostrar que el colorante era de uso seguro en alimentos (17).

Sin embargo, la División de Protección de la Salud de Canadá considera que las investigaciones efectuadas por la FDA presentaban un inadecuado control experimental, ya que había habido confusión en el número de animales y en las dietas. Los investigadores canadienses indican que no hay explicación de por qué la aparición de tumores solo se daba en ratas hembras en el estudio de la FDA, y que este hecho, siguiendo un razonamiento lógico, podía utilizarse como evidencia de que en ratas machos el Azaranto previene la aparición de cancer -

Además, los científicos canadienses señalan que según sus propios estudios, el FD&C Rojo No. 2 no es mutagénico, y esta es una característica que generalmente se presenta amada a los efectos teratogénicos; por otra parte la estructura química del Amaranto no es semejante a la de otros colorantes que se ha encontrado que producen cancer. Como resultado de estas consideraciones, el Ministro Canadiense de Salud y Bienestar Nacional decidió en 1976 no prohibir el uso del FD&C Rojo No. 2 en alimentos, y en la misma posición están Suecia, Dinamarca, Alemania Occidental, Japón y los países miembros de la Comunidad Económica Europea.

Por otra parte, Canadá ha rehusado permitir el uso en alimentos del FD&C Rojo No. 40. Esta decisión ocurrió en 1974, después que los científicos de la Oficina de Salud Pública concluyeron que los datos proporcionados por los productores para demostrar su seguridad eran insuficientes. Sin embargo, el Rojo No. 40 ha sido aprobado en forma permanente para usarlo en alimentos en EUA ese mismo año (1974), y es en la actualidad el único color rojo certificado que se admite en EUA para cualquier uso en alimentos.

Otros 8 países admiten el uso del Rojo No. 40 en alimentos. Desde 1974 se han completado 3 estudios de toxicidad crónica por ingestión del colorante. Un estudio con ratones indicó una posible aceleración en la formación de tumores, pero ha habido muchas discusiones acerca de la validez de la metodología seguida (19)

2.5 LEGISLACION DE ALIMENTOS EN MEXICO.

En México, la legislación en materia de alimentos está a cargo de la sección de Asesoría de Alimentos y Bebidas, perteneciente a la Dirección General de Control de Alimentos, Bebidas y Medicamentos de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Las regulaciones para los aditivos alimentarios permitidos en México se encuentran en el Reglamento para Aditivos (57) emitido por el sector salud del Gobierno Federal y publicado en el Diario Oficial del 15 de febrero de 1979. En el artículo 12 de dicho reglamento se mencionan los colorantes orgánicos sintéticos permitidos en México para utilizarlos en alimentos, siendo los siguientes:

Amarillo No. 5	(Tartrazina)
Amarillo No. 6	(Sunset FCF)
Azul No. 2	(Indigotina)
Rojo No. 1	(Ponceau 3R)
Rojo No. 2	(Amaranto)
Rojo No. 3	(Eritrosina)
Rojo No. 4	(Ponceau SX)
Rojo No. 5	(Carmoisina)
Rojo No. 6	(Ponceau 4R)
Violeta No. 1	(Violeta Lana 5 BN)

Sin embargo, se hace la aclaración de que esta lista cambia constantemente, por lo que es necesario consultar a las autoridades de la Secretaría de Salubridad y Asistencia para conocer los colorantes aceptados en un momento determinado.

2.6. ASPECTOS GENERALES Y ESTRUCTURA DE LAS BETALAINAS.

El término "Betalaínas" ha sido introducido recientemente (36) para describir colectivamente a 2 grupos de pigmentos vegetales solubles en agua, con estructuras químicas semejantes: los pigmentos rojo-violeta llamados "Betacianinas", término introducido por Dreiding en 1961 (12), y los pigmentos amarillos denominados "Betaxantinas" por Wyler et al (80) y Piattelli et al (53).

La estructura de las betalaínas (Figuras 4 y 5) es diferente a la de otros pigmentos encontrados en el reino vegetal, tales como antocianinas (Figura 2) y flavonoides (Figura 3), pues estos, a diferencia de las betalaínas, no contienen nitrógeno.

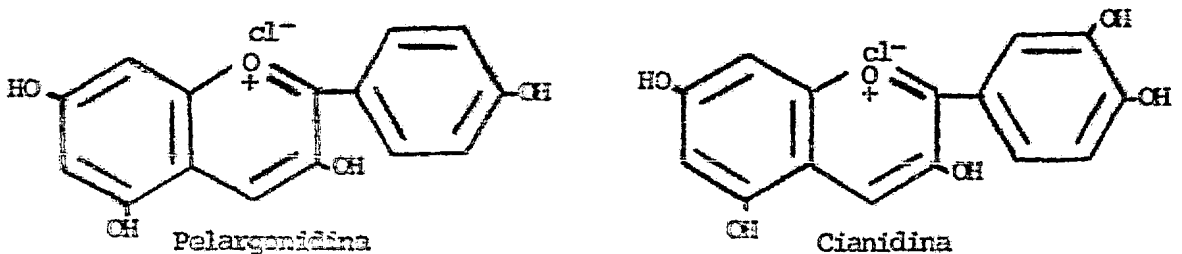


FIGURA 2. Antocianinas.

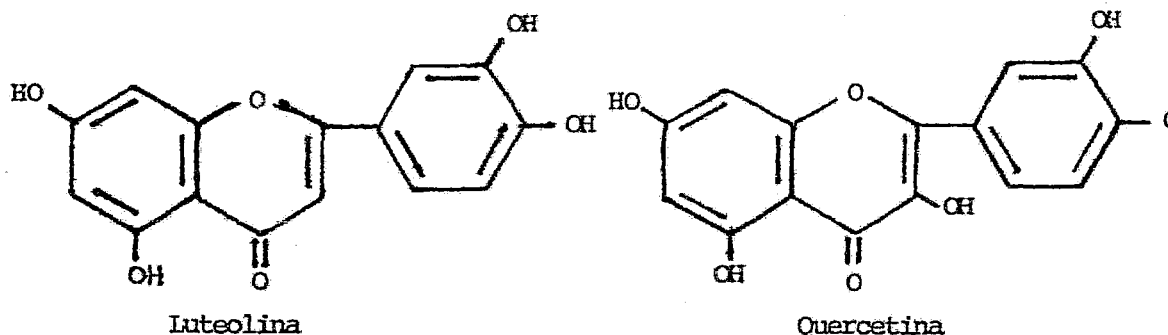


FIGURA 3. Flavonoides.

Las betalainas solo se han encontrado en 10 familias del reino vegetal, - agrupadas en el orden Centrospermae, las cuales son: Chenopodiaceae, Didieraceae, Amaranthaceae, Nyctaginaceae, Stegnospermaceae, Phytolaccaceae, Ficoidaceae, Portulacaceae, Besellaceae y Cactaceae (37). Betacianinas y Antocianinas aparentemente no coexisten en la misma planta, ni aun en la misma familia.

El color de las betalainas se atribuye a la resonancia de su estructura - (Figura 4); si R o R' no extienden la resonancia, el compuesto es amarillo (betaxantinas); si R o R' sí extienden la resonancia, el color será rojo (betacianinas) (18).

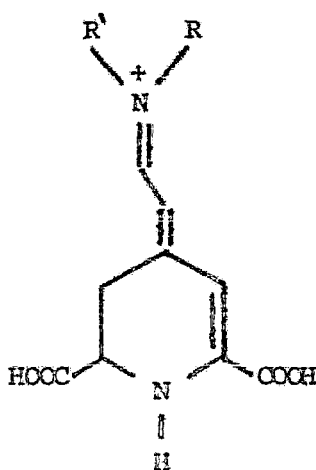


FIGURA 4. Estructura base de las betalainas.

Algunas betacianinas encontradas en la familia Cactaceae presentan las siguientes estructuras:

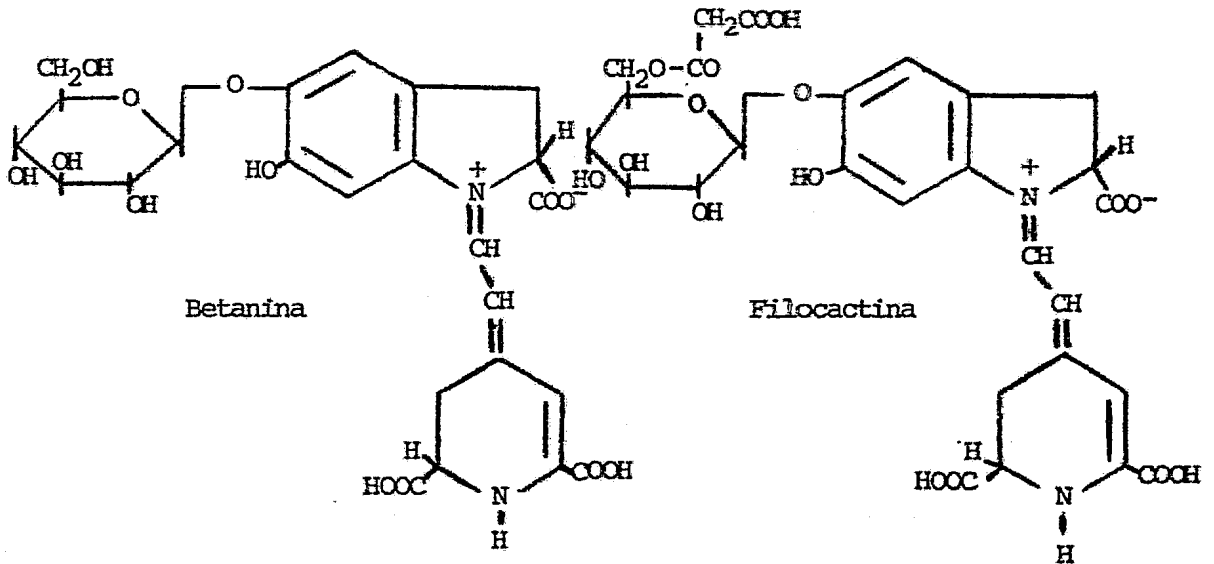
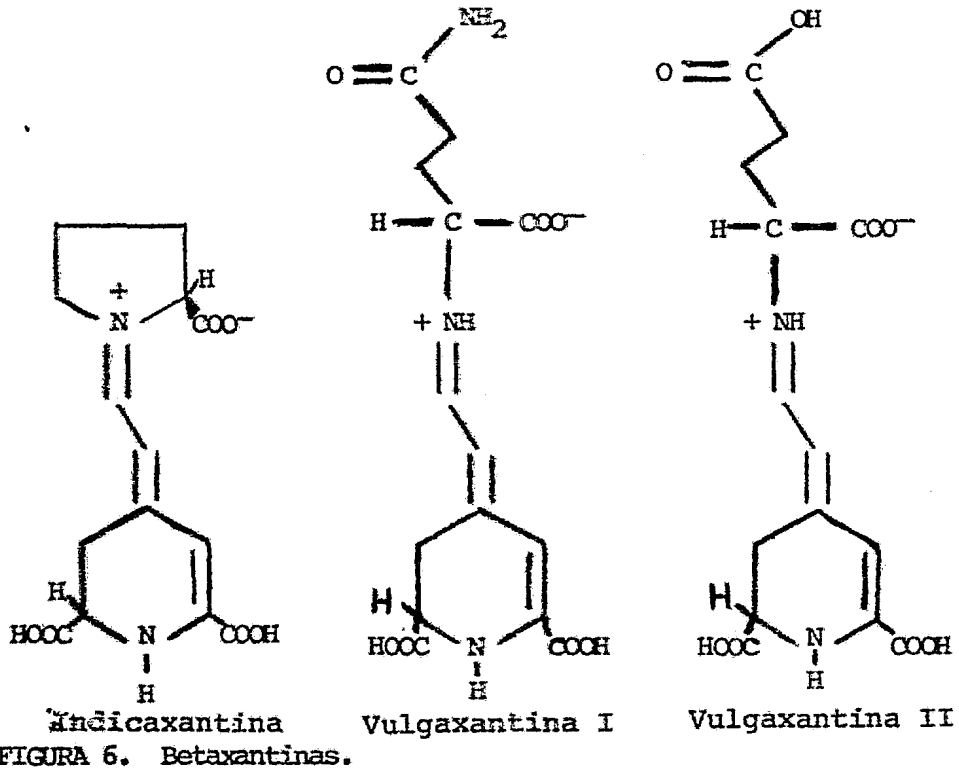


FIGURA 5. Betacianinas.

En la familia Cactaceae la betanina es la betacianina que se encuentra en mayor cantidad (51); ha sido la betacianina más estudiada hasta la fecha. Fue aislada por primera vez en 1957 del betabel (Beta vulgaris) por Wyler y Dreiding e independientemente, en ese mismo año, por Schmidt y Schönleben (23). Presenta en agua un $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1120$ y una $\lambda_{\text{máx}} = 538 \text{ nm}$ (51,52).

La Filocactina se encuentra en una cantidad menor que la betanina en la familia Cactaceae; presenta en agua un $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 740$ y una $\lambda_{\text{max}} = 538 \text{ nm}$ (51,52).

La primera betaxantina obtenida en forma cristalina fue la indicaxantina, aislada en 1963 por Piattelli y Minale de los frutos del cactus Opuntia ficus-indica (55). Posteriormente Piattelli et al, en 1964, lograron aislar de Beta vulgaris otras 2 betaxantinas, llamándolas vulgaxantina I y vulgaxantinas III (54). (Figura 6).



2.6.1 ESTABILIDAD DE LA BETANINA.

Como se ha mencionado, la betanina ha sido la betacianina más estudiada, por ser la que se encuentra en mayor cantidad en la naturaleza y además, por haber sido la primera en ser aislada.

Von Elbe et al en 1974 encontró que la betanina es más estable a un pH cercano a 5.0 (73). Estudios más precisos llevados a cabo por Saguy en 1979 indican que a un valor de pH 5.8 se obtiene una mayor estabilidad de la betanina (60).

El efecto de la temperatura ha sido estudiado por varios investigadores (60,62,73), encontrando que un incremento de la temperatura tiene un efecto negativo en betanina, al aumentar su velocidad de degradación.

La presencia de aire incrementa la velocidad de degradación de la betanina en 14.6%, y la luz en 15.6%; la exposición conjunta a luz y aire incrementa la velocidad de degradación de la betanina en 28.6%, indicando que estos efectos son acumulativos (73).

La actividad de agua (a_w) también influye en la estabilidad de la betanina; Pasch, en 1975, encontró que el tiempo de vida media ($t^{1/2}$) de este pigmento es casi 4 veces mayor cuando $a_w = 0.37$, que cuando $a_w = 1.0$. (47).

El efecto de ácidos orgánicos, cationes, antioxidantes y sequestrantes ha sido estudiado recientemente (48), encontrándose los siguientes resultados:

- Los ácidos acético y láctico no afectan la estabilidad de la betanina.
- Cationes a 100 ppm aceleran la velocidad de degradación, teniendo Cu un efecto mayor que Fe.
- Antioxidantes tales como α -tocoferol y ácido ascórbico a 100 ppm tampoco — presentan un efecto apreciable sobre la estabilidad de la betanina.
- Sequestrantes como ácido cítrico y EDTA a concentraciones de 10000 ppm incrementan el $t^{1/2}$ de la betanina en 1.5 veces.

2.6.2 APLICACION DE BETACIANINAS EN ALIMENTOS.

En años recientes se han utilizado concentrados de betabel para colorear diversos productos alimenticios (13, 67, 70, 72), entre los cuales están:

- Postres, tales como helados, jaleas, gelatinas, cremas, rellenos de pasteles, yoghurt.
- Productos de carne, tales como las salchichas, sustituyendo de esta manera — a los nitritos y nitratos.
- Alimentos enlatados, tales como puré de tomate, frutas enteras (por ejemplo: cerezas y fresas), etc.

En los alimentos mencionados se ha encontrado que los pigmentos naturales pueden sustituir con éxito a los colorantes sintéticos, sin tener los riesgos toxicológicos que los últimos presentan.

2.7 ASPECTOS GENERALES SOBRE Escontria chiotilla.

Clasificación Taxonómica: (6, 16, 67):

REINO	-Vegetal
SUB-REINO	-Embryophyta Siphonogama (fanerógamas)
DIVISION	-Angiospermae (Angiospermas)
CLASE	-Dicotyledoneae (Dicotiledóneas)
SUB-CLASE	-Dialipétalas
ORDEN	-Cactales
FAMILIA	-Cactaceae
SUB-FAMILIA	-Cereoideae
TRIBU	-Pachycereae
SUB-TRIBU	-Pterocereinae
GENERO	-Escontria
ESPECIE	-chiotilla

Las cactáceas son nativas del continente americano, en el que actualmente se encuentran distribuidas desde Canadá, a una latitud de 56°N, hasta el estrecho de Magallanes, en América del Sur (6). Es probable que E. chiotilla sea originaria y exclusiva de México.

Los frutos de Escontria chiotilla se conocen vulgarmente como "chiotilla" o "jiotilla"; ésta es una cactácea arborescente, de 3 a 4 metros de altura; presenta tronco corto y grueso (de aproximadamente 40 cm. de diámetro), ramas muy numerosas y rígidas de color verde oscuro. Posee espinas radiales rectas, dirigidas a veces hacia abajo, con una longitud de 1 cm. y también espinas centrales (3 a 5), una mucho más larga, como de 7 cm. de longitud, rectas, ligeramente aplanadas, de color grisáceo, con la punta más oscura. Contiene flores en la terminación de las ramas, las cuales miden 3 cm. de longitud, con segmentos interiores amarillos; sus estambres también son de color amarillo. Sus frutos son globosos, escamosos, color café rojizo, de aproximadamente 3.5 cm. de diámetro, con pulpa purpurina, dulce, comestible; las semillas son negras, de 1.5 mm. de anchura.

Escontria chiotilla se encuentra distribuida en Puebla, Oaxaca, Guerrero y Michoacán. Ha sido colectada en Tehuacán, Calipan y Acatlán, Puebla; en Cuicatlán, Sierra Mixteca y en Totolapan, Oaxaca; en el cañón del zopilote, Guerrero, y en la zona de la Presa del Infiernillo, Michoacán. Los ejemplares de la región de la Presa del Infiernillo poseen ramas más robustas y espinas centrales más cortas. Las asociaciones que forman se llaman "quiotillales".

Los frutos, conocidos con el nombre de "jiotillas", se venden durante los meses de junio y julio en los mercados regionales; son muy agradables y con ellos puede prepararse mermeladas, conservas, aguas frescas, etc. (6).

III MATERIALES Y METODOS.

3.1 OBTENCION Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Se consiguieron muestras de frutos maduros de E. chiotilla en un mercado público de Izúcar de Matamoros, Puebla, siendo su origen probable de los estados de Puebla y Oaxaca. Estas muestras se obtuvieron en octubre de 1981, siendo almacenadas en congelación a -20°C , descongelándose a temperatura ambiente en el momento de proceder a efectuar los diversos análisis.

3.2 ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA PARTE COMESTIBLE DE FRUTO DE E. chiotilla.

Se efectuaron determinaciones de humedad, cenizas, proteína cruda, fibra cruda y grasa mediante métodos descritos en el AOAC (45).

3.3 IDENTIFICACION DEL TIPO GENERAL DE PIGMENTOS.

La identificación del tipo general de pigmentos rojos del fruto de E. - - chiotilla se efectuó observando el comportamiento de los mismos en cromatografía en capa fina, cromatografía descendente en papel, y obteniendo su espectro de absorbancia en la región visible (380-620 nm.)

3.3.1 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL.

Se utilizó papel para cromatografía Whatman según la técnica para cromatografía descendente descrita por Piattelli y Minale (52). El sistema de eluantes empleado fue piridina 0.1 M:ácido fórmico 0.1 M (1:1).

En el mismo papel se colocaron muestras de betabel, tuna cardona, pitaya y jiotilla, procediéndose en forma semejante a el caso siguiente (cromatografía en capa fina).

3.3.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Se emplearon cromatofolios Al de silicagel 60 F₂₅₄ para cromatografía en capa fina con espesor de la capa de 0.2 mm, producidos por Merck. El sistema de eluyentes utilizado fue ácido fórmico: butanol (2.5: 1.5).

En una misma placa se colocaron muestras de betabel (Beta vulgaris), tuna cardona (Opuntia Streptacantha), pitaya (Stenocereus montanus) y jiotilla (Escontria chiotilla) con el fin de medir sus Rf's y determinar si la jiotilla — tiene el mismo tipo de pigmentos rojos que las muestras restantes (Betacianinas).

Los extractos de cada una de las muestras se hicieron macerando manualmente la pulpa, agregando agua destilada y filtrando a través de gasa.

3.3.3 ESPECTRO DE ABSORCION EN LA REGION VISIBLE.

Se utilizó un extracto acuoso purificado (pasado por columna de intercambio iónico Dowex AG 50W-X8 de 22.5 X 1.7 cm.)

El espectro de barrido respecto a su absorbancia en la región visible — (380-620 nm) se obtuvo empleando un Espectrofotómetro Perkin-Elmer Hitachi 200, con una velocidad de barrido de 60 nm/min, conectado a un graficador Perkin-Elmer Hitachi 200 con un rango fotométrico de 1.0, obteniéndose valores de absorbancia entre 0 y 1.0

3.4 CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DE LOS PIGMENTOS ROJOS.

Se utilizó un método espectrofotométrico desarrollada por Nilsson en 1970 (44) mediante el cual se determinan betacianinas y betaxantinas en betabel, — sin que sea necesaria una separación inicial de ambas. La betanina tiene $\lambda_{\text{máx.}}$ entre 535 y 540 nm, pero también absorbe en la $\lambda_{\text{máx.}}$ de la vulgaxantina: 476-478nm (en betabel) y de la indicaxantina: 485 nm. (en tuna cardona). Las betaxantinas, tanto vulgaxantina como indicaxantina, no absorben en la $\lambda_{\text{máx.}}$ de la betanina, de tal manera que la absorbancia de una mezcla de ellas a esa longitud de onda sólo se debe a la betanina. La betanina tiene un $E_{1\%}^{1\text{cm.}} = 1120$ (51, 52).

Para extractos de E. chiotilla se hizo la suposición de que los pigmentos rojos corresponden a betanina, utilizándose para los cálculos un $E_{1\%}^{1\text{cm.}} = 1120$ y una longitud de onda de máxima absorbancia de 538 m.

Los pigmentos amarillos presentes en los extractos acuosos de "jiotilla" no se cuantificaron.

3.5 PREPARACION DE EXTRACTOS ACUOSOS.

Se elaboraron extractos no purificado, y purificado-concentrado de la manera siguiente:

3.5.1. EXTRACTO ACUOSO NO PURIFICADO.

Se pesaron 690 gramos de "jiotilla", se les quitó la cáscara (210 gramos), quedando 480 gramos de pulpa, la cual se maceró manualmente en mortero, se -- agregaron 300 ml. de agua destilada y desionizada y se filtró utilizando 4 capas de gasa. Al residuo se le efectuaron otras 2 extracciones sucesivas con -- 200 y 150 ml. de agua destilada y desionizada, respectivamente. Los extractos obtenidos se juntaron y se filtraron en papel whatman # 1. Se ajustó el pH a 3.0 con el fin de evitar contaminaciones microbianas. Se refrigeró a 4°C por 24 hrs, después de lo cual se centrifugó a 5000 g. por 10 minutos (IEC HT Centrifuga.- Damon IEC División, International Equipment Co.) El sobrenadante --

se ajustó a pH 5.0, se guardó en frasco ámbar, en atmósfera de nitrógeno y en refrigeración (4°C). Este fue el extracto acuoso no purificado que se utilizó para efectuar las diversas determinaciones de estabilidad de los pigmentos rojos (Figura 7).

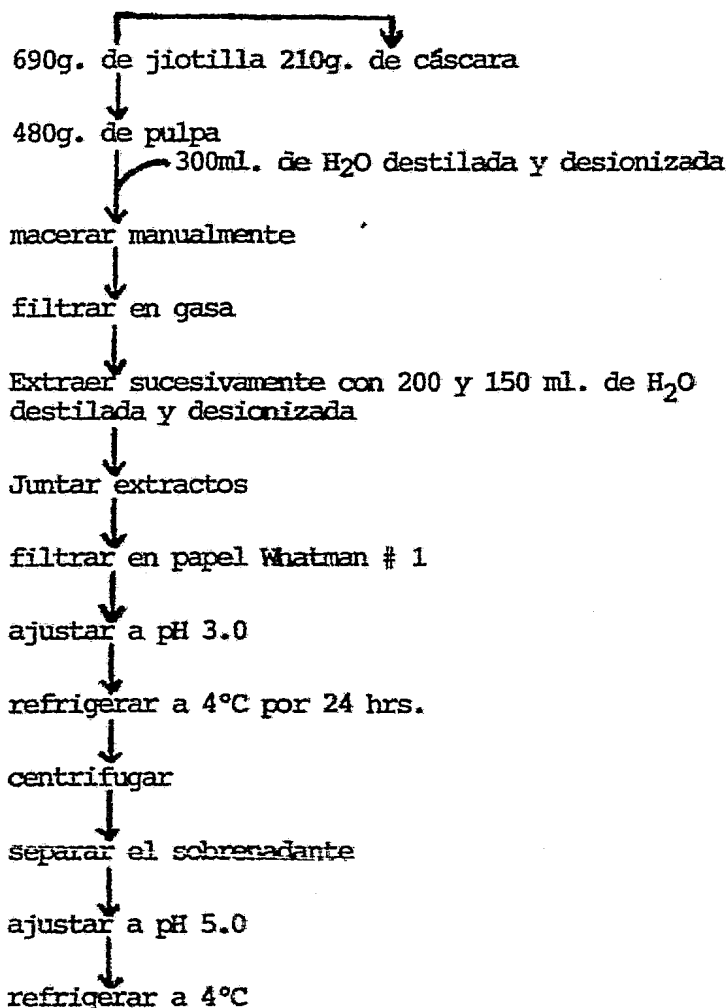


Figura 7. Elaboración del extracto acuoso no purificado.

3.5.2. EXTRACCION ACUOSO PURIFICADO-CONCENTRADO.

Se pasaron 120 ml. de extracto acuoso no purificado por una columna de intercambio iónico Dowex AG 50W-X8 (22.5 X 1.7 cm.) protegida por papel aluminio de la luz.

Se lavó con HCl 0.1% con el fin de eliminar azúcares e impurezas que acompañan a los pigmentos. El extracto acuoso no purificado se lavó con HCl 0.1% hasta desaparición total de azúcares, empleándose para ello 450 ml. Para la determinación de azúcares en el extracto no purificado se empleó un Refractómetro Binko No. 9025, 0-32%, Japón.

Los pigmentos se eluyeron con agua destilada y desionizada, obteniéndose un volumen de 1000 ml., los cuales se concentraron en rotavapor (Rotavapor "R" Buchi No. 113048, Made in Switzerland) a 30-32°C, utilizando presión reducida, hasta un volumen final de 60 ml. Este fue el extracto acuoso purificado-concentrado que se utilizó para efectuar las pruebas de estabilidad.

Se determinó la absorbancia a 538 nm. (Espectrofotómetro Pye Unicam SP - 30), utilizando como blanco agua destilada y desionizada, al extracto no purificado que se agrega a la columna de intercambio iónico, así como al extracto purificado diluido que sale por la columna y al extracto purificado después de concentrar en rotavapor.

3.6 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS DEL FRUTO DE E. chiotilla.

Se determinó el efecto del pH, de la temperatura, de la luz y del aire en la estabilidad de los pigmentos rojos de "chiotilla", utilizando para ello los extractos no purificado, y purificado-concentrado.

3.6.1. EFECTO DE pH.

Se prepararon soluciones amortiguadoras de Mc Ilvaine, fosfato-ácido cítrico 0.1 M con valores de pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, y 7.0, solución amortiguadora de fosfato de pH 8.0 y una solución de HCl de pH 2.0 (39).

Se tomó 1 ml. de extracto purificado-concentrado (1.06mg. de betacianinas/100 ml.) y se aforó a 5 ml. con la solución de HCl de pH 2.0, siguiendo el mismo procedimiento con el resto de las soluciones amortiguadoras.

Se tomó 1 ml. de extracto no purificado (5.27mg. de betacianinas/100 ml.) y se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior, a excepción de que aquí se aforó a 10 ml. con cada una de las soluciones amortiguadoras.

Todas las muestras se colocaron en tubos cubiertos con papel aluminio (para proteger a los pigmentos de la luz), con rosca y tapón y se protegió con nitrógeno, guardándose en refrigeración (4°C). La absorbancia obtenida en cada pH se registró inmediatamente a 538 nm. así como a los 7 y 14 días de almacenamiento, respectivamente. Estas determinaciones se efectuaron por duplicado.

3.6.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA.

Se emplearon extractos purificado-concentrado y no purificado con concentraciones conocidas de betacianinas (3.125 mg/100 ml. y 5.5 mg/100 ml., respectivamente).

Se siguió un procedimiento similar al del caso anterior, utilizando solamente soluciones amortiguadoras a pH 3.0, 5.0 y 7.0: se toman alícuotas de 1 ml. de extracto no purificado y se aforan a 10 ml. con la solución amortiguadora respectivamente; posteriormente se toman alícuotas de 1 ml. de extracto purificado-concentrado, aforándose a 5 ml.

Las muestras se colocan en tubos cubiertos con papel aluminio y se tapan en presencia de aire.

Los valores de estabilidad térmica a pH de 3.0, 5.0, y 7.0 para estos sistemas se determinaron (2 repeticiones) a temperaturas de 50, 75 y 95°C en un baño de agua con temperatura controlada (Reciprocal Water Bath Shaker, Model R76, New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, N.J. USA).

Se registraron las absorbancias a 538 nm a intervalos de tiempo particulares para cada pH y extracto investigados.

La degradación de los pigmentos rojos se estudió por duplicado, determinando el decremento en absorbancia a una longitud de onda de 538 nm. y poste-

riormente calculando el % relativo de absorbancia, (RA) de la manera siguiente:

$$\% RA = \frac{\text{Absorbancia al tiempo X (a } \lambda = 538 \text{ nm.)}}{\text{Absorbancia al tiempo 0 (a } \lambda = 538 \text{ nm.)}}$$

Los valores de %RA, por duplicado, a cada temperatura de tratamiento (50, 75 y 95°C) se graficaron en papel semilogarítmico contra tiempo de calentamiento. La relación lineal obtenida indica que la degradación de los pigmentos rojos sigue una cinética de 1er orden.

Con el fin de obtener resultados más precisos, los valores de %RA, por duplicado, a cada temperatura de tratamiento, se emplearon para calcular la ecuación de regresión, utilizando para ello una calculadora Texas Instrument TI 55, obteniendo de esta manera los valores de ordenada al origen, pendiente, tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y coeficiente de correlación en cada caso, de las rectas obtenidas al graficar las observaciones contra el tiempo, de acuerdo al modelo lineal del tipo:

$$\text{Log. } (\%RA) = \text{Log. } A + mt.$$

en donde la información puede ser expresada en forma lineal, en base logarítmica, siendo:

- A= ordenada al origen
- m= pendiente
- t= tiempo de calentamiento

El valor de la constante de velocidad k se obtiene multiplicando el valor de la pendiente m por -2.303 (73).

El conocimiento del orden de reacción permite expresar la velocidad de degradación en términos de tiempos de vida media ($t_{1/2}$), los cuales se calculan a partir de la ecuación de regresión, dispuesta para una cinética de reacción de 1er. orden, en la forma siguiente:

$$t_{(1/2)} = \frac{\text{Log. } 50 - \text{Log } A}{m}$$

donde:

$$t_{(1/2)} = \text{tiempo de vida media}$$

El coeficiente de correlación r^2 es una medida estadística que permite — determinar cual modelo de regresión se ajusta mejor a los datos observados; el coeficiente varía entre 0 y 1, y el modelo que más se acerque a la unidad es — el más adecuado para una situación particular. El grado de ajuste de las rec-
tas a los datos experimentales se evaluó utilizando para ello una calculadora Texas Instrument TI 55.

El valor D ó tiempo de reducción decimal se define como el tiempo en minu-
tos a una temperatura constante necesario para destruir 90% de los microorga-
nismos presentes en un alimento ó de un nutriente termolábil, en este caso —
particular, los pigmentos rojos. En otras palabras, el valor D representa el
tiempo en minutos, a una temperatura constante, necesario para cubrir un ciclo
logarítmico en una gráfica de degradación térmica.

Los valores D, en cada caso particular, se calcularon de la manera siguien-
te, utilizando los valores de la recta ajustada:

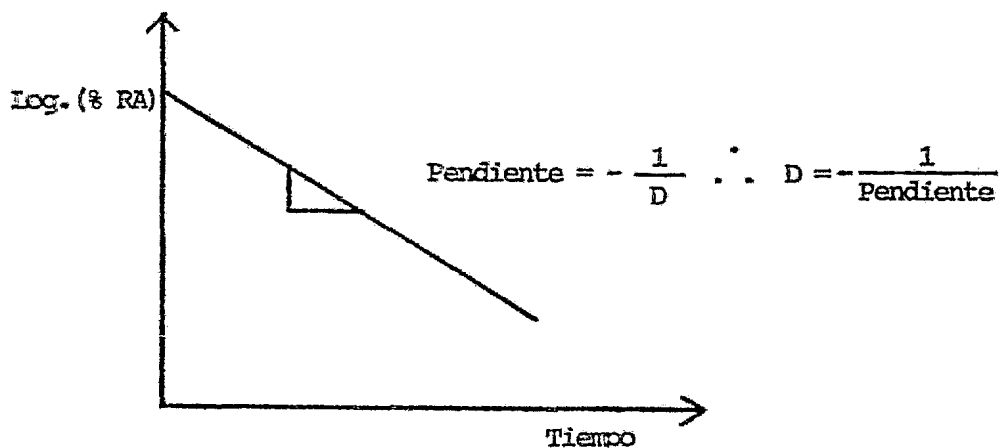


FIGURA 8. Concepto del valor D.

El valor Z representa la temperatura requerida (en °F) para producir una disminución decimal en D. Los valores Z de cada caso se calculan graficando el logaritmo decimal de los valores D contra temperatura, y las pendientes de las rectas trazadas se emplean para obtener los valores Z respectivos:

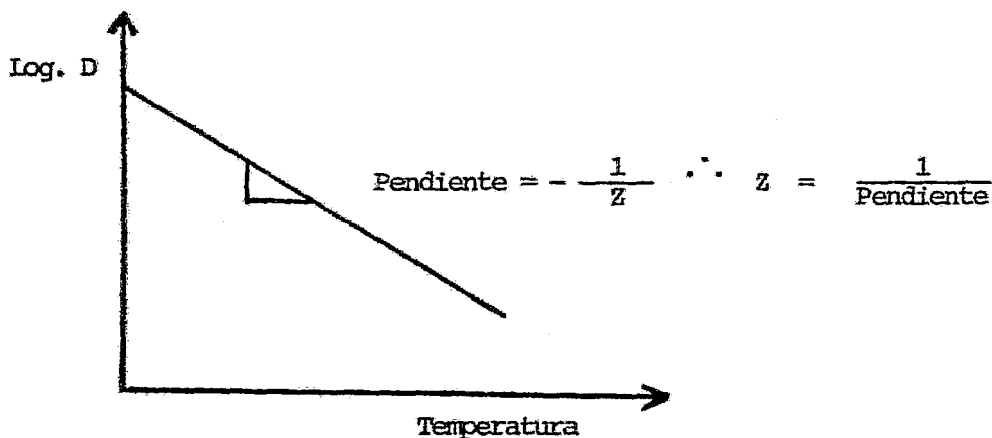


FIGURA 9. Concepto del valor Z.

Evidentemente, a mayor resistencia térmica de los pigmentos, se tiene un mayor valor D, ya que tomará más tiempo llevar a cabo la reducción del 90% de la concentración.

De la misma manera se puede decir que a valores altos de Z se tiene una mayor estabilidad térmica de los pigmentos en cuestión.

3.6.3 EFECTO DE LA LUZ Y EL AIRE.

Se prepararon las muestras de extractos purificado-concentrado y no purificado a pH 3.0 y 5.0 de la misma manera descrita anteriormente, exponiéndose cada una de ellas a los siguientes tratamientos por duplicado:

- a) Luz y aire

- b) Luz y nitrógeno.
- c) Oscuridad y nitrógeno.

La luz utilizada es la que proporcionaba una lámpara de 75 watts, la cual mantenía una temperatura constante de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ en el interior de una caja de cartón de 40 cm. de largo por 30 cm. de ancho y 39 cm. de altura. La distancia entre las muestras y la lámpara era de 35 cm., registrándose la absorbancia a 538 nm. de cada muestra a diferentes intervalos de tiempo; el experimento fue en presencia de O_2 (Figura 10).

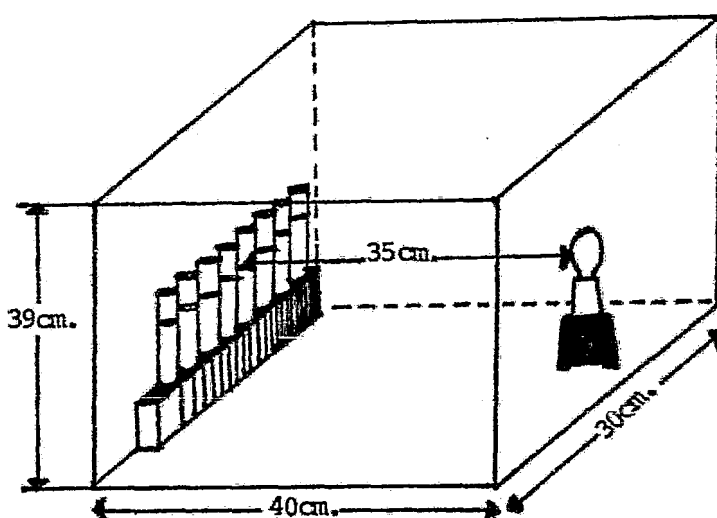


FIGURA 10. Cámara para determinar el efecto de la luz en la estabilidad de los pigmentos rojos.

3.7 APLICACION DE EXTRACTOS PURIFICADO-CONCENTRADO Y NO PURIFICADO EN ALIMENTOS.

Se elaboraron gelatinas utilizando extractos purificado - concentrado y no purificado para impartir color, realizándose evaluaciones de preferencia comparando con gelatinas comerciales, empleando para este fin a un grupo de jueces no entrenados. A los resultados obtenidos se les efectuó análisis de varianza (32).

Las gelatinas se elaboraron utilizando la siguiente formulación:

- 8.0 g. de grenetina.
- 50.0 g. de azúcar.
- 0.8 g. de ác. cítrico.

Esta mezcla se llevó a un volumen final de 350 ml. utilizando agua destilada en ebullición; después que los ingredientes se hubieron disueltos, se permitió que la temperatura descendiera hasta 35-40°C, agregando en este momento los extractos purificado-concentrado y no purificado para obtener las concentraciones siguientes de betacianinas en base a $E_1^{1\%} = 1120$ (en muestras de 20 ml colocadas en vasos de plástico transparente):

Pigmento purificado-concentrado:

- a) 3ppm de betacianinas.
- b) 6ppm de betacianinas.
- c) 9ppm de betacianinas.

Pigmento no purificado:

- a) 3.5ppm de betacianinas.
- b) 7.0ppm de betacianinas.
- c) 10.0ppm de betacianinas.

También se prepararon gelatinas comerciales de sabor fresa; cereza, fram-buesa y grosella de acuerdo a las instrucciones del fabricante, colocándose — muestras de 20 ml. de cada una de ellas en vasos de plástico transparente.

Todas las muestras, tanto de gelatina comercial como de gelatina preparada se almacenaron a 4°C, efectuando evaluaciones de color a los 3, 7 y 14 días de preparadas, utilizando para ello a un conjunto de jueces no entrenados, a los cuales se les proporcionó en cada ocasión un cuestionario (Cuadro 1). Posteriormente se determinaron las calificaciones promedio obtenidas por muestra y se efectuó el análisis de varianza para determinar si existe o no diferencia significativa entre las muestras (32). El cuestionario mostrado en el Cuadro 1 se utilizó para muestras comerciales, y otro idéntico, pero con diferentes — claves numéricas se empleó para gelatinas preparadas.

CUADRO 1

PRUEBA DE ANALISIS DE PREFERENCIA (67).

NOMBRE: _____ FECHA: _____

Examine cada muestra por separado en la escala que se le presenta y marque el grado de preferencia según su criterio.

COLOR.

	316	412	218	019	134	202
GUSTA EXTREMADAMENTE	___	___	___	___	___	___
GUSTA MUCHO	___	___	___	___	___	___
GUSTA MODERADAMENTE	___	___	___	___	___	___
GUSTA LIGERAMENTE	___	___	___	___	___	___
NI GUSTA NI DISGUSTA	___	___	___	___	___	___
DISGUSTA LIGERAMENTE	___	___	___	___	___	___
DISGUSTA MODERADAMENTE	___	___	___	___	___	___
DISGUSTA MUCHO	___	___	___	___	___	___
DISGUSTA EXTREMADAMENTE	___	___	___	___	___	___

¿ A qué sabor asocia el color de cada muestra?

	316	412	218	019	134	202
GROSELLA	___	___	___	___	___	___
FRAMBUESA	___	___	___	___	___	___
FRESA	___	___	___	___	___	___
CEREZA	___	___	___	___	___	___
OTRO (ESPECIFIQUE CUAL)	___	___	___	___	___	___

IV RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA PARTE COMESTIBLE DEL FRUTO DE E. chiotilla.

El análisis bromatológico efectuado a la parte comestible del fruto de E. chiotilla se presenta en el cuadro 2.

CUADRO 2

ANALISIS BROMATOLOGICO DE LA PARTE COMESTIBLE
DEL FRUTO DE E. chiotilla.

<u>ANALISIS</u>	% B. H.
HUMEDAD	84.5
CENIZAS	0.45
PROTEINA CRUDA	0.72
FIBRA CRUDA	0.44
GRASAS	0.37
CARBOHIDRATOS (por diferencia)	13.52

Es necesario hacer notar que las proporciones de los distintos componentes varían de acuerdo con el grado de madurez, edad de la planta, condiciones climatológicas, época del año, etc. (6).

El componente mayoritario en la porción comestible del fruto de E. chiotilla es el agua, mientras que el contenido de proteína cruda es sumamente bajo, por lo que desde ese punto de vista, es un alimento de bajo valor nutritivo.

4.2 IDENTIFICACION DEL TIPO GENERAL DE PIGMENTOS.

El comportamiento de los pigmentos rojos del fruto de E. chiotilla en cromatografía descendente en papel, cromatografía en capa fina y su espectro de --

absorbancia en la región visible (380-620 nm.) indica que probablemente se trata de betacianinas, de acuerdo a los resultados siguientes:

4.2.1 CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL.

Los Rf's de Beta vulgaris y Escontria chiotilla fueron idénticos (Cuadro - 3), lo cual indica la posibilidad de que los pigmentos rojos que contienen ambas plantas sean del mismo tipo (betacianinas, y más específicamente, betanina).

4.2.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Se obtuvo una distribución de Rf's semejante a la de cromatografía descendente en papel. También en este caso los Rf's de Beta vulgaris y Escontria chiotilla resultaron idénticos (Cuadro 4), indicando la misma posibilidad explicada en 4.2.1.

4.2.3. ESPECTRO DE ABSORBANCIA EN LA REGION VISIBLE.

Se obtuvo un espectro de absorbancia semejante al encontrado en la literatura para betalainas (Figura 11), donde el máximo se alcanza alrededor de 538 nm. (longitud de onda de máxima absorbancia de betanina y filocactina, que son betacianinas identificadas en cactáceas (51, 52). El otro máximo de absorbancia alcanzado alrededor de 485 nm. corresponde a la longitud de onda de máxima absorbancia reportado en la literatura para indicaxantina (55, 67).

4.3. PREPARACION DE EXTRACTOS ACUOSOS DE "JIOTILLA"

En el proceso de obtención de extractos acuoso no purificado, y acuoso - purificado-concentrado se obtuvieron los siguientes resultados:

4.3.1 EXTRACTO ACUOSO NO PURIFICADO.

Se utilizaron 480 g. de pulpa de "jiotilla" y un total de 650 ml. de agua destilada y desionizada, para obtener un volumen final de 680 ml. de extracto

acuoso no purificado, con un contenido de 5.8 mg. de betacianinas/100 ml. - -
(cálculo efectuado utilizando $E_{1\%}^{1\text{ cm.}} = 1120$). Cabe señalar que la extracción
del pigmento no fue exhaustiva.

4.3.2 EXTRACTO ACUOSO PURIFICADO-CONCENTRADO.

Se pasaron 120 ml. de extracto acuoso no purificado (5.8 mg. de betaciani-
nas/100 ml.) por una columna de intercambio iónico Dowex AG 50W - X8 de 22.5 X
1.7 cm.,

CUADRO 3

DETERMINACION DE Rf's EN CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EN PAPEL^a

	Rf
<u>Opuntia streptacantha.</u>	0.70
<u>Escontria chiotilla.</u>	0.89
<u>Beta vulgaris.</u>	0.89
<u>Stenocereus montanus.</u>	0.93

^aSistema de eluyentes utilizado: piridina 0.1 M:
ác. fórmico 0.1 M (1:1), dos determinaciones.

CUADRO 4

DETERMINACION DE Rf's EN CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA^a

	Rf
<u>Opuntia streptacantha</u>	0.51
<u>Escontria chiotilla</u>	0.53
<u>Beta vulgaris</u>	0.53
<u>Stenocereus montanus</u>	0.54

^a Sistema de eluyentes utilizado: ac. fórmico: butanol (2.5: 1.5). Dos determinaciones.

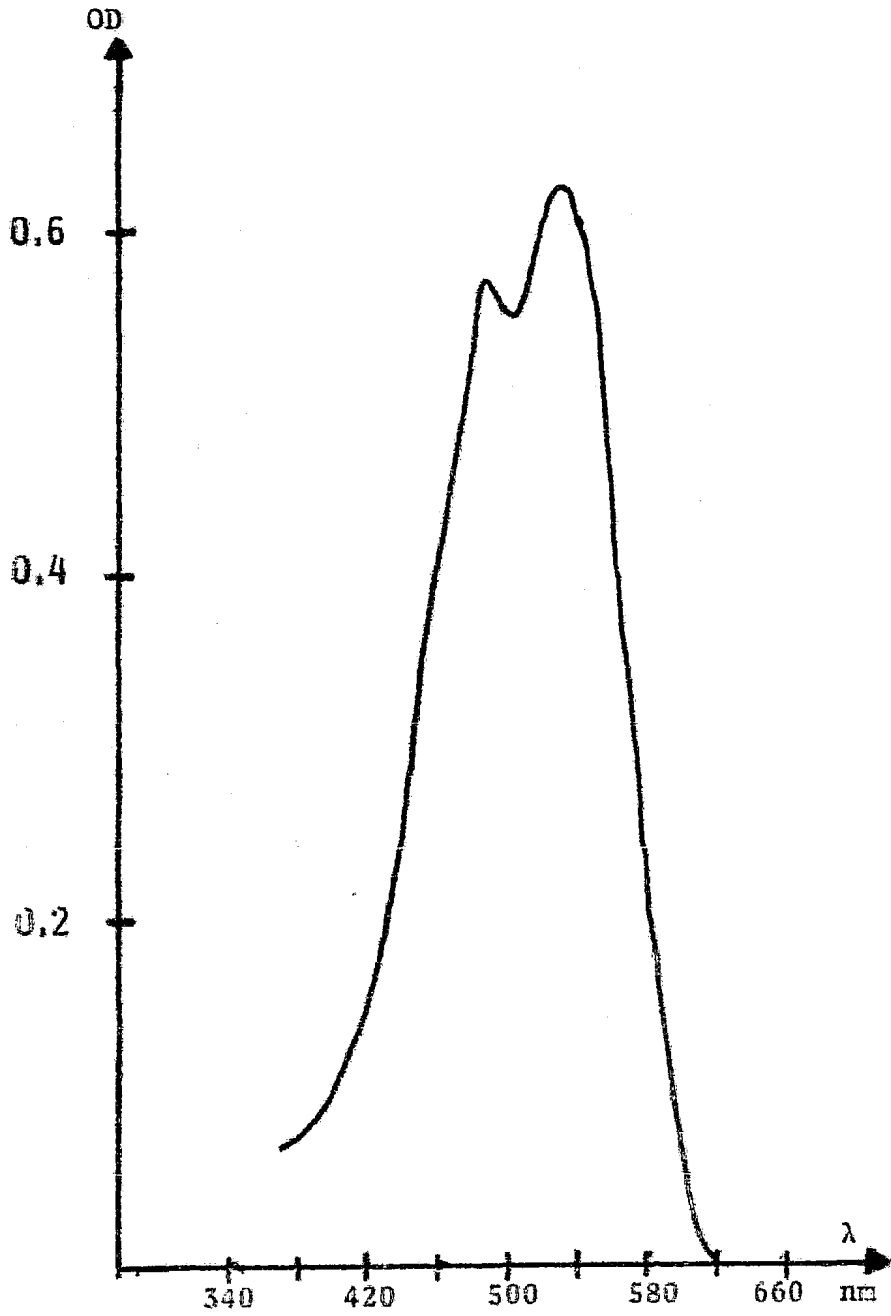


Fig. II Determinación de la longitud de onda máxima. Extracto purificado.

obteniéndose un volumen final de 1000 ml. de extracto purificado con 0.2125 mg. de betacianinas/100 ml., por lo que en esta operación se obtuvo un rendimiento de 30.5%. Aquí es preciso hacer notar que solo se colectaron 1000 ml. de extracto purificado debido a que al final de ellos se obtenía de la columna una solución muy diluida del pigmento, y debido a que posteriormente era necesario efectuar una concentración a presión reducida, se optó por desechar esta fracción diluida, de ahí el rendimiento obtenido.

Los 1000 ml. de extracto purificado se concentraron en rotavapor (30-32°C) a presión reducida hasta un volumen de 60 ml. (3.125 mg. de betacianinas/100 ml.), por lo que durante el proceso de concentración se obtiene una eficiencia de 88.2%.

4.4 DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS DE E. chiotilla.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al determinar el efecto de pH, la temperatura, luz y aire en la estabilidad de los pigmentos rojos de "jiotilla".

4.4.1 EFECTO DEL pH.

Los valores de absorbancia a 538 nm. a diferentes pH's se muestran en los cuadros 5 y 6; ahí se observa que el extracto no purificado presenta una mayor estabilidad a valores de pH entre 4.0 y 5.0, mientras que en el extracto purificado la mayor estabilidad está a valores de pH entre 3.0 y 5.0.

Estos valores de pH de mayor estabilidad concuerdan con los reportados para betanina por Nilsson (44) y Von Elbe et al (73).

CUADRO 5

ABSORBANCIA A $\lambda = 538$ nm. DE SOLUCIONES DE EXTRACTO PURIFICADO-
CONCENTRADO^a, A DIFERENTES VALORES DE pH Y ALMACENADOS A 4°C.

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

	0 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
pH (<u>+ 0.1</u>)	ABSORBANCIA (<u>+0.01</u>)	ABSORBANCIA (<u>+0.01</u>)	ABSORBANCIA (<u>+0.01</u>)
2.0	0.24	0.19	0.15
3.0	0.24	0.21	0.19
4.0	0.25	0.22	0.21
5.0	0.24	0.19	0.18
6.0	0.23	0.17	0.16
7.0	0.22	0.18	0.13
8.0	0.20	0.16	0.12

^a Concentración de betanina = 1.06 mg./100 ml., dos determinaciones.

CUADRO 6

ABSORBANCIA A $\lambda = 538$ nm. DE SOLUCIONES DE EXTRACTO NO PURIFICADO^a
A DIFERENTES VALORES DE pH Y ALMACENADOS A 4°C.

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

	0 DIAS	7 DIAS	14 DIAS
pH (± 0.1)	ABSORBANCIA (± 0.01)	ABSORBANCIA (± 0.01)	ABSORBANCIA (± 0.01)
2.0	0.52	0.40	0.35
3.0	0.55	0.45	0.43
4.0	0.56	0.50	0.48
5.0	0.57	0.53	0.50
6.0	0.57	0.52	0.48
7.0	0.57	0.46	0.43
8.0	0.56	0.45	—

^a Concentración de betacianina = 5.27 mg/100 ml., dos determinaciones.

4.4.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA.

Cuando los extractos, tanto purificado-concentrado, como el no purificado se sometieron a calentamiento, el color rojo disminuyó gradualmente, y en algunas ocasiones aparecieron coloraciones ligeramente café o amarillas, especialmente cuando se trabajó a pH 7.0 con una temperatura elevada.

El Cuadro 7 resume los resultados obtenidos al determinar el efecto de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos rojos del fruto de E. chiotilla.

El coeficiente de correlación fue en todos los casos mayor a 0.9, lo cual señala un buen grado de ajuste de las rectas obtenidas al utilizar los datos experimentales.

La constante de velocidad k se incrementa conforme aumenta la temperatura de calentamiento; además, en el Cuadro 7 se observa que $t_{1/2}$ y D disminuyen — conforme se incrementa la temperatura de tratamiento, todo lo cual indica que el aumento de temperatura tiene un efecto negativo en la estabilidad de los pigmentos rojos en estudio.

Por otra parte, se observa que a pH 5.0 se obtiene la mayor estabilidad a las 3 temperaturas estudiadas (50, 75 y 95°C.)

Los valores Z proporcionan una información más precisa acerca de la estabilidad de los pigmentos rojos, pues resume toda la información obtenida experimentalmente. El Cuadro 8 indica que la mayor estabilidad se obtiene a pH 5.0, y la menor a pH 3.0; así mismo se observa que los extractos no purificados presentan una mayor estabilidad que los purificados-concentrados al mismo pH.

En estas determinaciones no se utilizó extracto no purificado a pH 7.0 — debido a que al someterse a calentamiento se oscurecía (debido quizá a reacciones de oscurecimiento no enzimático) que impedían la determinación de absorbancia a 538 nm.

CUADRO 7

EFECTO DE LA TEMPERATURA A DIFERENTES pH^a.

T°C	Pigmento	r ²	K (min.-1) X10 ³	t _{1/2} (min.)	D (min.)
50° (122°F)	Purificado pH 5.0	0.9971773	1.564	437.64	1472.89
	No purificado pH 5.0	0.9913505	1.670	420.21	1379.62
	Purificado pH 3.0	0.9018054	1.875	231.53	1228.12
	No purificado pH 3.0	0.9822458	3.204	154.70	718.80
	Purificado pH 7.0	0.9954176	3.750	176.87	614.13
75° (167°F)	No purificado pH 5.0	0.9969635	12.058	57.95	190.99
	Purificado pH 5.0	0.9987112	13.595	50.98	169.40
	Purificado pH 3.0	0.9730069	30.027	16.39	76.70
	No purificado pH 3.0	0.9599531	30.632	15.70	75.18
	Purificado pH 7.0	0.9979636	33.548	18.86	68.65
95° (203°F)	No purificado pH 5.0	0.9901555	39.567	18.31	58.21
	Purificado pH 5.0	0.9844685	49.831	14.88	46.22
	Purificado pH 7.0	0.9891429	110.990	6.49	20.75
	No purificado pH 3.0	0.9785653	115.948	3.96	19.86
	Purificado pH 3.0	0.9579665	120.876	3.59	19.05

^a Promedio de dos réplicas.

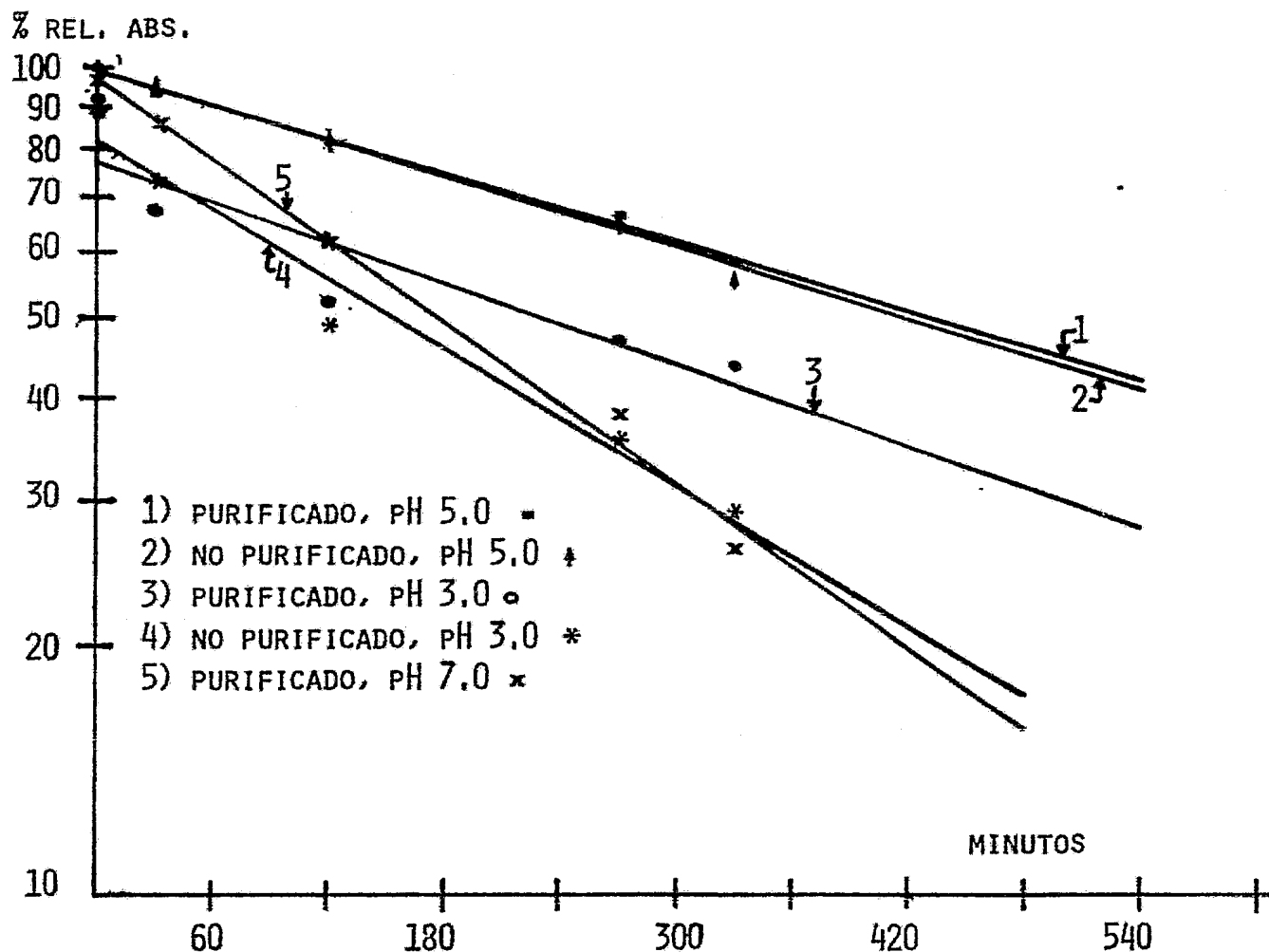


FIG. 12. VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN PARA BETACIANINAS EN EXTRACTOS: PURIFICADO CONC. Y NO PURIFICADO. EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CALENTADO. 50° C.

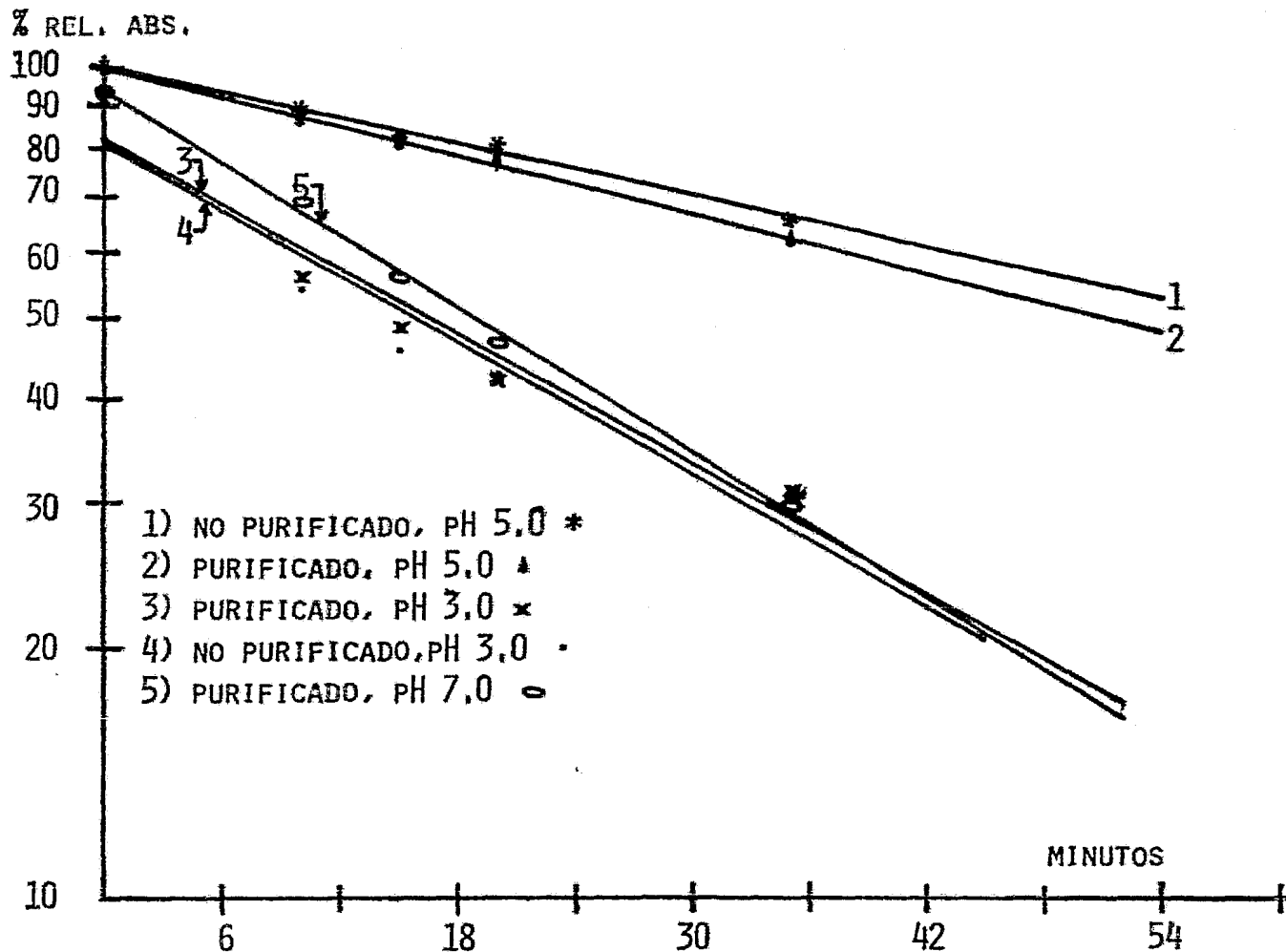


FIG.13 VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN PARA BETACIANINAS,EXTRACTOS: PURIFICADO CONC. Y NO PURIFICADO, EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CALENTADO, 75° C.

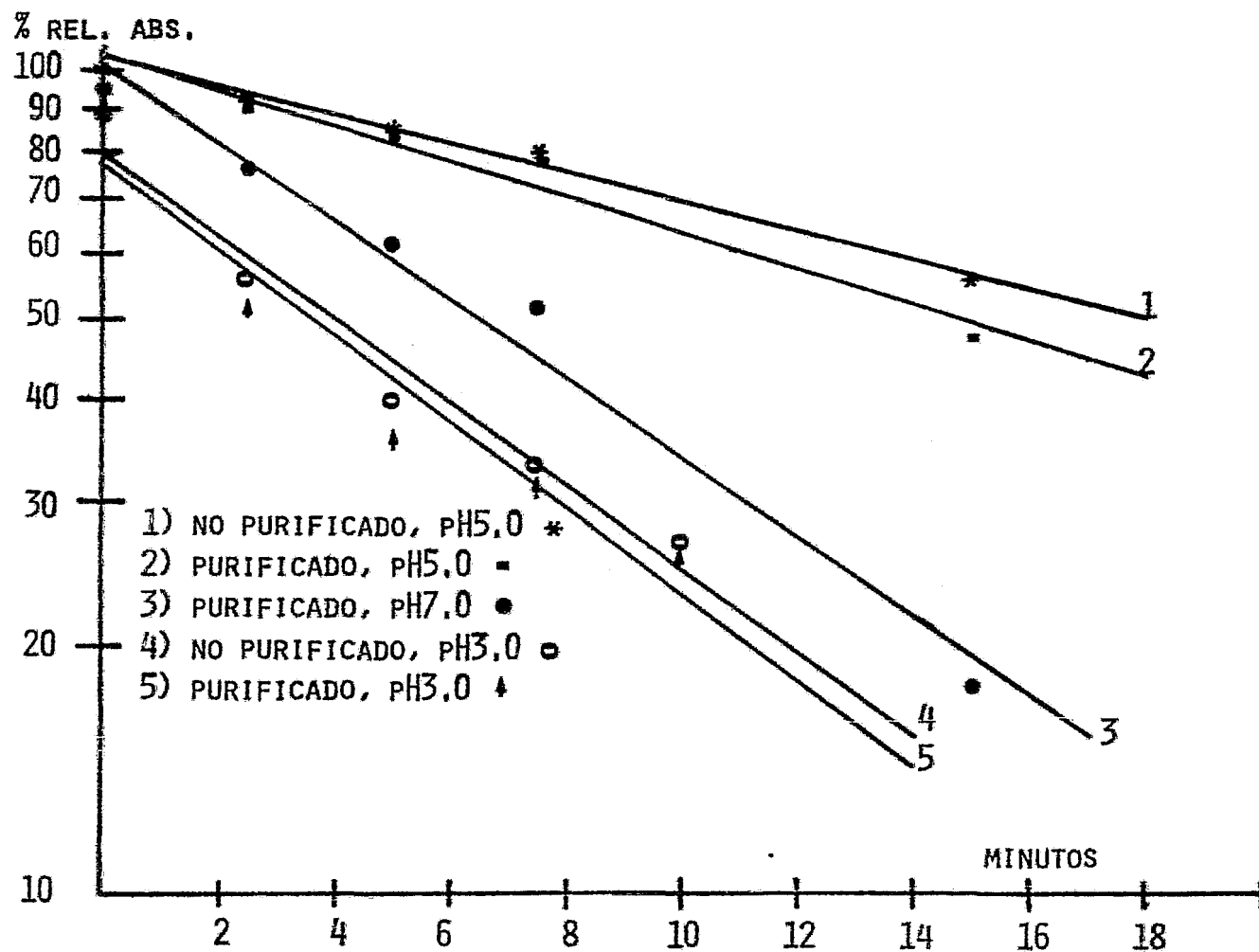


FIG. 14 VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN PARA BETACIANINAS EN EXTRACTOS: PURIFICADO CONC. Y NO PURIFICADO. EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CALENTADO, 95° C.

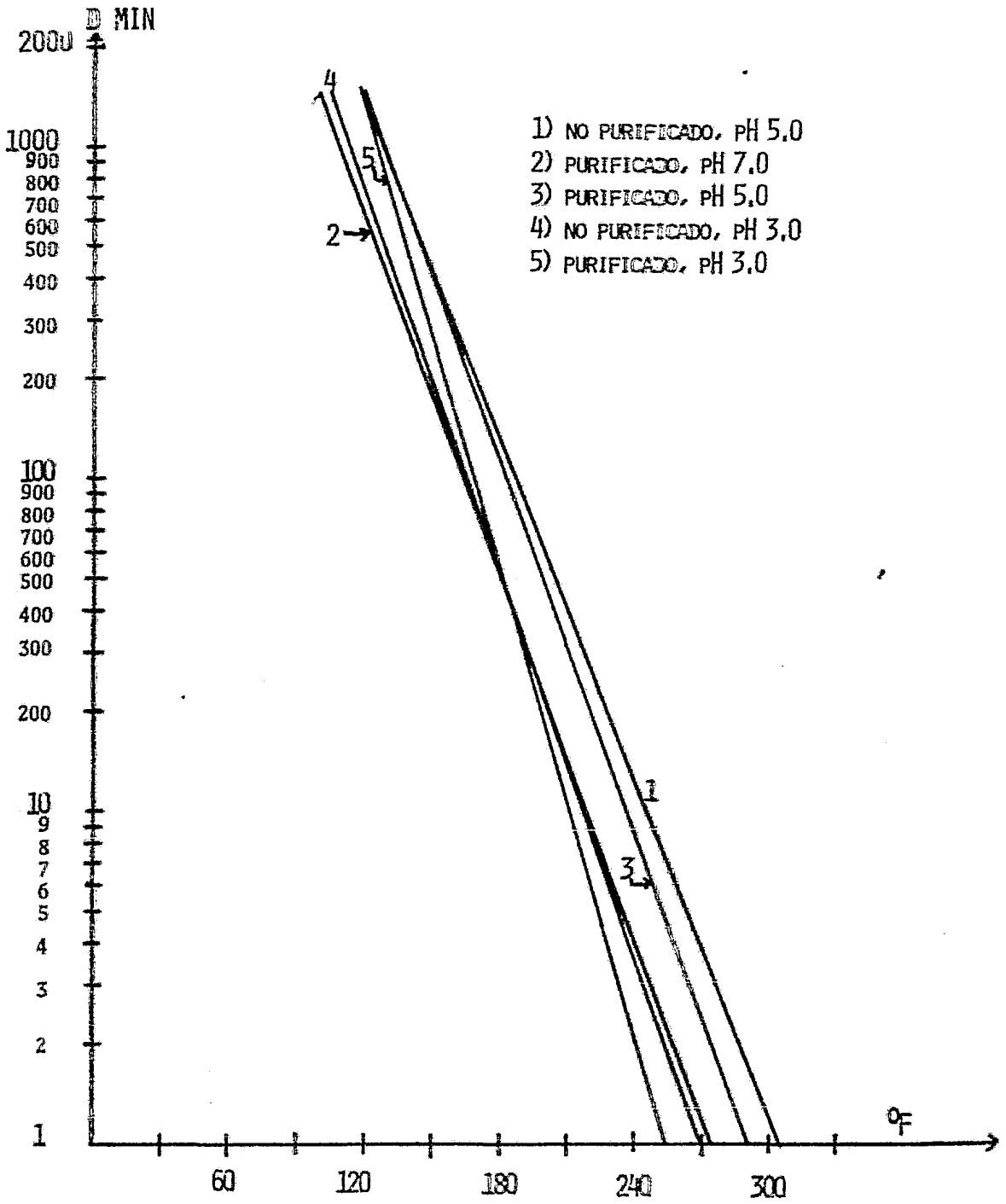


FIG.15 DETERMINACIÓN DE Z.

CUADRO 8 DETERMINACION DE Z:

Pigmentos	r^2	Z (°F)
No purificado pH 5.0	0.9968907	58.619
Purificado pH 7.0	0.9946097	54.687
Purificado pH 5.0	0.9968793	53.605
No purificado pH 3.0	0.9964822	51.690
Purificado pH 3.0	0.9922008	44.407

4.4.3 EFECTO DE LA LUZ Y EL AIRE.

Los cálculos para obtener la constante de velocidad (k), tiempo de vida media ($t_{1/2}$), tiempo de reducción decimal (D) y coeficiente de correlación (r^2) se efectuaron de manera similar a la realizada para determinar el efecto de la temperatura (ver 3.6.2)

Los resultados obtenidos al determinar la influencia de la luz y el aire en la estabilidad de los pigmentos rojos de E. chiotilla se muestran en el cuadro 9. En dicho cuadro se observa lo siguiente:

A pH 3.0 la presencia de luz incrementa la velocidad de degradación (en las condiciones particulares de experimentación) en 3.9%, mientras que la presencia combinada de luz y aire aumenta dicha k en 13.3%.

A pH 5.0 la presencia de luz incrementa k en 24.7%; la acción simultánea de luz y aire aumentan k en 72.6%.

Los resultados anteriores muestran que los pigmentos rojos de E. chiotilla son sensibles a la luz y/o aire, de tal manera que es necesario proteger de estos agentes a productos que tengan este tipo de pigmentos adicionados como colorantes.

CUADRO 9

EFEECTO DE LA LUZ Y AIRE (40°C):

Pigmento	pH	r^2	k (min^{-1}) $\times 10^3$	$t_{1/2}$ (min)	D(min.)
Purif. (Luz y Aire)	5.0	0.9918429	1.400	470.85	1645.475
Purif. (Luz, N ₂)		0.9863224	1.011	659.44	2277.367
Purif. (Osc, N ₂)		0.9761580	0.811	808.36	2839.916
Purif. (Luz y Aire)	3.0	0.9322679	1.014	601.58	2272.093
Purif. (Luz, N ₂)		0.9284115	0.930	665.72	2497.244
Purif. (Osc. N ₂)		0.9593936	0.895	700.88	2573.005

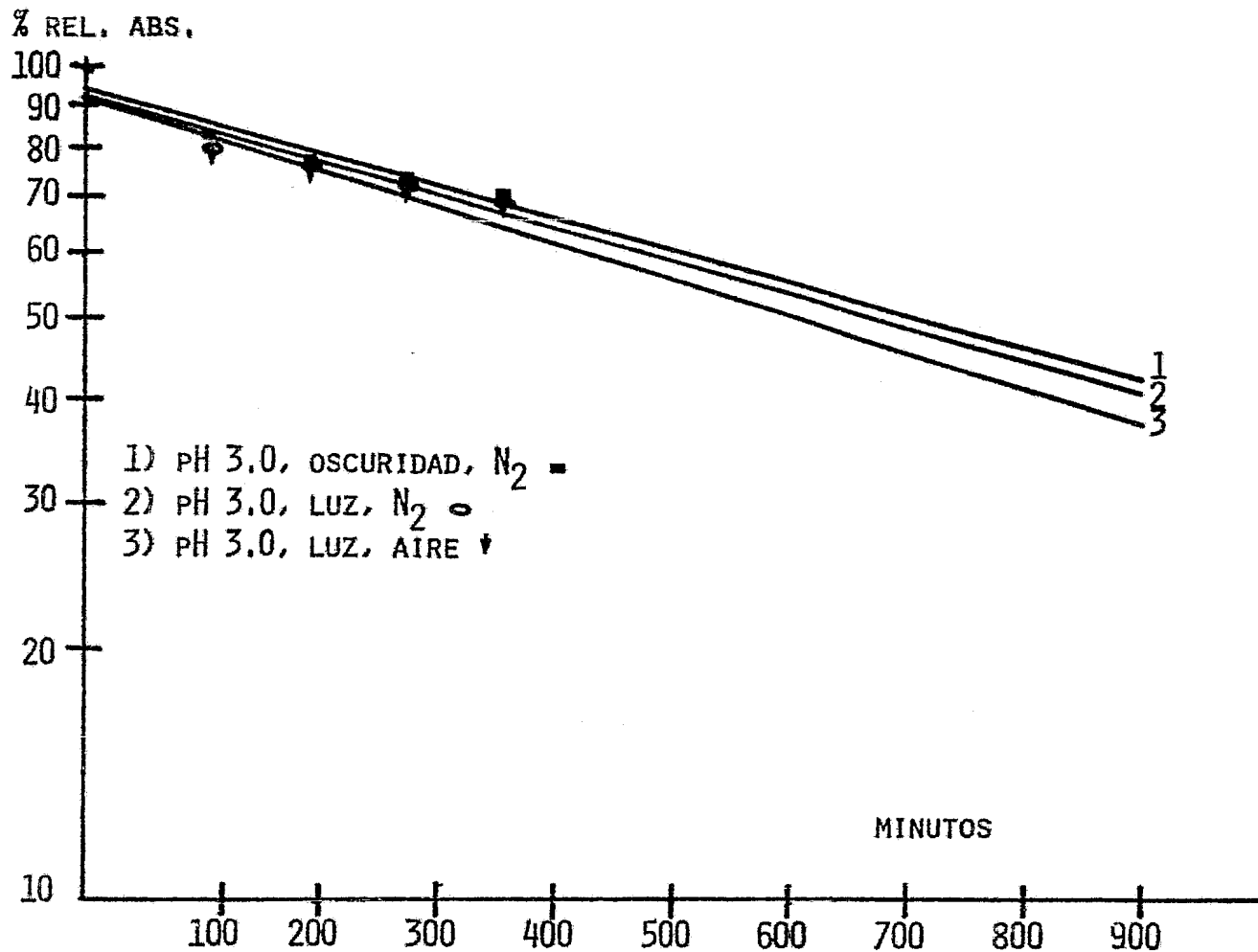


FIG.16 VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN PARA BETACIANINAS. EXTRACTO CONC. PURIFICADO. EN PRESENCIA DE AIRE Y/O LUZ. 40°C.

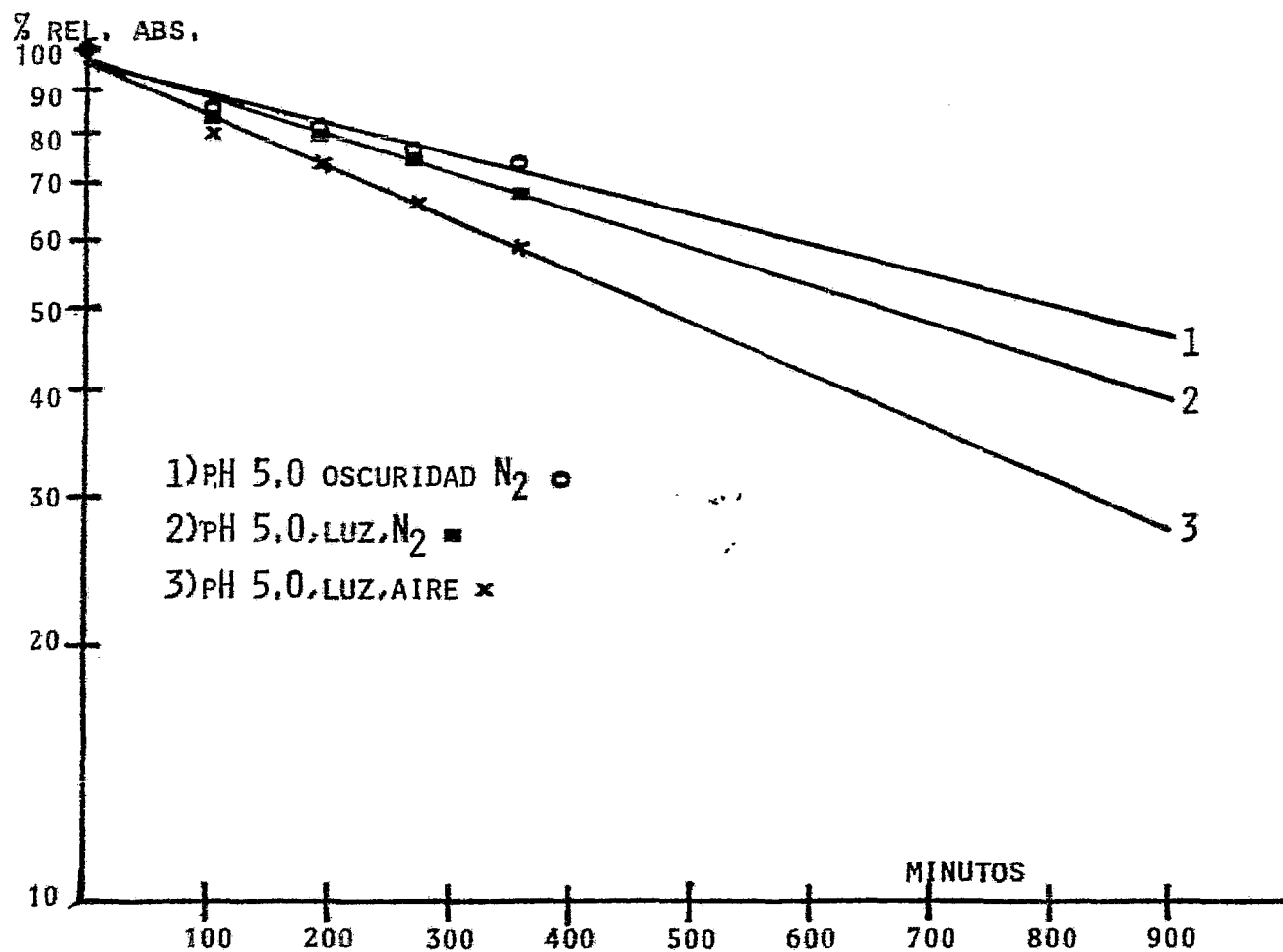


FIG. 17 VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN PARA BETACIANINAS. EXTRACTO CONC. PURIFICADO. EN PRESENCIA DE AIRE Y/O LUZ, 40°C.

4.5 APLICACION DE EXTRACTOS PURIFICADO-CONCENTRADO Y NO PURIFICADO.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al someter a análisis de varianza (32) las calificaciones otorgadas por el panel de prueba a las gelatinas comerciales y a las gelatinas preparadas adicionadas de extracto purificado-concentrado y no purificado (Cuadro 10).

Las gelatinas preparadas utilizando extracto no purificado obtuvieron las calificaciones promedio más altas y a medida que se incrementó la concentración (hasta 10 ppm de betacianinas), las calificaciones promedio también aumentaron.

No existió diferencia significativa al 5% entre las 2 muestras comerciales que obtuvieron más altas calificaciones y las muestras de gelatina preparadas - utilizando extracto no purificado a concentraciones de 7.0 y 10.0 ppm de betacianinas.

Al asociar un sabor específico al color de las gelatinas comerciales, se obtuvieron bajos porcentajes de aciertos, tal como se observa en el Cuadro 11 .

Los sabores que más se asociaron a las gelatinas preparadas con extractos no purificado (que fueron las que obtuvieron calificaciones promedio más altas) fueron GROSELLA, FRAMBUESA y FRESA, por lo que podrían emplearse con éxito este tipo de extractos para impartir color a gelatinas de estos sabores específicos.

CUADRO 10

CALIFICACIONES PROMEDIO OBTENIDAS POR LAS GELATINAS COMERCIALES Y PREPARADAS
AL EVALUAR UNICAMENTE EL COLOR ^a.

	ALMACENAMIENTO A 4°C		
	3 días	7 días	14 días
GROSELLA MARCA 1	5.73	5.13	6.00
FRAMBUESA MARCA 1	5.53	5.53	6.30
CEREZA MARCA 1	5.27	4.80	5.50
FRESA MARCA 1	5.60	5.06	5.00
CEREZA MARCA 2	7.33 m	7.40 n	7.30 r
FRESA MARCA 2	7.93 m	7.20 n	7.50 r
EXTRACTO PURIF-CONC. (3ppm betacianinas)	5.40	5.93	4.60
EXTRACTO PURIF-CONC. (6ppm betacianinas)	6.00	6.67	5.60
EXTRACTO PURIF-CONC. (9ppm betacianinas)	6.40	7.20 n	6.20
EXTRACTO NO PURIF. (3.5ppm betacianinas)	5.27	4.53	6.30
EXTRACTO NO PURIF. (7.0ppm betacianinas)	7.20 m	6.87 n	7.10 r
EXTRACTO NO PURIF. (10.0ppm betacianinas)	8.00 m	7.73 n	7.70 r

^a Calificaciones promedio otorgadas por un grupo de 15 jueces no entrenados
9 = máxima calificación, 1 = mínima.

NOTA: No existe diferencia significativa al 5% entre muestras seguidas por la misma letra

CUADRO 11

% DE ACIERTOS DEL PANEL DE PRUEBA^a AL ASOCIAR EL SABOR AL COLOR DE GELATINAS
COMERCIALES.

GROSELLA MARCA 1	13.33% (2 de 15 jueces)
FRAMBUESA MARCA 1	26.67% (4 de 15 jueces)
CEREZA MARCA 1	6.67% (1 de 15 jueces)
FRESA MARCA 1	26.67% (4 de 15 jueces)
CEREZA MARCA 2	20.00% (3 de 15 jueces)
FRESA MARCA 2	26.67% (4 de 15 jueces)

^a El panel de prueba integrado por un total de 15 jueces no entrenados.

CUADRO 12

SABOR ASOCIADO AL COLOR DE GELATINAS DESPUES DE 3 DIAS
DE PREPARADAS^a.

	GROSELLA	CEREZA	FRAMBUESA	FRESA	DURAZNO*	MANZANA*	NARANJA*	INDEFINIDO	OTROS
EXTRACTO PURIF-CONC. (3ppm betacianinas)	-	-	-	-	73.3%	6.7%	13.3%	-	6.7%
EXTRACTO PURIF-CONC. (6ppm betacianinas)	-	-	-	6.7%	26.7%	6.7%	26.7%	-	33.3%
EXTRACTO PURIF-CONC. (9ppm betacianinas)	-	13.3%	26.7%	20%	-	-	6.7%	20%	20%
EXTRACTO NO PURIF. (3.5ppm betacianinas)	6.7%	6.7%	6.7%	25.7%	-	-	-	-	53.3%
EXTRACTO NO PURIF. (7.0ppm betacianinas)	33.3%	6.7%	26.7%	40%	-	-	-	-	-
EXTRACTO NO PURIF. (10.0ppm betacianinas)	53.3%	13.3%	40%	20%	-	-	-	-	-

^a % de un grupo de 15 jueces que asociaron un sabor determinado a las muestras preparadas de gelatinas añadidas de extractos purificado-concentrado y no purificado.

NOTA: La suma de % no tiene que resultar necesariamente igual a 100%, pues algunos jueces señalaron 2 ó más sabores para cada muestra.

* Las gelatinas preparadas con extractos rojos presentaron cierta coloración amarilla.

V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

1.- Las regulaciones para aditivos alimentarios permitidos en México que se encuentran en el Reglamento para Aditivos ya son absolutas, pues fueron publicadas en el Diario Oficial de 15 de febrero de 1958, por lo que es necesario actualizar dicho reglamento tomando en cuenta las últimas investigaciones toxicológicas realizadas en esta área.

2.- El componente mayoritario en la porción comestible del fruto de E. chiotilla es el agua, mientras que el contenido de proteína cruda es sumamente bajo, por lo que desde ese punto de vista, es un alimento de bajo valor nutritivo.

3.- El comportamiento de los pigmentos rojos del fruto de E. chiotilla en cromatografía descendente en papel, cromatografía en capa fina y su espectro de absorbancia en la región visible (380-620 nm) indica la posibilidad de que se trate de BETACIANINAS; para poder afirmarlo con certeza sería necesario efectuar otros análisis, tales como electroforesis, cromatografía en columna de poliamida, obtención del espectro de absorbancia en la región IR y UV, así como la utilización del método de RMN.

4.- Se obtuvieron extractos acuosos no purificado y purificado-concentrado con concentraciones de 5.8 mg/100 ml. y 3.125 mg/100 ml. respectivamente, los cuales fueron utilizados para efectuar determinaciones de estabilidad al pH, temperatura, luz y aire, y para elaborar gelatinas.

5.- El extracto no purificado presentó una mayor estabilidad a valores de pH entre 4.0 y 6.0, mientras que en el extracto purificado-concentrado la mayor estabilidad estuvo a valores de pH entre 3.0 y 5.0.

6.- Se observó que un incremento de temperatura presenta efectos nocivos en la estabilidad de los pigmentos rojos en estudio; así por ejemplo, a 50°C y pH 5.0, el extracto no purificado presentó una constante de velocidad de $1.67 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, una $D = 1379.62 \text{ min.}$ y un $t_{1/2} = 420.21 \text{ min.}$ mientras que ese mismo extracto no purificado, a pH 5.0 pero a 95°C presentó una $k = 39.56 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, una $D = 58.21 \text{ min.}$ y un $t_{1/2} = 18.31 \text{ min.}$ Los demás extractos considerados presentaron una tendencia similar al estudiar el efecto de la temperatura, tal como se indica en los resultados (ver 4.4.2).

7.- La luz y el aire tienen un efecto nocivo en la estabilidad de los pigmentos rojos de E. chiotilla, siendo el efecto del oxígeno del aire más adverso que la luz, es por esto que se recomienda proteger de estos agentes a productos que tengan este tipo de pigmentos adicionados como colorantes. (ver 4.4.3).

8.- Las gelatinas adicionadas con extracto no purificado obtuvieron mejores calificaciones del panel de prueba que aquellas a las que se les añadió extracto purificado-concentrado. Las muestras con calificaciones más altas fueron las que contenían 10ppm de betacianinas procedentes de extracto no purificado.

9.- De acuerdo a los análisis de varianza efectuados no existió diferencia significativa entre las muestras de gelatinas comerciales que obtuvieron mayor calificación y las muestras de gelatinas preparadas adicionadas con extracto no purificado que a su vez obtuvieron las calificaciones más altas; es decir, el grupo de jueces no detectó diferencia entre gelatinas comerciales y gelatinas preparadas cuando se utilizó extracto no purificado (solo se evaluó color).

10.- Se obtuvieron bajos porcentajes de aciertos al asociar el color al sabor señalado por los fabricantes de gelatinas comerciales; en el caso de extracto no purificado los sabores que más se asociaron a el color fueron grosella, frambuesa y fresa. (ver Cuadros 11 y 12).

11.- Considerados en conjunto, los resultados obtenidos indican que es factible la utilización de los pigmentos rojos de E. chiotilla como colorante de alimentos, tales como gelatinas, por lo que se recomienda que se realicen otros estudios similares a éste, utilizando otros alimentos en los cuales pueda tener éxito la aplicación de este tipo de extractos, tales como mermeladas, salchichas, yoghurt, entre otros; así mismo, podría efectuarse una fermentación de extractos no purificados del fruto de E. chiotilla con microorganismos adecuados de la misma manera que se ha realizado con extractos de betabel - - (2,70), con la finalidad de eliminar azúcares e intensificar la coloración de los pigmentos, así como eliminar el sabor característico del fruto.

VI. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Acheson, R.M., "An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds", 3rd edition, New York (1976) Pag. 337-342, 211, 212.
- 2.- Adams, J.P., von Elbe, J.H. and Amundson, C.H., "Production of betacyanine concentrate by fermentation of red beet juice with Candida utilis", J. of Food Science 41: 78-81, 1976.
- 3.- Adams, J.P. and von Elbe, J.H. "Betanine separation and quantification by chromatography on gels", J. of Food Science 42(2): 410-414, 1977
- 4.- Bilyk, A. "Extractive fractionation of betalaines", J. of Food Science 44: 1249-1251, 1979.
- 5.- Botma, Y; Food Color control in 21 nations; Food Engineering, May 1974, pag. 81-83.
- 6.- Bravo-Hollis, H., "Las Cactáceas de México", 2da. edición, UNAM, 1978.
- 7.- Büchi, G.; Fliri, H. and Shapiro, R., "Synthesis of betalains"; J. Org. Chem. 43 (25): 4765-4769, 1978.
- 8.- Buckmire, R.E. and Francis, F.J., "Anthocyanins and flavonols of miracle fruit, Synsepalum dulcificum, Schum."; J. of Food Science 41:1363-1365, 1976
- 9.- Clydesdale, F.M.; Main, J.H.; Francis, F.J. and Damonjr, R.A. "Concord grape pigments as colorants for beverages and gelatin desserts"; J. of Food Science 43: 1687-1692, 1978.
- 10.- Cruse, R.; Lime, B. and Hensz, R. "Pigmentation and color comparison of ruby grapefruit juice"; J. Agric. Food Chem. 27 (3): 641-642, 1979.
- 11.- Chiriboga, C.D. and Francis, F.J. "Ion exchange purified anthocyanin pigments as a colorant for cranberry juice cocktail"; J. of Food Science 38: 464-467, 1973.
- 12.- Dreiding, A.S. "Recent developments in the chemistry of natural phenolic compounds", Pergamon Press, London, 1961, p. 194 (citado en Piattelli and Minale, Phytochemistry 3:547-557, 1964.
- 13.- Driver, M.G. and Francis, F.J. "Stability of phytolactanin, betanin and FD&C Red #2 in dessert gels"; J. of Food Science 44 (2): 518-520, 1979.
- 14.- Driver, M.G. and Francis, F.J. "Purification of phytolactanin (betanin) by removal of phytolaccatoxin from Phytolacca americana"; J. of Food Science 44 (2): 521-523, 1979.
- 15.- Du, C.F. and Francis, F.J. "Anthocyanins of roselle (Hibiscus sabdariffa, L.)" J. of Food Science 38:810-812, 1973.
- 16.- Escamilla, T. "Proyecto para la industrialización de la tama", Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM. 1977.

- 17.- FDA 1980 "FD&C Red #2. Denial of petition for permanent listing, Final Decision"; Food and Drug Administration, Federal Register, Jan 25, p. 6252.
- 18.- Fennema, OR. "Principles of Food Science" (Food Chemistry); Marcel Dekker Inc., New York, 1976.
- 19.- Food Colors, Food Technology, July 1980, p. 77-84
- 20.- Fuleki, T. and Francis, F.J. "Quantitative Methods for Anthocyanins. 3. Purification of cranberry anthocyanins"; J. of Food Science 33:266-274, 1968.
- 21.- Fuleki, T. and Francis, F.J. "Quantitative Methods for Anthocyanins. 4. Determination of individual anthocyanins in cranberry and cranberry products"; J. of Food Science 33:471-478, 1968.
- 22.- Furia, T. "Handbook of Food Additives", published by PRESS, 2nd edition; Cleveland, Ohio, 1975.
- 23.- Goodwin, T.W. "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol. I"; Academic Press, New York, 1976.
- 24.- Hall, R.L. "Flavor research and food acceptance". Reinhold Pub. corp. New York, 1958, pag 224 (citado en Food Colors, Food Technology, July 1980, P. 77-84).
- 25.- Herman, von K. und Dreiding, A.S. "Total Synthese von batalainen"; Helvetica Chimica Acta 58(6): 1805-1808, 1975.
- 26.- Hesse, B.C. "Coal-tar colors used in food products"; Bull. USDA Washington D.C., 1962 (citado en Weissler, A. "FDA regulations of Food Colors", Food Technology, May 1975, pag. 38,46.)
- 27.- Hixson, S. and Tausta, J. "A Synthesis of betalamic acid"; J. Org. Chem. 42(12):2192-2194, 1977.
- 28.- Health Protection Branch "Canadian position on the food color Amaranth" News Release, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, Ottawa, Feb 2, 1976.
- 29.- Herrera, A. "Propiedades colorantes del jugo de la tuna en líquido y en polvo, Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM, 1982.
- 30.- Hrazdina, G. "Column chromatographic isolation of the antocyanidin-3,5-diglucosides from grapes"- J. of Food Chem. 18(2):243-245,1970.
- 31.- Kostyla, A.S. and Clydesdale, F.M. "The psychophysical relationships between color and flavor"; CRC Critical Reviews. CRC Press. Boca Raton, Fla., 1978 (citado en Food Colors, Food Technology, July 1980, p. 77-84).
- 32.- Kramer A. and Twigg, B. "Quality control for the food industry", 3rd edition, Vol. 1, The AVI publishing Co. Inc.; Westport, Connecticut, 1970.

- 33.- Lashley, D. and Wiley, R.C. "A betacyanine decolorizing enzyme found in red beet tissue"; J. of Food Science 44:1568-1569, 1979.
- 34.- Lees, D.H. and Franas, F.J. "Quantitative Methods for Anthocyanins. 6. Flavonols and Anthocyanins in cranberries", J. of Food Science 36:1056-1059, 1971.
- 35.- Lin, R. and Hilton, B. "Purification of commercial grape pigment"; J. of Food Science 45:297-306, 1980.
- 36.- Mabry, T.J. and Dreiding, A.S. "Recent advances in Phytochemistry", Vol. 1 Appleton-Century-Crofts, New York, 1968, p. 145-160.
- 37.- Mabry, T.J.; Taylor, A. and Turner B.L. "The betacyanins and their distribution"; Phytochemistry 2:61-64, 1963.
- 38.- Main, T.H.; Clydesdale, F.M. and Francis, F.J. "Spray drying anthocyanin concentrates for use as Food Colorants"; J. of Food Science 43:1693-1694, 1697, (1978).
- 39.- MacIlvaine; Preparation of Buffers; J. Biol. Chem. 49:183, 1921.
- 40.- Mc Lellan, M.R. and Cash, J.N. "Application of anthocyanins as colorants for maraschino-type cherries"; J. of Food Science 44 (2):483-487, 1979.
- 41.- Merck Index, Published by Merck & Co., Inc. 9th edition; Rahway, N.J., U.S.A. 1976
- 42.- Minale, L.; Piattelli, M. and di Stefano, S. "Pigments of Centrospermae. VII. Betacyanins from Gomphrena globosa L."; Phytochemistry 6:703-709, 1967.
- 43.- Nagle, B.J.; Villalon, B. and Burns, E.E. "Color evaluation of selected capsicums"; J. of Food Science 44 (2): 416-418, 1979
- 44.- Nilsson, T. "Studies into the pigments in beet-root"; Lantbrukshogskolans Annaler 36:179-219, 1970 (citado en von Elbe, J.H.; Siok Hui Sy and II Young Maing. "Quantitative analysis of betacyanins in red table beets Beta vulgaris"); J. of Food Science 37:932-934, 1972.
- 45.- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytic Chemists, 11th edition; Washington, D.C. USA (1970).
- 46.- Palamidis N. and Markakis, P. "Stability of grape anthocyanin in a carbonated beverage"; J. of Food Science 40:1047-1049, 1975.
- 47.- Pasch, J.H. and von Elbe, J.H.; "Betanine degradation as influenced by water activity"; J. of Food Science 40:1145-1146, 1975.
- 48.- Pasch, J.H. and von Elbe, J.H. "Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants or sequestrants"; J. of Food Science 44(1):72-74, 81, (1979).
- 49.- Philip, T. "Anthocyanins of beauty seedless grapes"; J. of Food Science 39:449-451, 1974.

- 50.- Philip, T. "An anthocyanin recovery system from grape wastes"; *J. of Food Science* 39:859, 1974.
- 51.- Piattelli, M. and Imperato, F. "Betacyanins of the family Cactaceae"; *Phytochemistry* 8:1503-1507, 1969.
- 52.- Piattelli, M. and Minale, L. "Pigments of Centrospermae. I. Betacyanins from Phyllocactus hybridus Hort. and Opuntia ficus-indica Mill."; *Phytochemistry* 3:307-311, 1964.
- 53.- Piattelli, M. and Minale, L. "Pigments of Centrospermae. II. Distribution of betacyanins"; 3:547-557, 1964.
- 54.- Piattelli, M. and Prota, G. "Pigments of Centrospermae. III Betaxanthins from Beta vulgaris L."; *Phytochemistry* 4:121-125, 1965.
- 55.- Piattelli, M.; Minale, L. and Prota, G. "Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin"; *Tetrahedron* 20:2325-2329, 1964.
- 56.- Ramírez, G. "Perspectivas de la utilización del nopal y la tuna"; Tesis Profesional; Facultad de Química, UNAM. 1981.
- 57.- Reglamento de Aditivos para Alimentos, publicado en el Diario Oficial de 15 de Febrero de 1958, México.
- 58.- Saguy, Kopelman and Mizrahi. "Thermal Kinetic degradation of betanin and betalamic acid"; *J. Agric. Food Chem.* 26 (2) :360-362, 1978.
- 59.- Saguy, Kopelman and Mizrahi "Computer-aided determination of beet pigments", *J. of Food Science* 43:124-127, 1978.
- 60.- Saguy, I. "Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin I). Influence of pH and temperature"; *J. of Food Science* 44:1554-1554, 1979.
- 61.- Sakellariades, H.C. and Loh, B.S. "Anthocyanins in barbera grapes"; *J. of Food Science* 39:329-333, 1974.
- 62.- Sapers, G.M. and Hornstein, J. S. "Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments"; *J. of Food Science* 44:1245-1248, 1979.
- 63.- Stenlid, G. "Physiological effects of betalains upon higher plants"; *Phytochemistry* 15:661-663, 1976.
- 64.- Segurajauregui, J.; Apuntes de la clase de Ingeniería Industrial II; Facultad de Química, UNAM, 1981.
- 65.- Symposium: "Utilization of Plant Pigments"; *Food Technology*, May 1975, p. 38-54.
- 66.- Tannahill, R. "Food in History", Stein and Day, New York, 1973 (citado en "Food Colors", *Food Technology*, July 1980, p. 77-84.
- 67.- Valadez, S.; Valadez, A. y Chatelan, Utilización de los pigmentos de la tuna cardona como posibles colorantes alimentarios. S. Fruticultura Mexicana, N° 15-18, 1979.

- 68.- van Buren, J.P.; Hrazdina, G. and Robinson, W. B. "Color of anthocyanin solutions expressed in lightness and chromaticity terms.-Effect of pH and type of anthocyanin"; J. of Food Science 39:325-328, 1974.
- 69.- Viades, J. "Colorantes que se consideran nocivos a la salud humana"; Tesis Profesional; Facultad de Química, UNAM. 1977.
- 70.- Villegas, L. "Estudio de los colorantes del betabel (Beta vulgaris)"; Tesis profesional; Facultad de Química, UNAM. 1979.
- 71.- Vicent, K. and Scholz R. "Separation and quantification of red beet betacyanins and betaxanthins by high-performance liquid chromatography"; J. Agric. Food Chem. 26 (4) :812-816, 1978.
- 72.- von Elbe, J.H.; Klement, J.T.; Amundson, C.H.; Cassens, R.G. and Lindsay, R.C. "Evaluation of betalain pigments as sausage colorants"; J. of Food Science 39:128-132, 1974.
- 73.- von Elbe, J.H.; Maing- I.Y. and Amundson, C.H. "Color stability of betalain" J. of Food Science 39:334-337, 1974.
- 74.- von Elbe, J.H.; Sy, S.H.; Maing, I.Y. and G., W.H.; "Quantitative analysis of betacyanins in red table beet (Beta vulgaris)", J. of Food Science 37:932-934, 1972.
- 75.- Weissler, A. "FDA regulation of Food Colors"; Food Technology, May 1975., p. 38, 46.
- 76.- Wilcox, von M.E.; Wyler, H.; Mabty, T.J. und Dreiding, A.S. "Die Struktur des betanins"; Helvetica chimica Acta 48 (1) :252-258, 1965
- 77.- Wiley, R.; Lee, Y.N.; Saladini, J.; Wyss, R.C. and Topalian, H.H. "Efficiency studies of a continuous diffusion apparatus for the recovery of betalaines from the red table beet"; J. of Food Science 44(1):208-212, 1979.
- 78.- Williams, M. and Hrazdina, G. "Anthocyanins as Food Colorants: Effects of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes"; J. of Food Science 44(1):66-68, 1979.
- 79.- Woo, A.H.; von Elbe, J.H. and Amundson, C.H. "Anthocyanin recovery from cranberry pulp wastes by membrane technology"; J. of Food Science 45:875-879, 1980.
- 80.- Wyler, H. and Dreiding, Betaxanthins A.S. Experientia 17:23, 1961

APENDICE A

VALORES DE ABSORBANCIA A 538 nm OBTENIDOS AL DETERMINAR
EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE LOS
PIGMENTOS ROJOS DE E. chiotilla

1) TEMPERATURA = 50°C

ABS. a $\lambda = 538$ nm.

	t=0	t=0.5hrs.	t=2.0hrs.	t=4.5hrs.	t=5.5hrs.
EXTRACTO PURIF. (1) pH 3.0	0.67	0.53	0.39	0.35	—
EXTRACTO PURIF. (2) pH 3.0	0.69	0.47	0.38	0.35	0.325
EXTRACTO PURIF. (1) pH 5.0	0.74	0.69	0.605	0.485	0.43
EXTRACTO PURIF. (2) pH 5.0	0.74	0.69	0.61	0.50	0.43
EXTRACTO PURIF. (1) pH 7.0	0.70	0.63	0.46	0.28	0.19
EXTRACTO PURIF. (2) pH 7.0	0.715	0.65	0.46	0.285	0.20
EXTRACTO NO PURIF. (1) pH 3.0	0.54	0.43	0.28	0.21	0.175
EXTRACTO NO PURIF. (2) pH 3.0	0.55	0.445	0.28	0.22	0.175
EXTRACTO NO PURIF. (1) pH 5.0	0.61	0.58	0.50	0.41	0.34
EXTRACTO NO PURIF. (2) pH 5.0	0.59	0.57	0.49	0.40	0.33

2) TEMPERATURA = 75°C

ABS. a $\lambda = 538$ nm.

	t=0	t=10min.	t=15min.	t=20min.	t=35min.
EXTRACTO PURIF. (1) pH 3.0	0.68	0.49	0.425	0.345	0.235
EXTRACTO PURIF. (2) pH 3.0	0.68	0.34	0.30	0.28	0.225
EXTRACTO PURIF. (1) pH 5.0	0.74	0.645	0.60	0.57	0.455
EXTRACTO PURIF. (2) pH 5.0	0.74	0.64	0.60	0.575	0.46
EXTRACTO PURIF. (1) pH 7.0	0.70	0.515	0.38	0.285	0.185
EXTRACTO PURIF. (2) pH 7.0	0.705	0.51	0.44	0.405	0.255
EXTRACTO NO PURIF. (1) pH 3.0	0.56	0.32	0.27	0.255	0.18
EXTRACTO NO PURIF. (2) pH 3.0	0.55	0.32	0.27	0.25	0.18
EXTRACTO NO PURIF. (1) pH 5.0	0.596	0.53	0.495	0.48	0.39
EXTRACTO NO PURIF. (2) pH 5.0	0.59	0.53	0.49	0.475	0.385

3) TEMPERATURA = 95°C

ABS. a $\lambda = 538 \text{ nm.}$

	t=0	t=2.5min.	t=5.0min.	t=7.5min.	t=10min.	t=15min.
EXTRACIO PURIF. (1) pH 3.0	0.69	0.38	0.26	0.235	0.20	-
EXTRACIO PURIF. (2) pH 3.0	0.71	0.405	0.285	0.245	0.195	-
EXTRACIO PURIF. (1) pH 5.0	0.765	0.705	0.635	0.59	-	0.365
EXTRACIO PURIF. (2) pH 5.0	0.77	0.71	0.65	0.605	-	0.365
EXTRACIO PURIF. (1) pH 7.0	0.73	0.595	0.495	0.41	-	0.14
EXTRACIO PURIF. (2) pH 7.0	0.725	0.57	0.455	0.38	-	0.135
EXTRACIO NO PURIF. (1) pH 3.0	0.55	0.34	0.24	0.20	0.165	-
EXTRACIO NO PURIF. (2) pH 3.0	0.545	0.35	0.25	0.21	0.17	-
EXTRACIO NO PURIF. (1) pH 5.0	0.63	0.59	0.54	0.505	-	0.35
EXTRACIO NO PURIF. (2) pH 5.0	0.615	0.57	0.53	0.495	-	0.34

APENDICE B

VALORES DE ABSORBANCIA A 538 nm OBTENIDOS AL DETERMINAR EL EFECTO DE LA LUZ Y EL AIRE (A 40°C) EN LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS ROJOS DE E. chiotilla.

ABS. a $\lambda = 538$ nm.

	t=0	t=105min.	t=195min.	t=270min	t=360min.
pH 3.0, LUZ, AIRE (1)	0.57	0.46	0.43	0.41	0.392
pH 3.0, LUZ, AIRE (2)	0.57	0.435	0.415	0.40	0.38
pH 3.0, LUZ, N ₂ (1)	0.565	0.445	0.435	0.415	0.40
pH 3.0, LUZ, N ₂ (2)	0.575	0.47	0.435	0.415	0.40
pH 3.0, OSC, N ₂ (1)	0.565	0.47	0.44	0.41	0.39
pH 3.0, OSC, N ₂ (2)	0.57	0.475	0.45	0.44	0.42
pH 5.0, LUZ, AIRE (1)	0.58	0.47	0.43	0.38	0.345
pH 5.0, LUZ, AIRE (2)	0.575	0.465	0.415	0.385	0.345
pH 5.0, LUZ, N ₂ (1)	0.58	0.49	0.46	0.435	0.395
pH 5.0, LUZ, N ₂ (2)	0.58	0.49	0.46	0.435	0.397
pH 5.0, OSC, N ₂ (1)	0.575	0.495	0.475	0.445	0.425
pH 5.0, OSC, N ₂ (2)	0.575	0.495	0.475	0.445	0.425

NOTA: Únicamente se utilizó extracto purificado para estas determinaciones.

APENDICE C

CALIFICACIONES OTORGADAS A LAS MUESTRAS COMERCIALES DE GELATINAS, AL EVALUAR UNICAMENTE EL COLOR*.

1) TIEMPO = 3 DIAS.

MUESTRAS COMERCIALES.

JUEZ	GROSELLA MARCA (1)	FRAMBUESA MARCA (1)	CEREZA MARCA (1)	FRESA MARCA (1)	CEREZA MARCA (2)	FRESA MARCA (2)	SUMA DE JUECES.
1	4	4	4	5	8	9	34
2	7	6	6	7	9	9	44
3	5	5	5	5	6	8	34
4	8	7	7	7	9	7	45
5	7	7	7	5	8	7	41
6	5	6	4	4	6	8	33
7	6	7	7	3	4	7	34
8	6	6	6	7	9	7	41
9	3	3	3	4	8	8	29
10	6	4	7	8	7	8	40
11	6	7	4	6	8	8	39
12	6	6	5	4	6	7	34
13	6	6	6	7	8	8	41
14	6	3	3	5	7	9	33
15	5	6	5	7	7	9	39
SUMA DE MUESTRAS	86	83	79	84	110	119	561
\bar{X}	5.73	5.53	5.26	5.6	7.33	7.93	

2) TIEMPO = 7 DIAS

MUESTRAS COMERCIALES.

JUEZ	GROSELLA MARCA (1)	FRAMBUESA MARCA (1)	CEREZA MARCA (1)	FRESA MARCA (1)	CEREZA MARCA (2)	FRESA MARCA (2)	SUMA DE JUECES.
1	6	5	4	6	5	8	34
2	5	5	5	4	7	9	35
3	4	5	4	4	6	8	31
4	6	6	6	4	8	8	38
5	3	5	3	2	9	1	23
6	6	7	6	7	8	8	42
7	6	7	5	6	8	2	34
8	3	3	2	5	7	9	29
9	5	5	5	7	8	8	38
10	7	7	7	7	9	9	46
11	1	1	1	3	7	7	20
12	3	6	4	2	6	8	29
13	8	7	6	7	7	8	43
14	8	8	8	5	8	7	44
15	6	6	6	7	8	8	41
SUMAS DE MUESTRAS	77	83	72	76	111	108	527
\bar{x}	5.13	5.53	4.8	5.06	7.4	7.2	

3) TIEMPO = 14 DIAS.

MUESTRAS COMERCIALES.

JUEZ	GROSELLA MARCA (1)	FRAMBUESA MARCA (1)	CEREZA MARCA (1)	FRESA MARCA (1)	CEREZA MARCA (2)	FRESA MARCA (2)	SUMA DE JUECES.
1	8	7	7	5	8	7	42
2	7	6	6	6	7	8	40
3	3	6	3	4	7	9	32
4	6	6	6	3	7	3	31
5	5	4	4	6	7	8	34
6	7	7	6	6	7	8	41
7	6	8	6	6	8	9	43
8	8	8	7	6	8	6	43
9	5	6	5	5	7	8	36
10	5	5	5	3	7	9	34
SUMA DE MUESTRAS	60	63	55	50	73	75	376
\bar{X}	6.0	6.3	5.5	5.0	7.3	7.5	

* LA ESCALA VA DE 9 = MAS DESEABLE A 1 = MENOS DESEABLE.

NOTA: Las claves numéricas señaladas en los cuestionarios entregados a los jueces significan lo siguiente:

316	GELATINAS	COMERCIAL	MARCA	"RAPIDA"	SABOR	GROSELLA
412	"	"	"	"	"	CEREZA
218	"	"	"	"	"	FRAMBUESA
019	"	"	"	"	"	FRESA
134	"	"	"	"ROYAL"	"	CEREZA
292	"	"	"	"	"	FRESA

APENDICE D

CALIFICACIONES OBTENIDAS POR MUESTRAS PREPARADAS DE GELATINAS
 AÑADIENDOLES EXTRACTOS PURIFICADOS Y NO PURIFICADOS, AL EVA--
 LUAR UNICAMENTE EL COLOR.

1) TIEMPO = 3 DIAS.

MUESTRAS PREPARADAS.

JUEZ	PIGM. PURIF. 3 ppm	PIGM. PURIF. 6 ppm	PIGM. PURIF. 9 ppm	PIGM. NO PURIF. 3.5 ppm	PIGM. NO PURIF. 7.0 ppm	PIGM. NO PURIF. 10.0 ppm	SUMA DE JUECES.
1	1	1	5	3	7	8	25
2	7	6	8	7	6	8	42
3	7	7	6	6	7	8	41
4	4	4	5	7	8	9	37
5	4	5	8	5	7	8	37
6	7	7	8	6	8	8	44
7	4	6	6	4	6	7	33
8	8	5	7	6	9	9	44
9	3	8	7	2	7	7	34
10	6	6	6	7	8	9	42
11	6	7	6	6	8	9	42
12	6	7	7	5	6	6	37
13	5	6	6	5	7	7	36
14	6	7	3	4	6	9	35
15	7	8	8	6	8	8	45
SUMA DE MUESTRAS	81	90	96	79	108	120	574
\bar{x}	5.4	6.0	6.4	5.26	7.2	8.0	

2) TIEMPO = 7 DIAS.

MUESTRAS PREPARADAS.

JUEZ	PIGM. PURIF. 3 ppm	PIGM. PURIF. 6 ppm	PIGM. PURIF. 9 ppm	PIGM. NO PURIF. 3.5 ppm	PIGM. NO PURIF. 7.0 ppm	PIGM. NO PURIF. 10.0 ppm	SUMA DE JUECES.
1	6	7	7	6	7	8	41
2	6	8	8	4	8	9	43
3	4	6	7	5	7	8	37
4	3	5	4	6	7	8	33
5	8	6	8	4	6	7	39
6	7	7	8	6	7	7	42
7	8	7	8	4	7	8	42
8	6	5	6	3	7	9	36
9	5	6	7	6	7	4	35
10	8	8	8	2	8	9	43
11	2	4	6	1	3	7	23
12	7	8	9	2	6	8	40
13	7	9	9	8	9	9	51
14	4	5	5	6	8	8	36
15	8	9	8	5	6	7	43
SUMA DE MUESTRAS	89	100	108	68	103	116	584
\bar{X}	5.93	6.67	7.2	4.53	6.87	7.73	

3) TIEMPO = 14 DIAS.

MUESTRAS PREPARADAS.

JUEZ	PIGM. PURIF. 3 ppm	PIGM. PURIF. 6 ppm	PIGM. PURIF. 9 ppm	PIGM. NO. PURIF. 3.5 ppm	PIGM. NO PURIF. 7.0 ppm	PIGM. NO PURIF. 10 ppm	SUMAS DE JUECES.
1	4	5	5	5	8	8	35
2	6	7	8	6	7	8	42
3	4	4	5	4	6	9	32
4	3	3	3	6	6	7	28
5	5	6	6	7	7	7	38
6	5	7	7	5	6	6	26
7	6	8	8	8	7	7	44
8	5	4	5	6	8	8	36
9	4	5	7	8	8	8	40
10	4	7	8	8	8	9	44
SUMA DE MUESTRAS	46	56	62	63	71	77	375
\bar{X}	4.6	5.6	6.2	6.3	7.1	7.7	

NOTA: Las claves numéricas indicadas en los cuestionarios entregados a los jueces significaban lo siguiente:

816	GELATINA PREPARADA UTILIZANDO 3.5 ppm DE ESTAGLANINAS	}	PROCEDENTES DE
472	" " " 7.0 ppm " "		EXTRACTO NO —
278	" " " 10.0 ppm " "		PURIFICADO.
049	" " " 3.0 ppm " "		PROCEDENTES DE
434	" " " 6.0 ppm " "		EXTRACTO PURIFI
202	" " " 9.0 ppm " "		CADO-CONCENTRADO.