



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LOS COLORANTES
DEL BETABEL (beta - vulgaris)

TESIS PROFESIONAL

MARIA DE LOURDES VILLEGAS RAMIREZ

QUIMICO

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TESIS 1979
N.º. ~~364~~ 364
FECHA _____
D.E. _____



TESIS PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

JURADO ASIGNADO

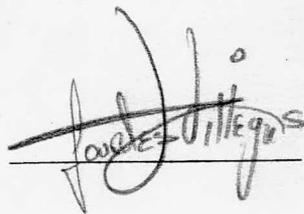
PRESIDENTE: M. en C. Angela Sotelo López.
VOCAL: Dra. Elvira Santos de Flores.
SECRETARIO: Dr. Helio Flores Ramirez.
1er. SUPLENTE: Dra. Yolanda Caballero Arroyo.
2o. SUPLENTE: QFB. Beatriz Luna Millan.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Química Orgánica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

SUSTENTANTE:

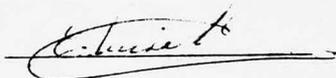
María de Lourdes Villegas Ramírez.



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lourdes Villegas', written over a horizontal line.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Elvira Santos de Flores.



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elvira Santos de Flores', written over a horizontal line.

A mis Padres:

Con cariño, y que su esfuerzo por formarme
sea siempre un estímulo de superación - -
en mi vida.

A mis Hermanos:

Con afecto para que nuestros princi-
pios de familia y todas las cosas que nos
unen, sean el aliciente que nos convierta
en hombres de provecho.

A la U.N.A.M.

Con agradecimiento por permitirme superar una etapa del profesionalismo.

A quienes fueron mis Profesores y al H. Jurado que me examine:

Con agradecimiento, y que sus sabios conocimientos que a mi impartieron, - - siempre sean una base sólida para mi desarrollo profesional.

A los señores:

Dr. Jorge Limón, M. en C. Fernando García, Q. Beatriz Cattori y Dra. Yolanda Caballero - con reconocimiento a su participación Técnica en la elaboración de esta tesis.

A mis Compañeros y Amigos:

Con aprecio, porque me brindan un reto a la superacion.

EN PARTICULAR AGRADEZCO A LA DOCTORA ELVIRA
SANTOS DE FLORES, POR SU VALIOSA DIRECCION
EN LA REALIZACION DE ESTE ~~TRABAJO.~~ *Proyecto*

I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES.	4
2.1 Colorantes Sintéticos FD&C Rojos Núms. 1, 2 y 4.	
2.2 Aspectos Generales y Estructura de las Betalainas.	14
2.3 Métodos de Extracción y Separación de Betalainas.	26
2.4 Estabilidad.	29
2.5 Aspectos Agroeconómicos del Betabel.	35
2.6 Aplicaciones de los Colorantes de Betabel en Productos Alimenticios secos.	38
III. PARTE EXPERIMENTAL.	40
3.1 Recolección de Diversas Muestras Comerciales de Polvo de Betabel y Análisis del Contenido de Colorante en los mismos.	40
3.2 Preparación de Concentrados de Colorante, como Mezcla por Extracción Acuosa.	42
3.3 Preparación de Concentrados de Colorante, como mezcla por Fermentación.	44
3.4 Diversos Métodos Analíticos para Separar Concentrados de Colorante.	48
3.4.1 Cromatografía por Exclusión Molecular.	48

	Pág.
3.4.2 Cromatografía en Placa Fina.	52
3.4.3 Electroforesis en Papel.	54
3.5 Identificación y Análisis Cuantitativo de Betalainas por Espectroscopía UV-Visible.	56
3.6 Simulación de un Proceso, para Extracción Exhaustiva de los Colorantes del Betabel.	58
3.7 Determinación del Volumen de H ₂ O y número de Extracciones requeridas para agotar una muestra de Betabel.	59
3.8 Concentraciones Óptimas, de Concentrados de Betabel, usados en Gelatinas.	60
IV. RESULTADOS Y SU DISCUSION.	61
V. CONCLUSIONES.	81
VI. BIBLIOGRAFIA.	83

I. INTRODUCCION

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo fundamental la obtención en concentrado de los pigmentos de betabel, procurando alcanzar calidades idénticas a algunos colorantes comerciales actualmente producidos por Holanda, Suiza, Suecia, Polonia y la Unión Americana. En la República Mexicana debido al cultivo de diversas variedades del betabel, se estima que no existirían inconvenientes para el desarrollo del proceso de obtención de colorantes mencionado en ésta tesis.

En los últimos años este aspecto ha cobrado interés en la Industria Alimentaria Norteamericana, pues el Departamento de Administración de Alimentos y Medicamentos (Nota 1) en beneficio y protección de la salud pública, recientemente suspendió el uso de diversos colorantes como resultado de sus investigaciones toxicológicas realizadas¹. Entre los productos suspendidos por éste organismo, están los colorantes sintéticos FD&C (Nota 2) - rojos núms. 1, 2 y 4.

Nota 1 Food & Drug Administration (U.S.A.)

Nota 2 FD&C colorantes propios para la Industria Alimentaria.

Como resultado de tales medidas, ha aumentado el interés por los pigmentos naturales, como posibles colorantes de alimentos, ya que por el momento se supone son inocuos, sin embargo, se les ha estado sometiendo a estudios de toxicidad.

Entre los pigmentos naturales que tienen mayor consumo y valor comercial como colorantes de alimentos, se encuentran: Antocianinas, Betalainas, Carotenoides, Flavonoides, Curcumina, etc.

Las antocianinas se encuentran en el pellejo de las uvas, en la jamaica, fresas, arándanos, flores y hojas.

Las Betalainas se encuentran en el betabel, bayas pequeñas, cactus, flores y brácteas de las flores.

Los Carotenoides están abundantemente contenidos en numerosos organismos vegetales y animales, algunos de los cuales son: los α y β carotenos de la zanahoria, espina-cas, ~~empasúchitl~~, etc. y la crocetina y la bixina del azafrán y achiote, respectivamente.

Los Flavonoides son abundantes en la naturaleza, se les encuentra en hojas y flores de vegetales como el árnica montanae, árnica chamissonis, Compositae, Acanthaceae, Malvaceae y Leguminoseae, etc. entre sus principales pigmentos se encuentran los Flavonoides: Astragalina, Isoqueratina, Rutina, chalcónes, auronos, flavonoles, buteina, herbacetina y Quercetagetina, etc.

La Curcumina es un pigmento que se extrae de la cúr-

cuma (Cingiberácea de la India), cuya raíz se usa como tinctura.

Por las razones expuestas anteriormente se decidió efectuar el estudio de los colorantes del betabel, pues es una fuente importante de los pigmentos rojos y amarillos denominados "Betalainas"², que a su vez, se dividen en: "Betacianinas"³ y "Betaxantinas"⁴. Estos pigmentos bajo ciertas condiciones de temperatura, pH, luz, contenido de oxígeno, metales y algunos compuestos químicos, pueden ser aislados y estabilizados.

En el logro del objetivo de ésta tesis se estudiaron los siguientes aspectos:

La recolección de diferentes muestras comerciales, originarias de diversos países.

El análisis del contenido de colorante en cada muestra.

Los aspectos agroeconómicos del betabel.

La obtención de muestras de concentrados de colorantes, en forma de mezcla y en forma parcialmente purificada, usando los métodos de extracción por medio acuoso y concentrado fermentado.

1. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

Los colorantes y pigmentos son sustancias intensamente coloridas, usadas para impartir color a otros materiales.

Los colorantes son solubles en disolventes polares como son: H_2O , CH_3OH , etc., generalmente son orgánicos. Mientras que los pigmentos son insolubles en disolventes polares y pueden ser: Orgánicos o Inorgánicos.

Los colorantes se clasifican en dos grupos:

Los colorantes Orgánicos Naturales que son aquéllos de origen vegetal o animal.

Los colorantes Orgánicos Sintéticos que son aquéllos que se obtienen de materias primas y provienen del alquitrán de hulla del petróleo.

Es necesario establecer el significado del término "Aditivo Alimentario", que se define como una sustancia no nutritiva agregada intencionalmente a un alimento, generalmente en pequeñas cantidades, para mejorar su apariencia, textura, gusto o propiedades de almacenamiento.

Frecuentemente la manufactura de alimentos requiere de la adición de aditivos, que pueden ser sustancias sintéticas que no se encuentran en la naturaleza tales como: ciertos colorantes, antioxidantes, preservativos, conser-

vadores y substancias que confieren propiedades físicas especiales a los alimentos; tales como: mantenerlos húmedos, prevenir la rancidez, evitar el endurecimiento, impedir que se peguen los alimentos, etc.

En el caso específico de los aditivos colorantes son varias las razones que justifican su uso:

a) La principal de ellas tiene por objeto darle al alimento un aspecto apetitoso, pues como sabemos a pesar de que un alimento sea nutritivo, su aspecto influye profundamente estimulando el gusto.

b) Otra razón para su uso es la asociación entre el aspecto y la apreciación del sabor, se han hecho estudios sobre los efectos que provoca colorear productos alimenticios en forma no asociada con su sabor, como por ejemplo las gelatinas de sabor fresa coloreadas de azul y, los resultados han sido de fracasos comerciales.

c) La tercera razón es que el público espera que los alimentos que compra tengan un aspecto estándar, es decir que su color sea siempre el mismo.

d) Otra razón ha sido su uso como restablecedores del color o tonos de los productos alimenticios originales, después de haberlos sometido a algún proceso de transformación.

Los colorantes artificiales FD&C son derivados del alquitrán de hulla y pertenecen a la clase de colorantes

azoicos, nitrosados, nitrados, de pirazolona, indigoides, xanteno, antraquinona, quinolina y tiazina, etc.

En el Colour Index⁵, se encuentra una lista de los colorantes para alimentos donde se especifican sus propiedades y usos.

Los colorantes sintéticos FD&C que se usan en la Unión Americana, con permiso gubernamental, se conocen como colores certificados y el proceso de certificación consiste en realizarles análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos, los cuales deben de pasar satisfactoriamente.

El organismo que se encarga de la legislación de alimentos en los Estados Unidos de Norteamérica es la Food and Drug Administration y sus regulaciones y decisiones se publican en el Federal Register, bajo el título 21 de Alimentos y Drogas.

En México la legislación 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 de aditivos para alimentos⁶, emitido por el sector salud del Gobierno Federal.

Algunos colorantes FD&C permitidos en el país son

los siguientes:

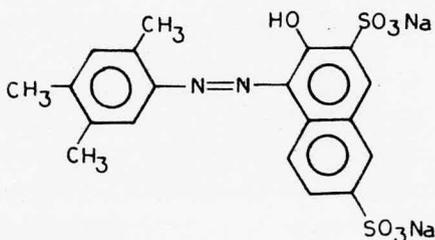
Amarillos No. 5 tartrazina y No. 6 sunset FCF; Azules No. 1 brillante y No. 2 Indigo; Rojos No. 1 Ponceau 3R, -- No. 3 eritrosina, No. 4 Ponceau-SX, No. 5 carmoisina y - - No. 6 Ponceau 4R; Violeta No. 1 (violeta lana 5BN).

El uso de los rojos FD&C núms. 1, 2 y 4 está severamente prohibido desde 1976 en los Estados Unidos de Norteamérica.

1.1 COLORANTES SINTETICOS FD&C ROJOS NUMS. 1, 2 y 4

Rojo No. 1 (Ponceau 3R)

En una compilación del Federal Register⁷, U.S.A. aparece publicado el resultado de las investigaciones recientemente hechas con el colorante rojo No. 1, que demostraron la toxicidad del mismo. Asimismo, en base a los estudios realizados experimentalmente al respecto⁸, se concluyó que la ingestión de éste aditivo colorante, durante periodos largos sería perjudicial para la salud pública y con el objeto de protegerla se canceló su registro provicional para su uso en alimentos, drogas y cosméticos.



Rojo No. 2 (Amaranto)

Este aditivo colorante, se usa desde hace aproximadamente 68 años y junto con otros siete colorantes fue aprobado originalmente para su uso en alimentos, drogas y cosméticos, en una emisión del 13 de julio de 1907, por el Food Inspection Decision of Board of Food and Drug - Inspection, Department of Agriculture U.S.A.

Para aprobar un colorante, es necesario que existan datos que demuestren que es inocuo o que haya estudios en desarrollo capaces de demostrarlo, de tal modo que el colorante puede estar registrado provisionalmente durante el tiempo en que se desarrollen dichos estudios. Bajo éstas condiciones el FD&C rojo núm. 2 ha estado registrado provisionalmente desde 1960.

Estudios de toxicidad aguda y crónica, hechos durante los años setentas con animales de laboratorio, no revelaron efectos adversos significativos que fueran resultado de la administración oral o dérmica de este colorante. En 1970, se suscitaron, por la publicación de los resultados de dos estudios hechos por investigadores Rusos, dudas con respecto al efecto del rojo No. 2 sobre la reproducción animal. Los investigadores Rusos incluyeron en sus estudios al Amaranto como material capaz de producir Cáncer y efectos nocivos sobre la reproducción animal.

Posteriormente, la FDA inició 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, fue atribuible a la ingestión del colorante. Cabe destacar que esto ocurrió en todas las dosis, salvo en la de 7.5 mg. Esto despertó la inquietud y posteriormente se realizaron estudios más profundos^{1, 9}.

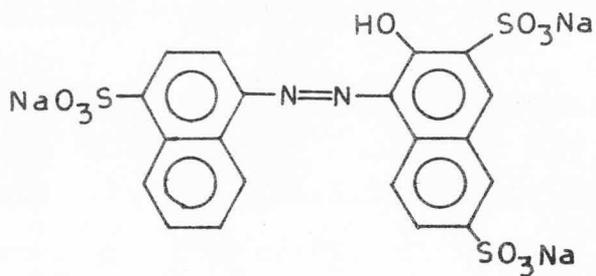
El estudio de la FDA, fué rechazado debido a que la dosis de prueba no se mantuvo constante y el grado y extensión de la autólisis del tejido, hacen difícil la evaluación patológica, lo que no demuestra la toxicidad de dicho colorante.

La fecha de terminación del registro provisional del rojo No. 2 había sido pospuesta, hasta el 30 de septiembre de 1976¹⁰, bajo la suposición de que los estudios hechos podrían establecer su inocuidad, pero como los estudios no lo lograron, el Comisionado dió por terminado el registro provisional del colorante en protección de la salud pública¹¹.

Por lo tanto, el colorante FD&C rojo No. 2 se canceló el 28 de enero de 1976.

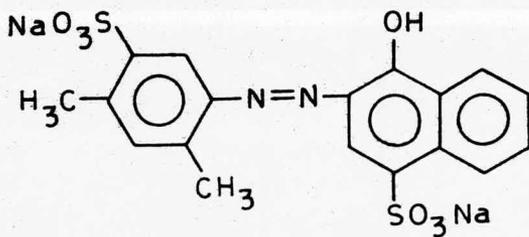
La adición de tal colorante a cualquier alimento, droga o cosmético, después de ésa fecha, será causa para que tal producto se considere adulterado, de acuerdo con lo establecido en el Federal Food Drug and Cosmetic Act

(21-USC, 301 etseq).



Rojo No. 4 (Ponceau SX)

Estas investigaciones realizadas que antes comentamos^{1 2}, también trajeron como resultado la cancelación del rojo No. 4 y se estableció por publicación del Federal Register, del 23 de septiembre de 1976^{1 3}, que los certificados expedidos para el FD&C rojo No. 4 y todas las mezclas que contengan éste aditivo colorante, son cancelados y no tendría efecto después de la fecha mencionada, el uso de éste colorante en la manufactura de alimentos, drogas y cosméticos.



Los colorantes rojos FD&C núms. 3 y 40 son los que frecuentemente se usan en alimentos, drogas y cosméticos; pero por sus propiedades físicas y químicas, se restringe su aplicación en algunos alimentos.

Como resultado de la prohibición y escasez de colorantes FD&C se ha mostrado gran interés sobre los pigmentos naturales, que no tienen riesgo como colorantes de alimentos. Tal es el caso de los pigmentos llamados - - "Betalainas", encontrados en la raíz roja del betabel².

1.2 ASPECTOS GENERALES Y ESTRUCTURA DE LAS BETALAINAS

El betabel, nombre vulgar "Beta-Vulgaris Var Rubra", es una planta perteneciente a la familia de las chenopodiaceae, de la especie correspondiente al orden centrosperma.

Los sólidos totales del betabel están formados principalmente por carbohidratos en un 80%, cenizas en 8%, - proteína cruda 10% y contenido de betacianinas en 0.2-1%.

Constituyentes del Betabel por cada 100 Gramos (Nota 3)

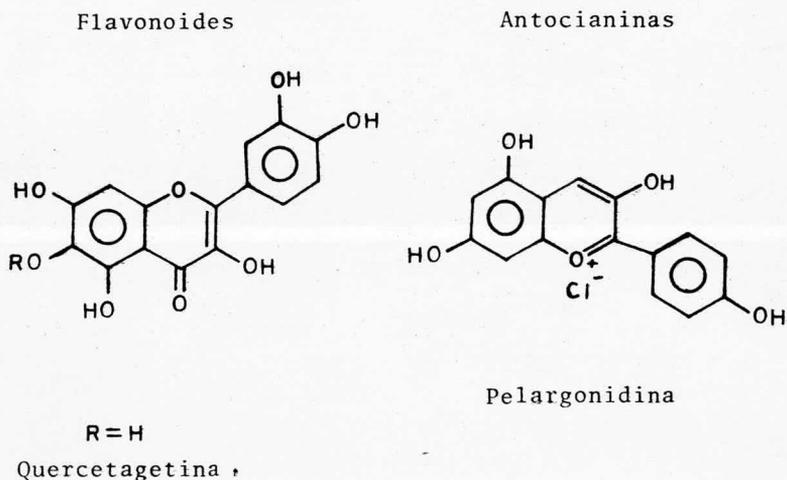
General		Minerales	
Calorías	42	Ca	27 mg
Proteínas	1.6	P	43 mg
Grasas	0.1	Fe	1 mg
Cenizas	1.1	Na	54 mg
Carbohidratos	9.6	K	350 mg
H ₂ O*	85-90	NO ₃	200 mg
Fibra Cruda	0.9		

Entre los carbohidratos localizados en el betabel se encuentran los siguientes: glucosa, sacarosa, manosa, levulosa y hexosa. Además, el betabel contiene una excelente fuente de pigmentos rojos y amarillos denominados "Betalainas", tecnicismo introducido por Mabry Dreiding², que a su vez contienen los pigmentos rojo violeta que son llamados "Betacianinas", término introducido por Schudel³.

También en las betalainas se encuentran, los pigmentos amarillos denominados "betaxantinas", término introducido por Wyler Dreiding⁴ y Piatelli^{14,15}.

La estructura de estos pigmentos antes mencionados, es completamente diferente a la de las antocianinas y los flavonoides presentes en otros vegetales y que a diferencia de las betalainas del betabel, no contienen nitrógeno (Figuras Núm. 1 y 2).

Figura No. 1



Nota 3 Estos datos, varían dependiendo de la variedad del betabel, madurez, condiciones ecológicas, etc.

En la siguiente tabla se clasifican todas las betacianinas encontradas en frutas, flores, hojas, raíz del betabel y cactus.

Betacianinas

Pigmento	λ Max. en H ₂ O (nm)	pH 4.5	Eb pH 2.4
1. Amarantina	536	1.16	1.00
2. Isoamarantina	536	1.16	1.00
3. Betanina	538	1.00	1.00
4. Isobetanina	538	0.93	0.93
5. Iresinina-I	538	1.17	1.00
6. Iresinina-II	538	1.17	1.00
7. Pilocactina	538	1.25	1.00
8. Celosianina	544-546	1.26	1.11
9. Isopilocactina	538	1.14	0.93
10. Isocelosianina	542-544	1.26	1.11
11. Buganvilleina-I	538-540	0.96	0.94
12. Buganvilleina-II	540-542	0.90	0.92
13. Gomprenina-I	535-537	1.00	0.96
14. Betanidina	542-546	1.00	0.70
15. Buganvilleina-III	540-542	1.00	0.94
16. Buganvilleina-IV	540-542	0.96	0.81
17. Isobetanidina	542-546	0.87	0.70
18. Gonprenina-II	536-538	0.91	0.89
19. Oleracina-I	534-536	0.80	0.72
20. Oleracina-II	534-536	0.80	0.72
21. Gonprenina-III	536-538	0.91	0.89

22. Bugarvileina-V	540-542	0,84	0,81
23. Bugarvileina-VI	544-546	0,84	0,81
24. Bugarvileina-VII	544-546	0,84	0,81
25. Gomprenina-IV	540-542	0,80	0,72
26. Prebetanina	540-542	1,34	1,78
27. Bugarvileina-VIII	544-546	0,84	0,81
28. Isoprebetanina	540-542	1,21	1,78
29. Bugarvileina-IX	544-546	0,84	0,81
30. Gomprenina-V	542-544	0,80	0,72
31. Bugarvileina-X	544-546	0,84	0,81
32. Gomprenina-VI	542-544	0,80	0,72
33. Rivianina	541-543	1,34	1,78
34. Bugarvileina-XI	544-546	0,84	0,81
35. Gomprenina-VII	542-544	0,80	0,72
36. Bugarvileina-XII	548-550	0,66	0,52
37. Gomprenina-VIII	540-542	0,80	0,72
38. Bugarvileina-XIII	549-551	0,66	0,52
39. Bugarvileina-XIV	550-552	0,66	0,52
40. Bugarvileina-XV	544-546	0,51	0,37
41. Bugarvileina-XVI	544-546	0,51	0,37
42. Msembriantemina I, II y III.	540-542	0,48	0,28

Eb= Movilidades electroforéticas en buffer fórmato
piridina 0.05 M, pH=4.5 y ácido fórmico 0.1 M
pH 2.4

A continuación, se muestra la estructura molecular
de las betacianinas rojo violeta, encontradas en el beta-
bel:

Figura No. 2

Betanina (pigmento rojo, en mayor cantidad).
Isobetanina (epímero de la betanina en C-15).

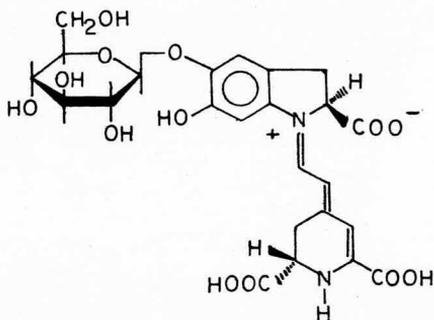


Figura No. 3

Prebetanina (pigmento violeta)
Isoprebetanina (epímero de la prebetanina en C-15)

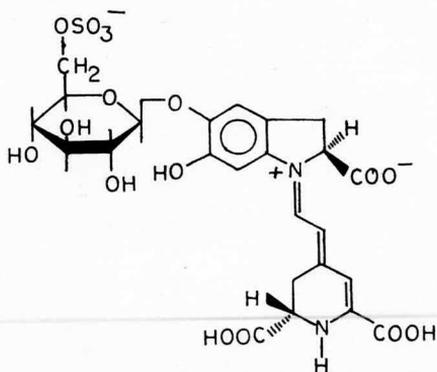


Figura No. 4

Betanidina (aglicona de la betanina, color rosa violeta) ✓

Isobetanidina (epímero de la betanidina en C-15).

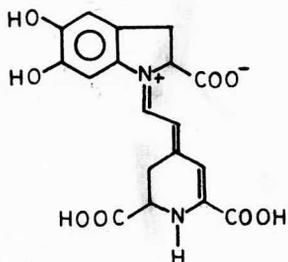


Figura No. 5

Dentro de las "Betaxantinas" amarillas, se encuentran los siguientes pigmentos:

Vulgaxantina I

Vulgaxantina II

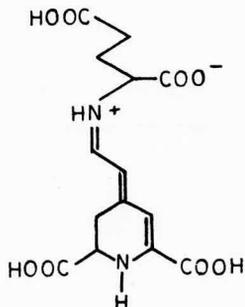
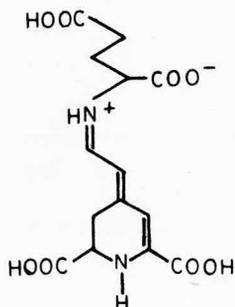


Figura No. 6

Indicaxantina (pigmento amarillo)
Isoindicaxantina (epímero en C-11)

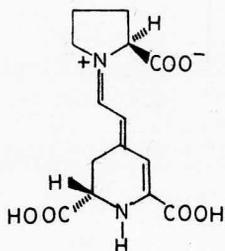
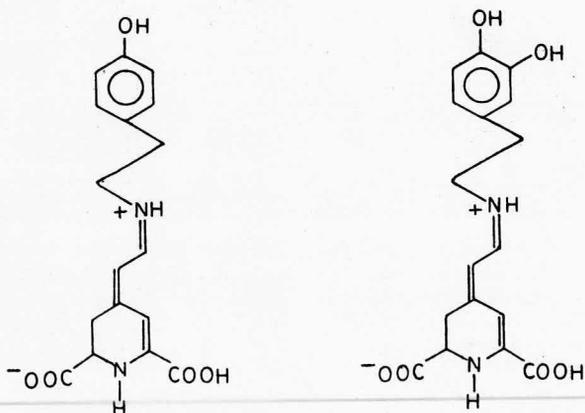


Figura No. 7

Miraxantinas (amarillas). Los números III y V se encuentran en el betabel, mientras que las miraxantinas I, II, III y IV se encuentran en los frutos del cactus (opuntia ficus-índica).



Betacianinas.

El término betacianina, se usa para los pigmentos rojo violeta, encontrados en diferentes especies de vegetales, como los antes mencionados y se agrupan dentro de las siguientes diez familias del orden "Centrosperma" como son: Chenopodiaceae, Amarantaceae, Portulacaceae, Nyctaginaceae, Phytolacaceae, Stegnospermaceae, Arizoaceae, Basellaceae, Cactaceae y Didieraceae, Mabry¹⁶,

Betanina.

Fué el nombre que se le dió, al pigmento rojo del betabel (Figura No. 2), y se encuentra aproximadamente en un 75-95% del contenido total en las betacianinas, la configuración absoluta de la betanina y de su forma epimérica isobetanina, fueron establecidas en 1965 por -- Wilcox¹⁷, y Piattelli¹⁸.

Las betacianinas, se pueden hidrolizar con ácidos o enzimas y forman los aglucones, llamados betacianidinas y los aglucones de las betacianinas son diastereoisómeros y se les dieron los nombres de, betanidina e isobetanidina. La estructura de la betanidina, mostrada en la figura No. 4, fué establecida en 1962 por Mabry¹⁹, quien determinó que el pigmento, tenía una estructura desconocida hasta esa fecha, entre los pigmentos encontrados en la naturaleza. Como se observa, anteriormente se pensaba que los pigmentos del betabel (betalainas), tenían -

estructura de antocianina, pero se demostró que tales pigmentos, entre sí, no guardan ninguna similitud, ya que las betalainas contienen un núcleo indólico y una piridina y las antocianinas se constituyen del grupo flavilio o benzopirilio (Figura No. 1).

Químicamente, la betanidina es un alcaloide y en sustancias naturales de éste tipo, se le ha dado la expresión de "cromo alcaloide".

La betanina al hidrolizarse con ácidos o alcalis, produce la aglicona betanidina, y simultáneamente en éste proceso ocurre una epimerización, dando lugar a la isobetanidina, Wyler & Dreiding²⁰.

El proceso de hidrólisis catalizado con enzimas, da origen a la betanidina exclusivamente .

Estos aglucones, tienen la misma fórmula molecular y el espectro de absorción idéntico, en agua presentan un máximo en el visible de 542-546 nm ($\epsilon=49400$) y en el ultravioleta, 271-272 nm ($\epsilon=8260$).

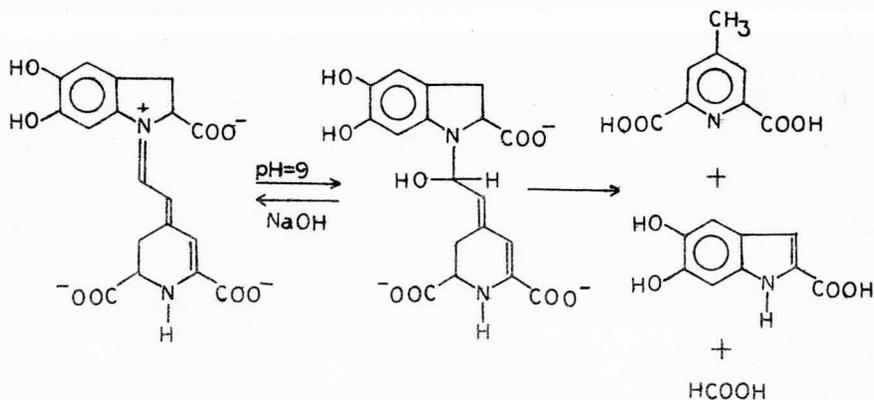
La betanina en agua tiene una λ max. a 536-538 nm ($\epsilon=60500$) y 273 nm ($\epsilon=8700$), los valores de " ϵ ", se calcularon por peso molecular correspondiente, siendo para la betanina de 550.22 y para la betanidina 388.14.

La betanidina, tiene dos átomos de carbono asimétricos, uno en C-2 y otro en C-15. La betanidina es ópticamente activa. En buffer de acetato, Schmidt²¹ encontró

Para la betanidina, la rotación específica $\alpha^{25}_{680} = +530^{\circ} \pm 50^{\circ}$ y para la betanidina pH 5, una rotación $\alpha^{25}_{680} = +310^{\circ}$. Para la isobetanina, Wyler²² encontró en el mismo solvente, la rotación $\alpha^{22}_{680} = -840^{\circ} \pm 60^{\circ}$.

La betanidina y la isobetanidina, tienen configuración -S en el C-2 y la diferencia entre ambos aglucones, depende de la configuración en el C-15. De ésta manera, la betanidina tiene configuración-S, mientras que la isobetanidina tiene configuración-R. Bajo fusión alcalina, la betanidina produce el ácido 4-metilpiridin-2, 6-dicarboxílico, más el ácido 5,6-dihidroxi-2, 3-dihidroindol-2-carboxílico (leucodopacromo o ciclodopa) y el ácido fórmico (Figura No. 8)

Figura No. 8



Betaxantinas.

La primera betaxantina cristalina, fué obtenida de las frutas del cactus (*Opuntia Ficus-Indica*), y se le denominó indicaxantina, su estructura fué determinada por Piattelli¹⁴ (Figura No. 6), y es ópticamente activa con una rotación $\alpha_D^{20} = +394^\circ$ ($c=1$ en buffer de fosfatos 0.1M a pH=7), tienen dos carbonos asimétricos uno en C-2 y otro en C-11, tienen configuración -S igual que la betanina. En agua dicho pigmento presenta una absorción λ max. a 485 nm ($\log. \epsilon=4.63$), y a 305 nm y 260 nm, ($\log. \epsilon=3.19$) y ($\log. \epsilon=3.73$).

Del betabel, se aislaron dos betaxantinas y por un camino similar al Piattelli¹⁵, se determinaron sus estructuras, dándoles el nombre de Vulgaxantina I y II (Figura No. 5).

La diferencia entre estas betaxantinas y la indicaxantina, es que la prolina es reemplazada por los aminoácidos glutamina para vulgaxantina I y ácido glutámico para vulgaxantina II.

La síntesis parcial de indicaxantina, se llevó a cabo por Wyler²⁵, por el tratamiento de betanidina con exceso de S-prolina en medio alcalino; al mismo tiempo Piattelli¹⁸ obtuvo indicaxantina y otras betaxantinas como vulgaxantina I y varias miraxantinas III y V (Figura No. 7), por otro método diferente, en el cual la betanina se disuelve en agua, se satura con SO_2 y cuando el color haya desaparecido, el dióxido de azufre se elimina con vacío.

después, se adiciona el aminoácido deseado y se ajusta el pH a 9 con NH_4OH , 1N. Así, las betaxantinas se obtienen con características idénticas a las encontradas en la naturaleza.

La vulgaxantina-I se puede obtener, utilizando el -- ácido L-glutámico o la L-glutamina, en ambos procedimientos de intercambio en medio básico, se involucra la formación del ácido betalámico, compuesto que ha sido aislado de la degradación de los productos de betanina por Kimler²⁶ ó - betanidina Sciuto²⁷. En medio alcalino, el ácido betalámico puede reaccionar con aminoácidos o con aminas para formar - las betalainas.

2.3 METODOS DE EXTRACCION Y SEPARACION DE BETALAINAS

En 1938 Pucher y Curtis²⁸, prepararon un concentrado de colorante, rayando y secando los betabeles en una estufa a 80°C. Después fueron extraídos los pigmentos con etanol caliente al 95% y ácido clorhídrico al 20%; posteriormente se purificaron con una solución de acetato ferroso al 30% y finalmente se cristalizaron con metanol-eter. En 1959 Peterson y Joslyn²⁹, prepararon un extracto con etanol-ácido y purificaron en columnas de Magnesol-Hyflo. En 1964 Piattelli y Minale³⁰, molieron los betabeles con agua y homogenizaron por calentamiento a 70°C durante 15 min., filtraron y evaporaron hasta obtener -- cristales. En 1970 Nilsson³¹ preparó un concentrado acuoso sin necesidad de calentar, puesto que las betalainas son solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos.

Un método para la separación de betacianinas y betaxantinas, fué desarrollado por Piattelli y Minale¹⁴, estos autores aplican polvo de concentrado de betabel, a una columna de celulosa y eliminan las betaxantinas por el lavado con metanol. Las betacianinas son lentamente eliminadas con agua y la purificación se realizó usando una resina Dowex de intercambio iónico (50W-X₂).

En 1948 Aronoff³² separó el concentrado de betabel crudo en once fracciones, utilizando tierra de talco-silicio, en una columna (Hyflo super-cell, 3: 1v/v) y como -- eluyente agua destilada. Peterson y Joslyn³³, usaron una columna de Magnesol-hiflo super-cell (1:1 v/v) y como -- eluyente H₂O también para separarlo.

Las columnas de poliamida, fueron usadas por Piattelli y Minale¹⁴, para la separación, pero las mejores separaciones de betacianinas, fueron obtenidas en 1970 por Nilsson³¹, utilizando columnas con polvo de poliamida. (polycaprolactama BASF) y como eluyente un buffer de citrato de sodio 0.01M a pH 5.4

En 1972 Von Elbe³⁴ utilizó para la separación y purificación de las betalainas, columnas con polivinilpirrolidona.

Un avance en el estudio de las betacianinas, fué el método de electroforésis en papel, usando un buffer de citrato 0.1M a pH 5.5 para separar el concentrado en siete componentes y su autor fué Von Elbe^{34,37}.

Otros investigadores, usaron diferentes sistemas de buffer y gradientes de voltaje como son: buffer de fosfatos a pH 6.6 y 30-40 v/cm; buffer a pH 4.5 de ácido cítrico - piridina 0.15M y 5.2 v/cm y buffer de piridina-formato 0.05M a pH 4.5 ó ácido fórmico 0.1M a pH 2.4 y 16 v/cm o buffer de fosfatos a pH 5.5 y 8.5 v/cm.

En 1976 Adams⁴⁶, preparó un concentrado de betacianinas por fermentación del jugo de betabel con levadura *Candida utilis*.

En 1977 Adams y Von Elbe³⁵, realizaron la separación de los pigmentos del betabel, usando columnas empacadas con Biogel-P-6 (400 mallas) o Sephadex G-25 y como eluyente un buffer de fosfatos 0.025M a pH 2.95 ó agua y

CH₃COOH al 1%. Este método es conocido como separación por exclusión molecular y es uno de los métodos que se utilizaron para realizar éste estudio.

En 1978 Kent & Scholz³⁶, realizaron la separación de los pigmentos de betabel, por el método de cromatografía líquida de alta presión.

2.4 ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS DEL JUGO DE BETABEL

Hay varios factores que afectan la estabilidad de los pigmentos, durante su preparación, procesamiento y almacenaje de concentrados, éstos incluyen el calor, pH, luz, oxígeno, metales y otros compuestos químicos.

En el análisis, se identificó que el espectro de absorción de la betanina fué idéntico a pH 3,5-7 con un máximo de absorción a 537-538 nm; no habiendo cambio de color en la betanina (Tabla No. 1). A pH 3, la intensidad de la absorción disminuye, a un máximo de 534-536 nm.

Tabla No. 1

Absorción máxima a diferentes valores de pH de la betanina y vulgaxantina-1

Valor de pH	λ máx. Betanina (nm)	λ máx. Vulgaxantina-I (nm)
1.5	537	466
2.0	534	468
2.5	534	470
3.0	535	471
3.5	537	472
4.0	537	474
4.5	537	476
5.0	537	476
7.0	537	476

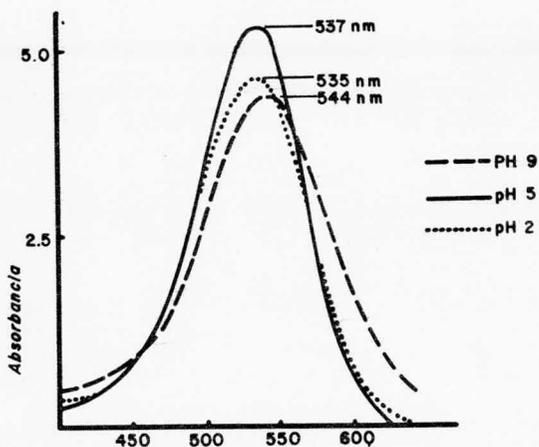
valor de pH	λ max. Betanina (nm)	λ máx. Vulgaxantina-I (nm)
7.5	538	476
8.0	538	476
8.5	542	476
9.0	544	472
9.5	548	470
10.0	550	452
10.5	549	-
11.0	551	440

Algunos estudios, han mostrado que la estabilidad de las betacianinas es mucho mayor a pH 5^{38,39} y la temperatura a 25°C.

En cuanto a otros factores que afectan su estabilidad como son el aire y la luz, es importante protegerlos y no exponerlos a estos elementos, pues su análisis demostró que su rango de degradación causado por su exposición a los mismos, fué aproximadamente del 28%; del cual el 14% fué causado por el aire y el 15% por la luz.

En la figura No. 9 se muestra el espectro de las soluciones de betanina, a diferentes valores de pH como son el 2, 5 y 9.

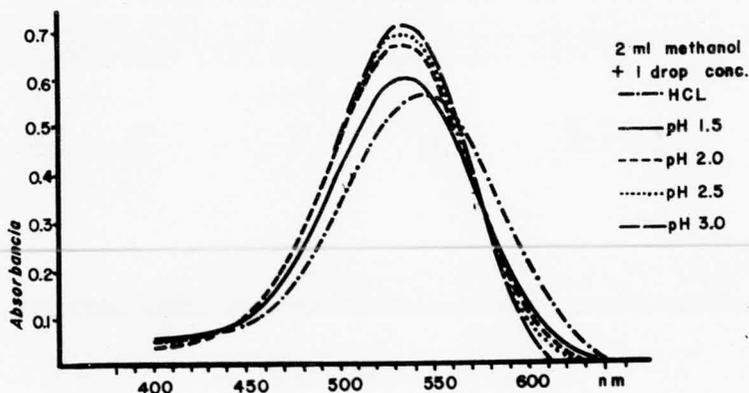
Figura No. 9



Cuando el pigmento se disuelve en metanol, conteniendo una gota de HCl conc., ocurre un cambio batocrómico de aproximadamente 10 nm, dando por resultado un cambio de color azul intenso a violeta (Figura No. 9-a).

Figura No. 9-a

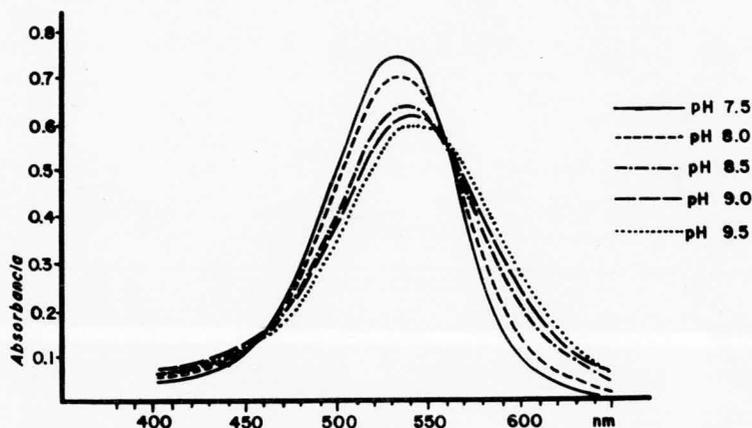
Efecto del pH menor de 3, sobre el espectro de absorción de la betanina.



Incrementando el pH de 7.0 a 11.0, origina un cambio en la λ max por ejemplo: a pH 9.5 hay un cambio en la longitud de onda, presentando un punto isobéptico a 560 nm y estimativamente otro a 460 nm (Figura No. 9-b).

Figura No. 9-b

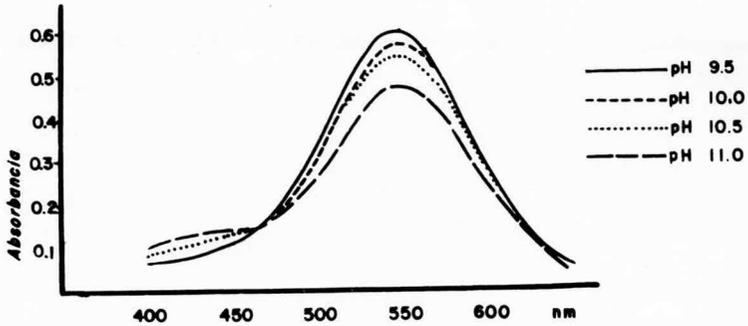
Efecto del pH de 7.5-9.5 sobre el espectro de absorción de la betanina y cambia su color de violeta a azulado.



A pH mayor de 9.5, la absorción es de 550 nm, la banda continúa disminuyendo, al mismo tiempo que la absorción en la región 400-460 nm se incrementa (Figura 9-c).

También se observó un cambio de color, hasta llegar al amarillo, conforme se incrementa la alcalinidad y se presentó un punto isobéptico a 465 nm.

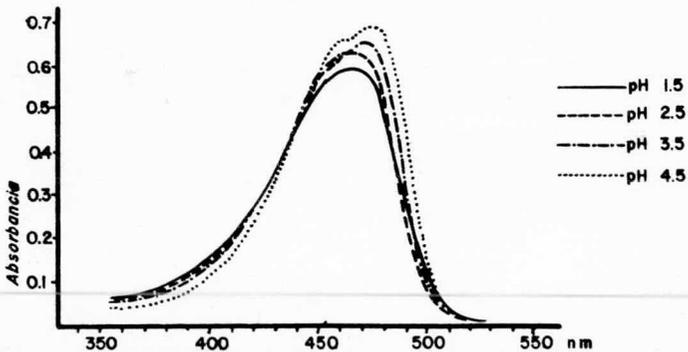
Figura No, 9-c



El espectro de absorción de la vulgaxantina-I, fué determinado en la región de 400-600 nm, entre pH 4.5 y 8.5, presentando en todos los casos un máximo de absorción a 476 nm y un hombro a 460 nm, por lo tanto no hay cambio de color en este rango de pH.

A pH menor de 4.5 hay un cambio gradual hipsocrómico del máximo de absorción (Figura 9-d).

Figura No, 9-d



Mediante calentamiento de las soluciones conteniendo el pigmento, ya sea en forma de mezcla o parcialmente puro a temperatura mayor de 50°C, el color cambia rapidamente transformándose de rojo a café brillante.

Al exponer los pigmentos, "betacianinas y betaxantinas" a radiaciones gamma o U.V., hay una pérdida del color, debido a que la radiación gamma de 50-100 krad. causa una disminución en la absorción.

Similarmente tales pigmentos pierden los picos característicos de espectro, cuando se les expone a la luz, U.V., por un período de 72 a 120 hrs.⁴⁰

El contenido de humedad también afecta la estabilidad de los pigmentos, la máxima estabilidad se logra - - cuando se tiene un valor bajo de aw (actividad del agua= 0.5).

2.5 ASPECTOS AGRO-ECONÓMICOS DEL BETABEL

Investigación sobre las zonas productoras de betabel en el país.

Las principales zonas productoras de betabel en México, son los estados de Sonora, Tamaulipas, Michoacán, Guanajuato, Aguascalientes, Baja California Sur, Veracruz y Yucatán.

Las variedades más comunmente cultivadas, época de siembra, época de cosecha y ciclo vegetativo del betabel de otoño a invierno de 1975-1976 y 1977-1978, están dados en las tablas nums. 2 y 3.

Entre las variedades que se cultivan en México se encuentran las siguientes:

Asgrow Wonder, Red Pack, Crosby's Egyptian, Black Beauty, Detroit Dark Red, Perfet Detroit, King Red, Royal Red, Detroit Short Top y Special Crosby.

Algunas variedades presentan las siguientes características:

Crosby's Egyptian, tarda 58 días de la siembra a la madurez, tiene raíz en forma de globo achatado de color rojo morado y con anillos internos más claros.

Perfect-Detroit, tarda 70 días de la siembra a la -

madurez, sus raíces son casi redondas-lisas de color rojo oscuro muy uniforme y con hojas de color rojiverde.

Asgrow Wonder, sus raíces son lisas, su forma es -- aglobada al madurar, su carne es de color rojo y relativamente uniforme, tarda 57 días de la siembra a la madurez.

Detroit Darck Red, madura a los 68 días después de la siembra, sus raíces tienen forma de globo y su carne es de color rojo intenso.

Los períodos de maduración y calidad, están sujetos a la ecología, suelo, fertilidad, época de siembra, época de cosecha, así como los cuidados del cultivo como son: riego, fertilización, deshierbe, control de plagas y enfermedades, etc.

En las Tablas núms. 4 y 5, se mencionan algunos aspectos económicos del betabel, como son: superficie cosechada en hectáreas, rendimiento medio, producción en toneladas, precio rural, valor de la producción, comercio exterior (exportaciones e importaciones), y consumo nacional en toneladas, durante el período de 1971-1978.

Se puede observar que en 1971, la superficie cosechada fué 306 hectáreas y en 1978, bajó hasta 106 hectáreas; la producción en 1971 ascendió a 5,490 toneladas y a un precio de \$1,020.00 por tonelada; en 1978 fué de 1656 toneladas, con un precio de \$3,084.00 por tonelada; en 1971 no hubo comercio exterior (importaciones y - -

exportaciones); mientras que en 1978 no hubo importaciones y se exportaron 4 toneladas de betabel a Estados Unidos de Norteamérica. Lo que quiere decir que el betabel se cultiva y cosecha exclusivamente para el consumo nacional.

El consumo nacional de betabel en 1971, fué de 5490 toneladas; en 1975 bajó hasta 245 toneladas y en 1978 - volvió a subir hasta 1652 toneladas.

Estos datos fueron proporcionados por la Unión Nacional de Productores de Hortalizas, Dirección General de -- Economía Agrícola "S.A.R.H." y por el Grupo Aroquím.

CICLO AGRICOLA DE OTOÑO INVIERNO 1975-76

ESTADO	REGION	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DIAS)	EPOCA DE SIEMBRA	EPOCA DE COSECHA	ASNM *
SONORA	Valle del Yaqui, Mayo y Guaymas	Asgrow Wonder	60 a 80	1 ^o sep. a 31 Marzo	1 ^o Nov. a 15 Junio	3 ^a 79
	Costa de Hermosillo	Asgrow Wonder Red Pak	80 a 100	18 Ene. a 17 Marzo " " "	1 ^o May. a 15 Junio " " "	
SINALOA	Valle del Fuerte	Crosby's Egiptian Asgrow Wonder	60 a 80	1 ^o Sep. a 28 Feb. " " "	1 ^o Nov. a 31 Mayo " " "	15
	Valle de Culiacán	Asgrow Wonder Crosby's Egiptian Black Beauty	60 a 70	1 ^o Oct. a 31 Enero " " " " " "	1 ^o Nov. a 15 Mayo " " " " " "	53
TAMAULIPAS	Norte del Estado	Detroit Dark Red	60 a 75	1 ^o Sep. a 31 Dic.	1 ^o Nov. a 15 Marzo	30
	Sur del Estado	Crosby's Egiptian	70 a 80	1 ^o Sep. a 31 Oct.	15 Dic. a 31 Enero	
MICHOACAN	Valle de Apatzín gán	Crosby's Egiptian	60 a 80	1 ^o Sep. a 28 Febrero	1 ^o Nov. a 31 Mayo	682
GUANAJUATO	Bajío	Perfect Detroit	70 a 90	1 ^o Oct. a 31 Dic.	15 Dic. a 15 Abril	1,765
		Crosby's Egiptian		" " "	" " "	
		King Red		" " "	" " "	
		Royal Red		" " "	" " "	
AGUASCALIENTES	Pabellón	Crosby's Egiptian	70 a 90	1 ^o Oct. a 31 Dic.	15 Dic. a 31 Marzo	1,397
VERACRUZ	Cotaxtla	Detroit Short Top	60 a 70	1 ^o Oct. a 31 Enero	1 ^o Dic. a 15 Abril	16
		Special Crosby		" " "	" " "	
		Red Pak		" " "	" " "	
		Crosby's Egiptian		" " "	" " "	
YUCATAN	Muna	Crosby's Egiptian	70 a 80	1 ^o Oct. a 28 Feb.	15 Dic. a 31 Mayo	40

* ASNM. Altura sobre el nivel del mar del Centro
o Campo de Investigaciones Agrícolas

ESTADO	REGION	VARIETADES	CICLO VEGETATIVO (DIAS)	EPOCA DE SIEMBRA	EPOCA DE COSECHA	ASNMM	SEMILLA Kg/Ha.
AGUASCALIENTES	Pabellón	Crosby's Egiptian Perfect Detroit	70 - 90	1 ^o Jun. a 31 Dic. " " "	1 ^o Ago. a 31 Mayo " " "	1,897	10 - 15
BAJA CALIFORNIA SUR	Cd. Constitución	Crosby's Egiptian	60 - 80	15 Sep. a 15 Mar.	15 Nov. a 5 Jun.	1,765	8 - 10
GUANAJUATO	El Bajío	Perfect Detroit Crosby's Egiptian King Red Royal Red	70 - 90	1 ^o Oct. a 31 Dic. " " " " " " " " "	15 Dic. a 15 Abr. " " " " " " " " "	682	15
MICHOACAN	Valle de Apatzingán	Crosby's Egiptian	60 - 80	1 ^o Sep. a 28 Ene.	1 ^o Nov. a 31 Mayo	15	8 - 10
SINALOA	Valle del Fuerte	Crosby's Egiptian Asgrow Wonder	60 - 80 60 - 80	1 ^o Oct. a 31 Ene. 1 ^o Oct. a 31 Ene.	1 ^o Nov. a 31 Mayo 1 ^o Nov. a 15 Mayo	53	8 - 10
SONORA	Valles del Mayo y Empalme Costa de Hermosillo	Asgrow Wonder Crosby's Egiptian Asgrow Wonder Red Pak Wonder	60 - 70	15 Sep. a 15 Marzo " " " 18 mar. a 17 marzo " " "	1 ^o Dic. a 30 Mayo " " " 1 ^o May. a 15 Jun.	3 a 79 211	10 15 - 20
TAMAULIPAS	Norte del Edo. Sur	Detroit Dark Red Crosby's Egiptian	60 - 75 70 - 80	1 ^o Sep. a 31 Dic. 1 ^o Oct. a 31 Oct.	1 ^o Nov. a 15 Mar. 15 Dic. a 31 Enero	30	15 - 20
VERACRUZ	Cotaxtla	Detroit Short Top Special Crosby Red Pack Crosby's Egiptian	60 - 70	1 ^o Oct. a 31 Ene. " " " " " " " " "	1 ^o Dic. a 15 Abril " " " " " " " " "	16	15 - 20
YUCATAN	Muna	Crosby's Egiptian	70 - 80	1 ^o Oct. a 28 Feb.	15 Dic a 31 Mayo	40	10

ASPECTOS AGRONOMICOS DEL BETABEL DURANTE 1971-74

AÑO	SUPERFICIE COSECHADA Hectárea	RENDIMIENTO MEDIO Kgs /Ha	PRODUCCION TONELADAS	PRECIO RURAL \$ /Ton	VALOR DE LA PRODUCCION \$	COMERCIO EXTERIOR		CONSUMO	
						IMP. TONELADAS	EXP.	NACIONAL Tons.	PER-CAPITA Kgs.
1971	306	17,941	5,490	1,020	5'593,500	-	-	5,490	0.110
1972	195	18,754	3,657	1,200	4'388,429	-	-	3,657	0.071
1973	210	12,833	2,695	1,523	4'105,502	-	-	2,695	0.050
1974	210	18,852	3,959	1,650	6'532,350	-	-	3,959	0.071
PROMEDIO									
1971-1974	230	17,174	3,950	1,305	5'154,945	-	-	3,950	0.076

(-) No hubo.

ASPECTOS AGRONOMICOS DEL BETABEL DURANTE 197-78

A Ñ O	SUPERFICIE COSECHADA Hectárea	RENDIMIENTO MEDIO Kgs /Ha	PRODUCCION Toneladas	PRECIO RURAL \$/Ton	VALOR DE LA PRODUCCION \$	COMERCIO EXTERIOR TONELADAS		CONSUMO NACIONAL Ton.
						IMP.	EXP.	
1 9 7 5	34	9,941	338	1,220	413,600	-	93	245
1 9 7 6	38	9,211	350	2,000	700,000	-	42	308
1 9 7 7	110	15,364	1,690	2,033	3'436,000	-	57	1,633
1 9 7 8	106	15,623	1,656	3,084	5'107,680	-	4	1,652
PROMEDIO								
1975-1978	72	12,534	1,008	2,084	3'989,320	-	49	959

2.6 APLICACIONES DE LOS COLORANTES DE BETABEL EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS SECOS

Los concentrados de betabel preparados por los procesos, a ó b, con tonos: rojo y violeta respectivamente, se pueden usar para colorear diferentes productos alimenticios,^{41, 42, 43, 44, 45} algunos de los cuales se muestran a continuación, (las concentraciones adecuadas en gelatina, se mencionan en la parte experimental).

Mezclas de Alimentos Secos: Tales como sopas secas - especialmente sopa de tomate), mezclas de especias, adornos para ensaladas secas y proteínas de soya.

Alimentos Enlatados: Productos de tomate enlatados como Ketchup de tomate, salsa para pizzas, frutas vegetales enlatadas, tales como cerezas y fresas.

Alimentos en escabeche: Algunos de ellos son; rábanos picantes y otras especias en escabeche.

Productos de carne: Como salchichas, especias mixtas especiales para la carne industrial y hamburguesas.

Productos de Mayonesa.

Productos de Leche:

Como son helados, cremas para
sawich y chocolates con crema
y frutas.

Postres y Dulces:

Como jalea de frutas, pasteles,
etc.

Mermeladas y Gelatinas.

III, PARTE EXPERIMENTAL

3.1 ANALISIS DEL CONTENIDO DE COLORANTE EN LAS MUESTRAS COMERCIALES DE POLVO DE BETABEL.

Se recolectaron muestras comerciales de concentrados de colorante de betabel en polvo y se analizaron cada una de ellas. A continuación se describen los nombres de las muestras.

1. Deco: Polvo de betabel rojo, el color natural para alimentos.
Compañía de Deshidratación Suiza.
2. No. 1728: Polvo de jugo de betabel.
Columbus, Ohio.
3. Betatom No. 180: Polvo de jugo de betabel rojo, secado en spray. New York.
4. Aditivo con betabel No 4003: Betabel seco, modificado con almidón. New York.

En las muestras comerciales, se determinó el % de colorante, por espectroscopía en el visible de la siguiente manera: Se pesaron de 29-30 mg de muestra, se aforaron a 10 ml en matraces volumétricos, se tomaron alícuotas y se hizo la determinación en el espectrofotómetro Perkin-Elmer No. 202, observando la absorbancia y longitud de onda co-

rrespondiente. Así mismo, se determinó el % de humedad en cada muestra, de la siguiente manera: Se pesaron 50 mg de la muestra comercial de colorante, en un pesafiltro puesto a peso constante, se secó en una estufa con vacío por 8 -- hrs. a 50°C hasta que ya no variaron las pesadas y se dejó enfriar en un desecador y se calculó el % de humedad por diferencia de peso. Los resultados de éstas determinaciones, se muestran en la (página 61).

3.2 PREPARACION DE CONCENTRADOS DE COLORANTE COMO MEZCLA POR EXTRACCION ACUOSA.

Al revisar los diversos métodos de extracción de los colorantes de betabel, se encontró toda una gama de métodos contradictorios, de ésta manera se seleccionó la extracción en medio acuoso por lo sencillo del método.

Se dispuso de dos variedades de betabel clasificadas y la comercial que se vende en el mercado.

Las variedades clasificadas fueron "Crosby's Egyptian" y "Perfect-Detroit".

a). Concentrado de colorante por extracción acuosa^a.

Se escogieron betabeles pequeños de 6 cm de diámetro del mercado (variedad desconocida), se lavaron, se secan y se pesó un kg. de ellos. Se cortaron en cubos pequeños y se molieron en licuadora usando como disolvente agua, cantidad total 2.5 litros/Kg de betabel (Nota No. 4). Se le adicionó ácido ascórbico antes de la molienda - - 100 ppm. y la fase acuosa se centrifugó durante 30 min., para clarificar el jugo. Posteriormente el jugo se evaporó en rotavapor con vacío (10 mm de Hg) y 30°C, obteniendo cristales de una mezcla de colorantes con carbohidratos, proteínas, sales, etc., los cuales se guardaron en un desecador ya que son muy higroscópicos. De esta manera se obtuvieron 113.5 g de sólidos totales/Kg de betabel.

El mismo procedimiento, se usó para las variedades clasificadas, como Crosby's Egyptian y Perfect Detroit, las cuales produjeron residuos que pesaron:

Para Crosby's Egyptian 89.7 g de sólidos/Kg de betabel y para Perfect Detroit 96.5 g de sólidos totales/Kg de betabel, éstos resultados se comentan en la (página 62).

Nota 4 Inicialmente se adiciona la cantidad necesaria, para obtener una pasta fluida licuable y posteriormente se filtra el sólido, se vuelve a licuar en las mismas condiciones y así sucesivamente, hasta tener la celulosa libre de pigmentos.

3.3 PREPARACION DE CONCENTRADOS DE COLORANTE COMO MEZCLA POR FERMENTACION.

Antes de llevar a cabo la fermentación del jugo de betabel cuantitativamente, se realizaron algunas pruebas cualitativas de fermentación con cinco microorganismos: 4 levaduras y un hongo. Las condiciones necesarias para su crecimiento, durante 24 hrs. de fermentación están dadas en la siguiente tabla. Y los resultados se muestran en la (página 64).

Microorganismos usados en la fermentación del jugo de betabel.

Microorganismo	Condiciones de Fermentación	
	pH	T (°C)
1. Cándida Utilis	5.4	29
2. Hansenula	5.5	37
3. Levadura Metanólica	4.8	37
4. Cándida Boidini	5.0	37
5. Neurospora Crassa HONGO	5.5	29

b. El proceso de extracción y fermentación del jugo de betabel fué el siguiente:

Se pesó un Kg. de betabeles pequeños de 6 cm de diámetro lavados de la variedad Crosby's Egyptian, éstos se cortaron en cubos y se molieron en licuadora utilizando un total de 2.5 litros de agua, para eliminar todo el

colorante del bagazo. Se adicionó ácido ascórbico (100 ppm), durante la molienda y el jugo se centrifugó a 12,000 rpm. durante 30 min., hasta clarificarlo (igual que en el procedimiento a).

Al extracto ya clarificado se le adicionan 10 ml. de antiespumante (emulsión de silicón no iónica-acuosa), para prevenir la espuma durante la fermentación, lentamente se le adiciona el inóculo líquido fresco. El inóculo líquido se preparó de la siguiente manera: Primero se resembraron las células de levadura *Cándida Utilis* en cajas de Petri (Nota 5). Se prepararon medios de cultivo sólido en cajas de Petri, puesto que se necesitan células jóvenes para inocular el jugo. El medio sólido preparado fué el siguiente: 2 g/litro de extracto de levadura, 5 g/litro de NaH_2PO_4 , 2 g/litro de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 g/litro de sacarosa y bacto agar al 15%.

Se prepararon 250 ml de medio de cultivo líquido con agar al 15%, a pH 5.4 y se esterilizó en autoclave a presión para evitar contaminaciones, de ésta manera se fueron preparando las cajas de Petri con el medio de cultivo sólido. Se dejaron solidificar las cajas lentamente, un día y posteriormente se resembraron las células de

Nota 5 Las células de levadura y de hongo, fueron proporcionadas por el Departamento de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, así como las instalaciones, equipo y su asesoría.

levadura y de hongo y se dejaron crecer 24 hrs. en un cuarto a 30°C. Ya crecidas las células jóvenes, se transfieren a matraces conteniendo medio de cultivo líquido estéril a pH 5.4. El medio usado fué el siguiente: 50 g/l de sacarosa, 2 g/l extracto de levadura, 5 g/l de NaH_2PO_4 y 2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para fermentar un Kg de betabeles, se preparó un matraz de 500 ml con 250 ml de medio líquido estéril, se inocula este medio con células de levadura al 10% y se deja con agitación un día a temperatura de 30°C.

En la fermentación, el inóculo líquido debe usarse recién preparado. Para la fermentación del jugo, con la levadura *Cándida Utilis*, se extrajeron 100 g de betabeles de la variedad Crosby's Egyptian de acuerdo al procedimiento ya descrito y se le adicionaron 25 ml de inóculo, conteniendo las células de levadura al 10%. Durante la fermentación la temperatura se mantuvo a 30°C, agitación mecánica constante y aereación (Nota 6).

De esta manera se fueron sacando muestras de 10 ml cada 2 hrs. durante 8 hrs. de fermentación y cada 12 hrs. durante 60 hrs. de fermentación.

Nota 6 Durante la fermentación, se controlaron las siguientes condiciones: Agitación 200 rpm, empleando un agitador mecánico con radio de giro de 0.15 in., y aereación de 3/4 partes de aire por volumen de cultivo.

Las células de microorganismos se separaron por el proceso de centrifugación y se evaporaron por destilación a 30°C y 10 mmHg, hasta obtener un polvo fino, el cual se analizó en cada caso, determinando % de sólidos totales, % de betacianinas, pH y volúmen empacado de células. Los resultados se muestran en la (página 66).

Para la fermentación del jugo con *Neurospora Crassa*, se extrajeron 119.4 g de betabel de la variedad Crosby's Egyptian, de acuerdo al proceso ya descrito y luego se le adicionaron 25 ml de inóculo líquido con las células de *Neurospora*, preparado de la misma manera, usada con la levadura *Cándida Utilis*. Durante la fermentación se mantuvo la temperatura a 29°C y agitación 200 rpm, así se fueron sacando muestras de 10 ml cada 12 horas de fermentación.

Los resultados del análisis realizado en cada una de las muestras se muestran en la (página 70).

3.4 DIVERSOS METODOS ANALITICOS PARA SEPARAR CONCENTRADOS DE COLORANTE.

La Cromatografía por Filtración Molecular, se utilizó para separar y purificar los colorantes, se llevó a cabo, usando como soporte Sephadex³⁵,

El Sephadex G-25 fino, antes de montarse se sometió a un tratamiento de preciclado, ya que está contaminado con productos secundarios de síntesis y reactivos no eliminados, a pesar de lo que digan las casas que lo fabrican. La resina se sometió al proceso de hinchamiento, es decir hidratación de la resina. Se pesaron 100 g de resina y se suspendieron en 500 ml de agua destilada, se dejó 24 hrs. a temperatura ambiente, sin agitar para evitar la formación de finos. Después se eliminó el CO₂, deareando la suspensión con agitación y vacío suficiente para desprender burbujas, con 5 ó 10 min., se logra eliminar el CO₂, el cual tiene gran afinidad por la resina, pero tiene la desventaja de que baja su capacidad de absorción. Después se eliminan las partículas muy pequeñas de resina (finos), que son capaces de tapar el filtro, disminuyendo notablemente el flujo. Durante la eliminación de finos, la resina se equilibró con buffer de fosfatos 0.025 N a pH 5, la concentración de buffer usada fué la siguiente: 0.83 g/l de NaH₂PO₄⁻ y 0.17 g/l de Na₂HPO₄⁼.

Después se empaqueta la columna, se drena con buffer, se aplica el polvo de betabel en solución, obtenido por

el proceso a ó b (páginas 42 y 44), y se deposita suavemente con una pipeta pasteur, teniendo cuidado de no perturbar la parte superior del gel. Se drena la columna, hasta ir sacando las diferentes fracciones de pigmentos contenidos en el betabel. Se usaron como eluyentes; buffer de fosfatos a pH 5 ó agua y CH_3COOH al 1%.

Separación de Betalainas.

En una columna de 1.6 cm de ancho y 48 cm de longitud, conteniendo como soporte Sephadex G-25 fino (10 g) y usando como eluyente buffer de fosfatos 0.025 M a pH 5. Se aplicó 1 ml de una solución al 15% de polvo de betabel (proceso b), las fracciones eluidas de la columna fueron las siguientes:

La primera fracción fué una solución amarillo-café 22 ml que representa una mezcla de compuestos de alto peso molecular, éstos constituidos principalmente de polisacáridos y proteínas.

La segunda fracción fué una solución rojo-café 15 ml, que representa una mezcla de compuestos de alto peso molecular con pequeñas cantidades de colorante.

La tercera fracción fué una solución rojo-violeta 50 ml, conteniendo los pigmentos de bajo peso molecular (betacianinas). λ máx. 538 y 546 nm.

La cuarta fué una solución rosa-amarilla 20 ml, que es una mezcla de pigmentos prebetanina y vulgaxantina-I. λ max. = 540 y 477 nm.

La quinta fracción fué una solución amarilla 5 ml, compuesta del pigmento vulgaxantina-II, λ max 477 nm.

La separación del extracto acuoso (proceso a.), se realizó de la misma manera, los rendimientos obtenidos de esta separación (procesos a. y b.), se comentan en la (página 74).

Separación de Betacianinas.

La separación de los colorantes, también se puede realizar usando otros disolventes como son: agua y CH_3COOH al 1%. En una columna de 5 cm de diámetro y 65 cm de longitud, conteniendo Sephadex G-25 fino (100 g) y usando como eluyente agua destilada, se aplicaron 10 ml de una solución al 15% de polvo de betabel (proceso b.) la tercera fracción rojo violeta (350 ml), eluida de la columna, se concentró en un rotavapor a 25°C y 10 mmHg de presión, hasta un volúmen de 20 ml. A éste concentrado se le ajustó el pH a 2.9 con CH_3COOH concentrado y se aplicó nuevamente a la columna usada anteriormente con la excepción de que el eluyente fué CH_3COOH en agua al 1%.

Se eluyeron 3 fracciones de la columna: la primera fué de color rojo intenso (100 ml), conteniendo la betanina. La segunda fué de color violeta (200 ml), -- conteniendo la betanidina e isómeros. La tercera de color rosa (30 ml), conteniendo la prebetanina e isómeros. La fracción roja de betanina se ajustó a pH 1.0, se evaporó y se llevó a un desecador a 4°C , para cristalización.

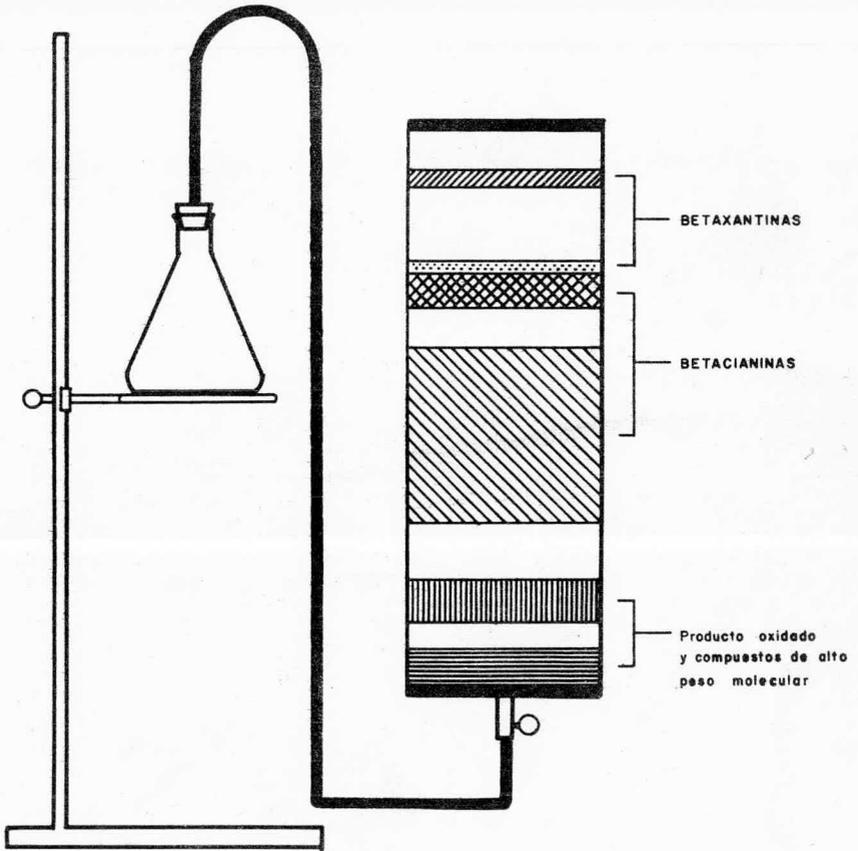
La columna con la resina Sephadex, puede ser utili-

zada varias veces, antes de que el gel requiera el tratamiento de preciclaje. Sin embargo, se recomienda lavar la columna con 5 volúmenes de NaCl 1.0 M cada ocasión que se pretenda usar. Después del tratamiento con NaCl, se equilibra la columna con el buffer, pasando 10 volúmenes de éste. La resina usada se recupera de la columna y se hace el tratamiento de preciclaje: hinchamiento, lavado con ácido o álcali (HCl 0.5 N, NaOH 0.5 N), ajuste del pH con el buffer deseado y eliminación de finos.

La resina se almacena a 4°C con preservativo (azida de sodio al 0.03%), para evitar el crecimiento de microorganismos.

Se recomienda, que nunca se deje secar la resina y siempre se debe almacenar hidratada. En el esquema No. 1, se observa esta separación.

Esquema No. 1



3.4.2 Cromatografía en Placa Fina.

Se prepararon placas para cromatografía, usando como adsorbente celulosa. Se aplicaron 0.04 ml de concentrado b., sobre la placa, ésta se dejó correr, usando como eluyente, solución buffer de fosfatos 0.025 M a pH de 5.

Se observaron 3 fracciones: La primera es de color café-amarillo la segunda es de color violeta y la tercera es roja-amarilla, estos colorantes se identificaron por espectroscopía en el visible y los resultados se mencionan en la (página 75).

Para la cromatografía líquida de alta presión³⁶, se empleo un aparato Perkin-Elmer, modelo 601 con bomba de 3000 PSI y con una válvula de inyección, Rheodyne modelo 7105. Un detector de longitud de onda variable Perkin-Elmer modelo -LC-55. Un registrador Perkin-Elmer modelo 023.

Las condiciones isocráticas para el análisis de betalainas fueron:

Columna: (Octadecil SIL-X-I) (ODS-SIL-XI) 0,26 x 25 cm (Perkin Elmer 0.890706).

Fase móvil: Reactivo PIC-A Nota 7, 0.005 M en agua-metanol 90:10.

Temperatura de la Columna: Ambiente y se aumento a 45°C.

Velocidad de flujo: 60 ml/h y se aumentó a 120 ml/h.

Presión interna: 600 PSI.

Velocidad de la carta: 12 in/h.

Detector: Perkin-Elmer.

Cantidad de muestra inyectada: 5 μ l y 10 μ l

Concentración de muestra, conteniendo betacianinas
y betaxantinas=3.88 ml/10 ml.

Nota 7 PIC A= Hidróxido de Tetrabutíl-amonio.

3.4.3 Electroforesis en Papel.

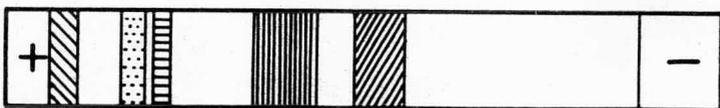
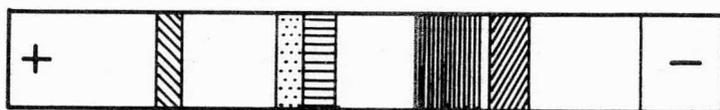
El proceso de electroforesis, fué usado por Nilsson³¹ y Von Elbe³². Se empleó un aparato de electroforesis No. 324330 BECKMAN, para el uso de microzone modelo R-100, se aplicaron 0.02 ml de concentrado b. (una gota), sobre la tira de papel filtro Whatman No.1 de 3.8 cm de ancho y 30 cm de largo. La cual se humedeció con buffer de fosfatos Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 0.1 M a pH 5.5.

Los extremos de éstas tiras se sumergen en los recipientes del aparato, que contienen los electrodos y el -- buffer usado y se aplica un campo eléctrico, de 0.52 mA/cm a temperatura de 23°C, se deja correr la muestra durante 3 hrs.

Se probaron los sistemas de buffer de sales, a diferentes valores de pH y molaridad y fueron los siguientes:

1. Citrato de sodio 0.15 M a pH 4.5
2. Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 0.1 M a pH 5.5
3. Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 0.1 M a pH 6.8

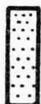
En el dibujo, se ilustra la separación de los colorantes, en diferentes sistemas buffer.



VULGAXANTINA II



BETANIDINA ISOBETANIDINA



VULGAXANTINA I



BETANINA ISOBETANINA



PREBTANINA

3.5 IDENTIFICACION Y ANALISIS CUANTITATIVO DE BETALAINAS POR ESPECTROSCOPIA UV-VISIBLE.

Para identificar los colorantes del betabel, así como también para determinar la concentración de betacianinas, presentes en las muestras comerciales, en las muestras preparadas por los procesos a. ó b. y en las distintas fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular, se usó el método por espectroscopía de UV-Visible³⁴, empleando los espectrofotómetros del tipo Perkin-Elmer 202 y Perkin-Elmer Hitachi-200 y utilizando la siguiente formula. los resultados se comentan en la (página 77),

$$A = \epsilon \times l \times c$$

$$\epsilon = \frac{A \times PM}{l \times c}$$

$$\epsilon = \frac{A \times PM}{\text{cm g/l}}$$

$$\% \text{ colorante} = \frac{\epsilon \times 100}{\frac{1\%}{\text{cm}}}$$

A= Absorbancia

l= Longitud de la celda (1 cm,)

c= Concentración de la muestra en g/l

PM= Peso molecular de la betanina= 550.22 y

betanidina= 388.14 y vulgaxantina-I= 353

$\frac{1\%}{\epsilon}$ = Coeficiente de extinción teórico para betanina con λ máx. a 537-538 nm. = 60500 y para betanidina con un máximo de absorción a 542-546 nm= 49400.

El % de recuperación de colorante es importante, para poder determinar la pureza y recuperación de colorante, después de haberlo sometido a un proceso de extracción. De esta manera se calculó el % de recuperación del concentrado preparado por el proceso b. fermentación por la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \text{\% de recuperación de} \\ \text{colorante} &= \frac{\text{g obtenidos} \times \epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ obtenida} \times 100}{\text{g iniciales} \times \epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} \text{ inicial}} \end{aligned}$$

$$\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{A}{c(\text{g}/100\text{ ml}) \times 1}$$

% de recuperación de colorante sometido al proceso b. fermentación, durante 24 hrs. = 114

3.6 SIMULACION DE UN PROCESO, PARA EXTRACCION EXHAUSTIVA DE LOS COLORANTES DEL BETABEL.

Dado que los resultados, hasta ahora son satisfactorios en cuanto al contenido de colorante en los diferentes sólidos obtenidos, estabilidad y aspecto. Se pensó que se debían realizar algunas determinaciones, tendientes a realizar la extracción de los colorantes, mediante un proceso diferente al ya descrito (nivel laboratorio). Una de las diferencias importantes es que la eliminación del agua, no se haría destilando al vacío, porque es un proceso demasiado costoso, sino mediante el uso de un evaporador Flash. Para el empleo de un evaporador Flash, se requiere utilizar una solución con un mínimo de 14°Bx, por lo que se debieron realizar los siguientes experimentos, simulando una extracción exhaustiva de los colorantes del betabel, como a continuación se describe.

Se molieron 100 g de betabel con 250 ml de agua destilada, se filtro y al filtrado, se le determinaron los °Bx. Este filtrado se usó para extraer el colorante de 100 g más de betabel, es decir se molieron con el jugo diluido, se filtró y al filtrado se le determinaron los °Bx, a su vez éste filtrado, se usó para moler otros 100 g más de betabel y se determinó °Bx, los del nuevo filtrado, así obtenido, etc., hasta que la densidad permaneció constante los resultados obtenidos se muestran en la (página 78).

3.7 DETERMINACION DEL VOLUMEN DE AGUA Y NUMERO DE EXTRACCIONES REQUERIDAS, PARA AGOTAR UNA MUESTRA DE BETABEL

Se hicieron las siguientes determinaciones hasta agotar el colorante presente en el bagazo de betabel.

1. 60.4 de betabel color rojo morado. Se molieron con 100 ml de agua, se filtraron y de esta manera se determinó el °Bx = 3.
2. El bagazo de betabel se molió nuevamente con 50 ml de agua, se filtró y se determinó el °Bx y fué de 1.
3. El bagazo se molió con 50 ml de agua se filtró y se hizo la lectura correspondiente de °Bx, aunque no se alcanzo la lectura, pues la escala fué muy pequeña.
4. El bagazo se molió con 50 ml más de agua y se filtró.
5. El bagazo nuevamente se molió con 100 ml de agua, se filtró, observando que el color de este fué café-amarillento.

Se usaron 350 ml de H₂O, para extraer el colorante que queda retenido en el bagazo del betabel (60.4 g). Para 1 Kg de betabel se deberían usar 5.79 litros de H₂O, para extraer todo el colorante del bagazo.

3.8 CONCENTRACIONES OPTIMAS DE CONCENTRADOS DE BETABEL, USADOS EN GELATINAS,

Los concentrados de colorante elaborados por los procesos a. y b. se usaron, para colorear gelatinas de sabor uva y frambuesa, se probaron las siguientes concentraciones de concentrados: 48 ppm, 100 ppm, 200 ppm y 2000 ppm, en gelatinas sin color y las tonalidades se compararon con estándares de gelatinas con colorante sintéticos como son rojos núms. 5 y 40. Así mismo se determinó la absorbancia en cada uno de ellos, los resultados se muestran en la -- (página 79). Estos valores se obtuvieron en un espectrofotómetro de UV-Visible del tipo Perkin-Elmer Hitachi-200.

IV. RESULTADOS Y SU DISCUSION

En la tabla No. 6 se presentan los resultados de las muestras comerciales estudiadas.

Tabla No. 6

Muestras Comerciales	Betacianinas (%)	Humedad (%)	λ máx. (nm)
Deco	0.32	4.5	538 y 477
Aditivo con betabel			
No. 4003	0.30	4.5	538 y 477
Betatom No. 180	0.35	4.0	538
No. 1728 Polvo de jugo de betabel	0,25	3,5	538

Las muestras comerciales Deco y aditivo con betabel No. 4003, se constituyen de un polvo rojo muy colorido que contiene, los sólidos del betabel como son; carbohidratos, proteínas, minerales, estabilizadores y colorante, debido a esto no son 100% solubles en H_2O , como se muestra en la tabla contienen respectivamente 0.32 % y 0.30 % de betacianinas, en la figura No. 10-a, se observa su espectro en el visible y presentan dos máximos de absorción, uno a 538 y 477 nm característicos de las betalainas. Su precio es de \$34.50/453 g (1.50 dólares por libra), mientras que el - - precio del colorante sintético FD&C rojo No. 40 es de - - \$195.50/453 g (8.50 dólares por libra).

Para las muestras Nums. 1728 polvo de jugo de betabel y betatom 180 polvo de betabel rojo secado por spray, estuvieron elaboradas con el jugo de betabel parcialmente purificado, presentaron un color rojo y violeta débil, proceso que las hizo completamente solubles en agua y con contenidos respectivamente de 0.25 y 0.35 % de betacianinas. En la figura 10-b, se observa su espectro en el visible, presentando un solo máximo de absorción a 538 nm característico de las betacianinas.

Obtención de Concentrados de Colorante en Forma de Mezcla.

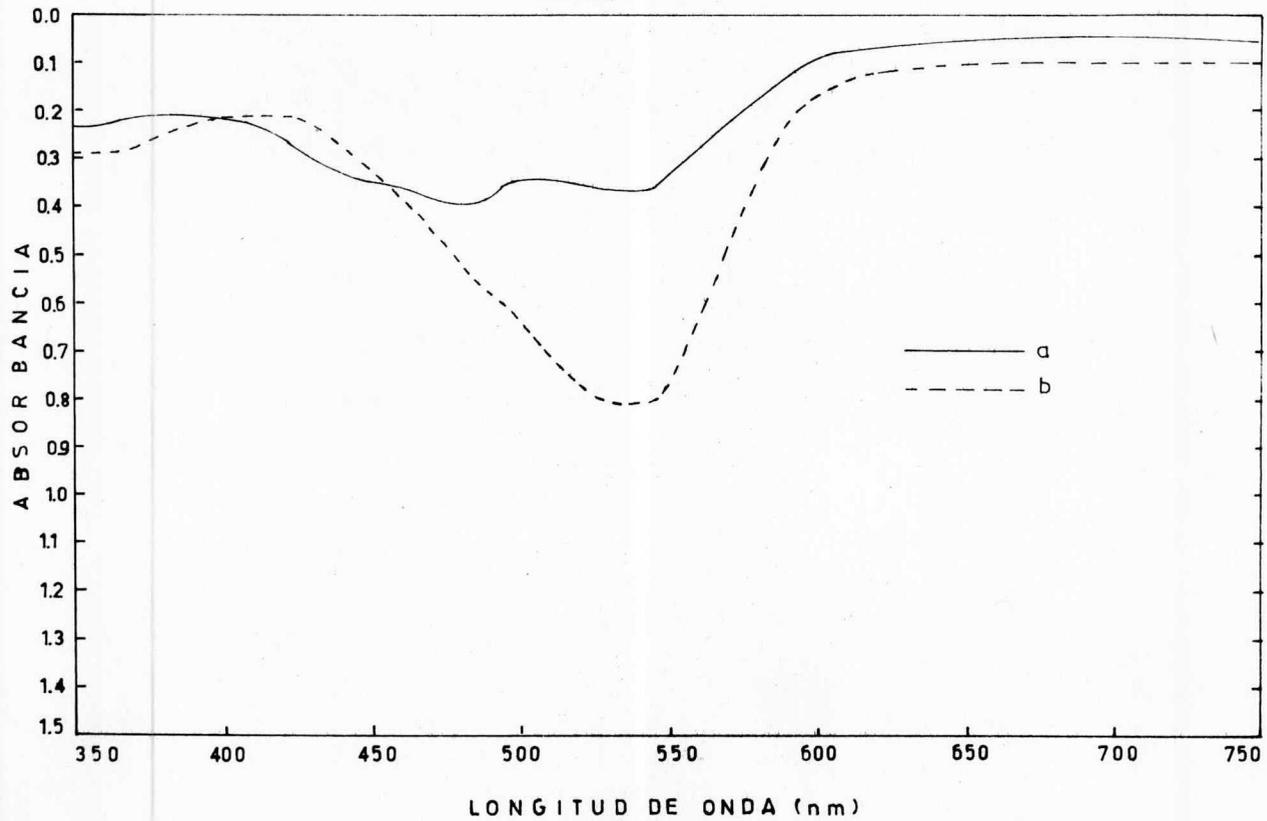
a) Extracción acuosa.

En la tabla No. 7 se muestran los resultados obtenidos en la preparación de concentrados de colorante, por el proceso a.

Tabla No. 7

Variedad de betabel	Sólidos Totales g/Kg de betabel	Betacianinas	
		(%)	y (g/Kg)
Crosby's Egyptian	89.7	0.32	0.28
Perfect-Detroit	96.5	0.35	0.33
Betabel comercial no clasificado	113.5	0.38	0.43

FIGURA 10



En la tabla se puede observar, que hay una gran variación en los resultados atribuible a que se tienen antecedentes⁴⁷, de que la concentración de pigmento varía y depende de la variedad utilizada, edad, tamaño, cultivo y tiempo de cosecha del betabel.

Los concentrados obtenidos en medio acuoso de las variedades Crosby's Egyptian, Perfect-Detroit y betabel comercial (no clasificado), son similares a las muestras comerciales; Deco y Aditivo No. 4003, en su contenido de betacianinas y su espectro, pues presentan dos máximos de absorción uno a 540 característico de las betacianinas y otro a 477 característico de las betaxantinas. Pero su textura es distinta, pues es un polvo mucho más soluble en agua, su color es rojo intenso y bastante más higroscópico.

b) Concentrados de Colorante por Fermentación.

Debido a que la concentración de colorante es baja - (0.2-1%) en el jugo de betabel, se necesitan adicionar grandes cantidades de colorante a los alimentos, para obtener el tono deseado. Por esta razón se preparó un concentrado fermentado de betabel con la ayuda de un microorganismo -- (levadura *Cándida útilis*), para disminuir sólidos totales e incrementar la concentración de betacianinas, además los concentrados obtenidos por fermentación son más estables que los obtenidos en forma acuosa.

Al establecer la colaboración con los investigadores del Instituto de Investigaciones Biomédicas, para llevar a cabo la fermentación, nos indicaron que disponían de algunas

otras cepas de microorganismos, que valdría probar en la fermentación del jugo de betabel. De ésta manera se seleccionaron cinco microorganismos, cuatro levaduras como son: *Cándida útilis*⁴⁸, *Hansenula*, levadura metanólica y *Cándida Boidini* y el hongo *Neurospora Crassa*⁴⁹. Los resultados de las pruebas cualitativas llevadas a cabo durante 24 hrs. de fermentación del jugo del betabel, están dados en la tabla No. 8

Tabla No. 8

Microorganismos	Condiciones de fermentación		Crecimiento en el jugo de betabel	Degradación del color
	pH	T (°C)		
<i>Cándida útilis</i>	5.4	29	+	-
<i>Hansenula</i>	5.5	37	+	+++
Levadura metanólica	4.8	37	+	+++
<i>Cándida Boidini</i>	5.0	37	+	+++
<i>Neurospora Crassa</i>	5.5	29	+	---

Se observó que todos los microorganismos usados, tienen un desarrollo positivo en el jugo durante las 24 hrs. de fermentación. De las cuatro levaduras usadas, la que dió mejores resultados con el jugo de betabel fué la *Cándida útilis*, puesto que no degrada al colorante, mientras que las demás asimilan; tanto sólidos totales como colorante.

Para el caso del hongo *Neurospora Crassa*, se observa que hay crecimiento de células en el jugo, pues asimilan - -

rápidamente los sólidos totales, pero lamentablemente hay degradación del color a medida que aumenta el tiempo de fermentación. Posteriormente se realizaron pruebas cuantitativas del progreso de la fermentación del jugo, utilizando dos microorganismos como consecuencia de las pruebas cualitativas realizadas, como son; levadura *Cándida útilis* y hongo *Neurospora Crassa*.

Para llevar a cabo la fermentación, se tuvieron que buscar las condiciones óptimas como son: la preparación del inóculo líquido, agitación, aereación y tiempo de fermentación, ya que las descritas en trabajos similares no funcionaron satisfactoriamente. Después de fermentar el jugo se separaron las células y se evaporó el agua hasta obtener un sólido, determinando en cada una de las muestras sacadas, durante 60 hrs. de fermentación; % de sólidos totales, pH, volumen de células y % de colorante, los resultados de éste análisis realizado se muestran en la tabla No. 9. Se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de fermentación, el valor de pH disminuye de 6.2 inicial, hasta llegar a 2.9 a las 60 hrs. de fermentación.

Por lo que fué necesario, controlar el valor de pH a 5 con soluciones de NaOH al 7% ó HCl al 5% según se requiera. Para observar el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación, se sacaron muestras al principio; cada dos horas y luego cada 12 hrs., hasta un total de 60 hrs. de fermentación. Después de éste tiempo por centrifugación del jugo, se determinó el volumen empacado de células (tabla No. 9). De los datos mostrados, se puede observar que sí hubo crecimiento de células. Estos

valores de volumen empacado se graficaron contra su respectivo tiempo de fermentación, en la figura No. 11 se observa la curva de crecimiento de células.

Tabla No. 9

Tiempo de Fermentación* (horas)	pH	Sólidos Totales (g/8 g)	Volumen Empacado de Celulas (ml)	% Colorante (betaciani- nas)
Jugo fresco sin fermentar	6.2	0.7431	-	0.32
T = 0	5.2	0.7124	0.02	0.34
T = 2	5.1	0.6783	0.024	0.38
T = 4	4.9	0.5914	0.04	0.40
T = 6	4.5	0.4849	0.06	0.53
T = 8	4.0	0.3740	0.07	1.01
T = 12	3.8	0.29	0.07	2.50
T = 24	3.6	0.23	0.08	3.8
T = 36	3.5	0.19	0.1	6.28
T = <u>48</u>	3.0	0.10	0.2	8.4
T = 60	2.9	0.07	0.21	-

* Volumen de la muestra = 10 ml.

En la tabla No. 9 se muestran los valores obtenidos durante la fermentación con levadura *Cándida útilis*; el jugo de betabel fresco original (10 ml), contiene 0.741 g de sólidos y 0.32% de betacianinas, ésta muestra presenta dos máximos de absorción; uno a 538 nm betacianinas y otro a -

477 nm betaxantinas (Figura No. 13-a).

A las 8 hrs. de fermentación contiene 0.3740 g de sólidos totales y 1.01% de betacianinas, presentando aun dos máximos de absorción (Figura No. 13-e), solo que de intensidades diferentes a la muestra original.

A las 24 hrs. de fermentación, contiene solo 0.23 g de sólidos y 3.8% de colorante, su color es rojo violeta intenso y se observa un solo máximo de absorción a 545 nm característico de la aglucona betanidina (Figura No. 13-f).

A las 36 hrs. contiene solamente 0.19 g de sólidos y 6.28% de betacianinas, presentando un solo máximo a 545 nm.

A las 48 hrs. contiene 0.10 g de sólidos y 8.4% de betacianinas, pero ahora se pueden observar nuevamente dos máximos de absorción uno a 545 nm y otro a 477 nm (Figura No. 13-g).

En resumen se puede decir, que a medida que aumenta el tiempo de fermentación disminuyen los sólidos totales e incrementa la concentración de betacianinas, como consecuencia de la hidrólisis producida por enzimas de la levadura.

En la figura No. 12 se observa una gráfica, conteniendo el % de betacianinas y sólidos totales, como función del tiempo de fermentación.

Figura No. 11

Curva de Crecimiento de Células de Levadura *Cándida* útilis, durante 60 hrs. de fermentación.

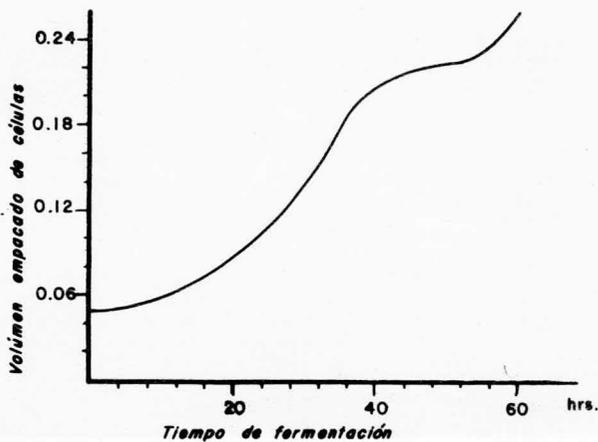


Figura No. 12

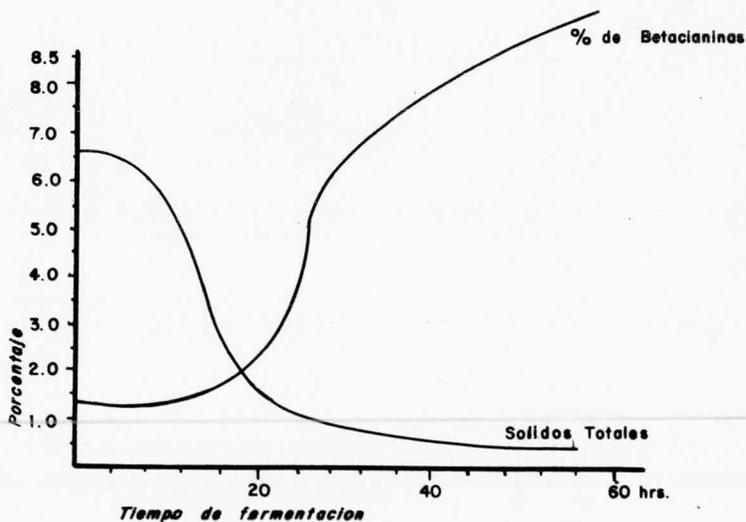
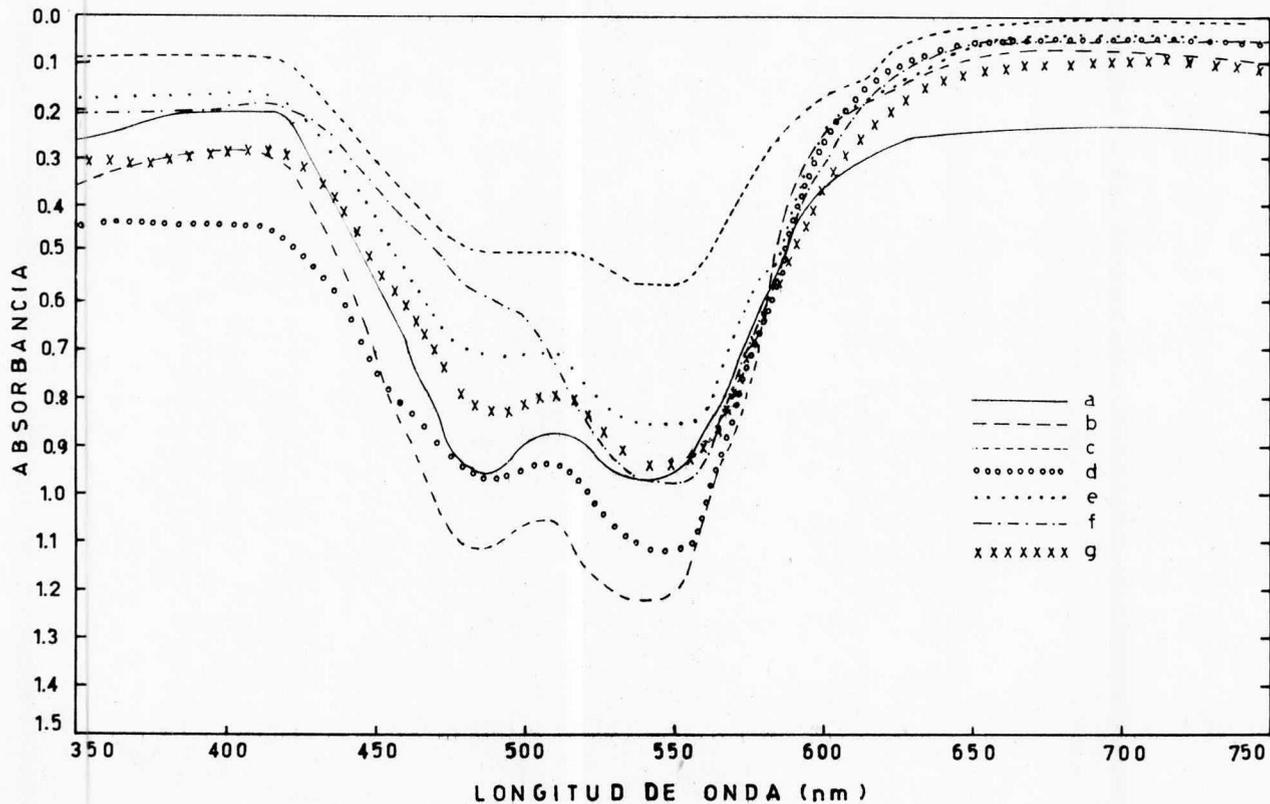


FIGURA 13



Finalmente, el jugo de betabel de la variedad Crosby's Egyptian, fermentado durante 8, 24 y 48 horas con levadura *Cándida útilis* produce un sólido que a las 8 hrs. de fermentación pesó 46.75 g de sólidos/Kg de betabel, conteniendo 1.019% de betacianinas (0.47 g/Kg de betabel).

A las 24 horas, se obtienen 21.80 g de sólidos totales/Kg, que contiene 3,8% de betacianinas (0.82 g/Kg de betabel) y 114% de recuperación (página 57).

Y para el jugo fermentado durante 48 horas se obtuvo un rendimiento de 12.50 g de sólidos/Kg, que contiene 8.4% de betacianinas (1.05 g/Kg de betabel).

En 1976, Adams y Von Elbe⁴⁶, realizaron un análisis del jugo de betabel antes y después de la fermentación anaeróbica con levadura *Cándida útilis*, bajo las siguientes condiciones: para un litro de jugo, temperatura de 30°C y pH 5. Los resultados por ellos obtenidos fueron, los que se muestran en la siguiente tabla.

Muestra	Sólidos Totales (mg/g)	Betacianina % S. T.
Jugo inicial	71.4	1%
Después de la fermentación	12.7	5.1%

Tales investigadores mencionan que los resultados anteriores, se obtienen después de 6.30 hrs. de fermentación, pero se comprobó experimentalmente que el tiempo --

necesario de fermentación, para reducir sólidos totales fué después de 24 horas.

También se probó la fermentación del jugo de betabel, utilizando el hongo *Neurospora Crassa*. Los resultados están dados en la tabla No. 10.

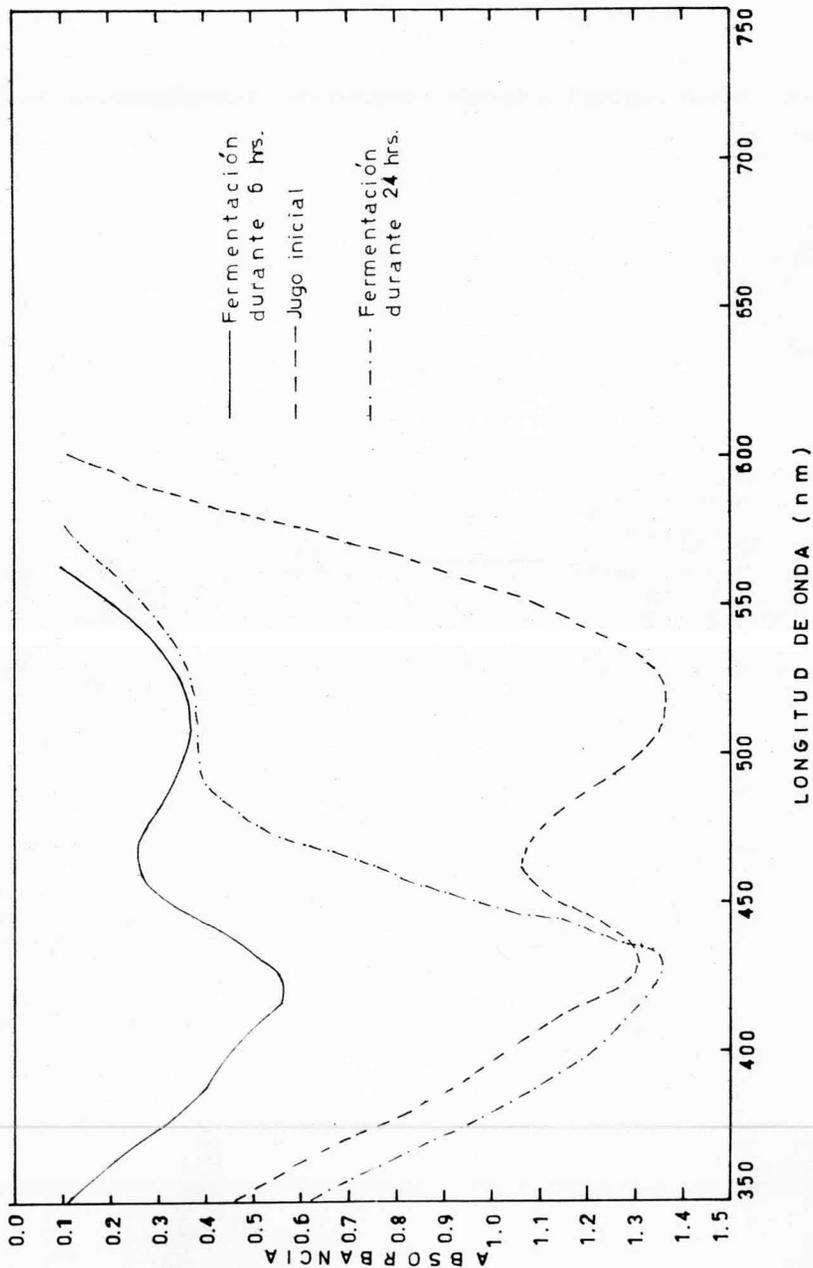
Tabla No. 10

Tiempo de Fermentación* (hrs.)	Sólidos Totales (g/2.4 g)	Volumen empacado de Células (ml)	pH	% de Betacianina
Jugo fresco sin fermentar	0.2430	-	5.65	0.38
T = 0	0.2424	0.5	5.0	0.25
T = 30 min.	0.2372	0.61	5.0	0.23
T = 1	0.2356	0.75	5.0	0.23
T = 2	0.2245	0.80	4.9	0.19
T = 3	0.2103	0.95	4.9	0.19
T = 6	0.19	1.5	4.85	0.15
T = 12	0.110	1.7	4.8	0.10
T = 24	0.071	1.8	6.1	-
T = 36	0.056	2.0	6.2	-
T = 48	0.051	2.1	6.2	-
T = 60	0.02	2.3	6.2	-

* Volumen de la muestra = 10 ml.

Se puede observar en ésta tabla, que a medida que --

FIGURA 14



aumenta el tiempo de fermentación, aumenta el valor de pH hasta llegar a 6.2, por lo que fué necesario controlarlo a pH 5. Con respecto al crecimiento, se ve que se adapta el hongo facilmente al jugo de betabel, puesto que crece muy rápido. Con respecto a los sólidos totales y % de betacianina en la tabla No. 10 se encuentran los valores obtenidos durante la fermentación. Se observa que el jugo fresco contiene 0.2430 g de sólidos/2.4 g y 0.38% de betacianinas. A las 60 hrs. de fermentación, contiene 0.02 g de sólidos/2.4 g de muestra y el colorante no se pudo determinar, puesto que las muestras estaban completamente oxidadas (Figura No. 14). Se concluye que, a medida que aumenta el tiempo de fermentación, disminuye notablemente el % de betacianinas.

Después de realizar una prueba, con el jugo de betabel solo sin inocular es decir sin transferir un microorganismo al jugo, se dejó incubar a 30°C y agitación mecánica durante 24 hrs. con la flora contenida en el jugo - Nota 8. Después de éste tiempo, el jugo se oxidó completamente de color rojo a café brillante, no se estableció si esta oxidación es debido a la flora natural del jugo o a un proceso enzimático. Esto nos indica que es necesario usar un microorganismo para llevar a cabo la fermentación sin degradar al colorante.

Nota 8 El jugo no esterilizó en autoclave, porque el colorante se oxida.

Los concentrados obtenidos por fermentación de la variedad Crosby's Egyptian, superan en todos aspectos a las muestras comerciales importadas. Por ejemplo su contenido de betacianinas se incrementó 7 veces más, su textura es distinta (probablemente debido al método de evaporación), es muy soluble en agua, su color es rojo-violeta oscuro y bastante más higroscópica y en su espectro en el visible, se observa la presencia de un solo máximo de absorción a 545 nm (betacianinas) y así mismo, no se observa presencia de betaxantinas.

Obtención de Concentrados de Colorante Parcialmente Purificados.

En la tabla No. 11 se muestran las betacianinas⁵⁰, que absorben en el visible, en un rango de 538-546 nm y las betaxantinas en un rango de 474-485 nm.

Después de la preparación de concentrados de colorante por los procesos a. y b., posteriormente se realizó la separación y purificación de éstos mismos, con el fin de obtener colorantes rojos de diferentes tonos, utilizables en alimentos de distintos sabores.

Debido a lo poco eficientes que resultaron las separaciones cromatográficas por columna (filtración molecular), no se pudo realizar una separación realmente efectiva de los diferentes colorantes, presentes en el jugo de betabel. Tal es el caso de las betacianinas rojo violeta, éstas están constituidas por la betanina roja, la betanidina, isobetanidina, isobetanina (violeta) y la prebetanina e isopre-

betanina (color rosa). Puesto que su máximo de absorción de ellos es muy semejante, no se pudieron identificar todos, salvo algunos colorantes como son: la betanina roja λ máx. a 538 nm y su aglucona betanidina violeta λ máx. a 546 nm, durante la fermentación que es cuando se incrementan ambos colorantes en relación a los sólidos totales.

De las betaxantinas amarillas, se identificaron la vulgaxantina-I y II que absorben a 477 nm.

Tampoco fué posible identificar la estructura de tales pigmentos, por espectroscopía de IR y RMN, ya que las cantidades de colorante puro, son sumamente pequeñas (0.32-5.6% en mezclas de carbohidratos y proteínas), lo más conveniente sería usar otro método de separación después de filtrarla por columna, usando alguna poliamida o una resina de intercambio iónico.

Pero puesto que el motivo de este trabajo es de -- origen práctico-económico, porque su estructura ya está dada en la literatura, se realizó la separación parcial -- de betacianinas rojo-violeta, betanina roja y betaxantinas. En la tabla No. 12, se muestran los rendimientos de colorante obtenidos por el método de exclusión molecular, por los procesos de extracción a. y b.

Se puede observar en la tabla No. 12 que el rendimiento de betacianinas obtenido por el proceso a. (extracción acuosa) fué de 49.6 mg/100 g de betabel, mientras -- que el obtenido por el proceso b. (fermentación), se incrementó hasta 738 mg/100 g de betabel.

La concentración de betaxantinas en el jugo fermentado fué muy pequeña, debido a esto no se pudo determinar,

Tabla No. 12

Concentrado de betabel (variedad Crosby's Egyptian	Betacianinas (mg/100 g)	%	Betanina (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)
a. Extracción acuosa	49,6	0,35	38	28
b. Fermentación (durante 24 hrs.)	738	5,92	-	-

Separación por Electroforesis en Papel.

Para la separación de los pigmentos, por electroforesis en papel de los extractos (a. ó b.) se observó que el buffer más indicado de sales fué el de Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 a pH 5, 0.1 molar, comparado con los demas sistemas buffer.

Estos pigmentos, a causa de sus diferentes valores de PK' , emigraron hacia el ánodo (+) a distintas velocidades, puesto que dependen del valor de pH del sistema y de la fuerza electromotriz aplicada.

En la tabla No. 13, se observa la migración electroforética de cada fracción separada.

Tabla No. 13

Banda	Migración* (cm)	Ancho de la banda* (cm)
Roja	6.0	0.9
Violeta	7.9	1.3
Rosa	11.6	0.4
Amarilla	12.0	0.6
Amarillo brillante	13.5	0.8

*Rango de 7 determinaciones.

Separación por Cromatografía en Placa Fina.

En la cromatografía en placa fina, se pudieron observar tres fracciones: la primera fracción, es de color café amarillo y representa una mezcla de impurezas como son; carbohidratos, proteínas, producto oxidado, etc., la segunda es de color violeta que es la betanidina y algunos isómeros λ 545 nm y la tercera es roja amarilla, que es la betanina y vulgaxantina-I y II λ máx. 538 y 477 nm.

Las fracciones separadas por diferentes métodos fueron identificadas por espectroscopía de visible.

Finalmente, se probó la separación por el método de cromatografía líquida de alta presión observando lo siguiente: Se reprodujo el método de cromatografía líquida de alta presión (con las condiciones mencionadas en la parte experimental), pero no se obtuvo respuesta de los colorantes. Debido a ésto, se variaron las condiciones y

se ajustó la fase móvil a pH 7.6, pero no hubo respuesta.

En la figura No. 15-a, se muestran el máximo de absorción del jugo de betabel fresco con impurezas.

Mientras que en la figura No. 15-b se observa el -- espectro de absorción de la fracción roja del concentrado fermentado y separada por el método de filtración molecular. Presenta un máximo a 538 nm (betanina).

En la figura No. 15-c, se observa el máximo de absorción de otra de las fracciones eluidas de la columna, de color violeta, absorbe a 545 nm (betanidina).

En las figuras Núms. 15-d, e y f se observan respectivamente, la fracción amarilla que presenta un máximo de absorción a 477 nm (betaxantinas). La degradación parcial del pigmento rojo que presenta un color amarillo a 430 nm y la degradación completa que adquiere un color café brillante y no presenta ningún máximo de absorción.

En la tabla No. 14, se muestra la concentración de betacianinas presentes en las muestras comerciales, muestras preparadas: en mezcla y purificadas de betabel.

FIGURA 15

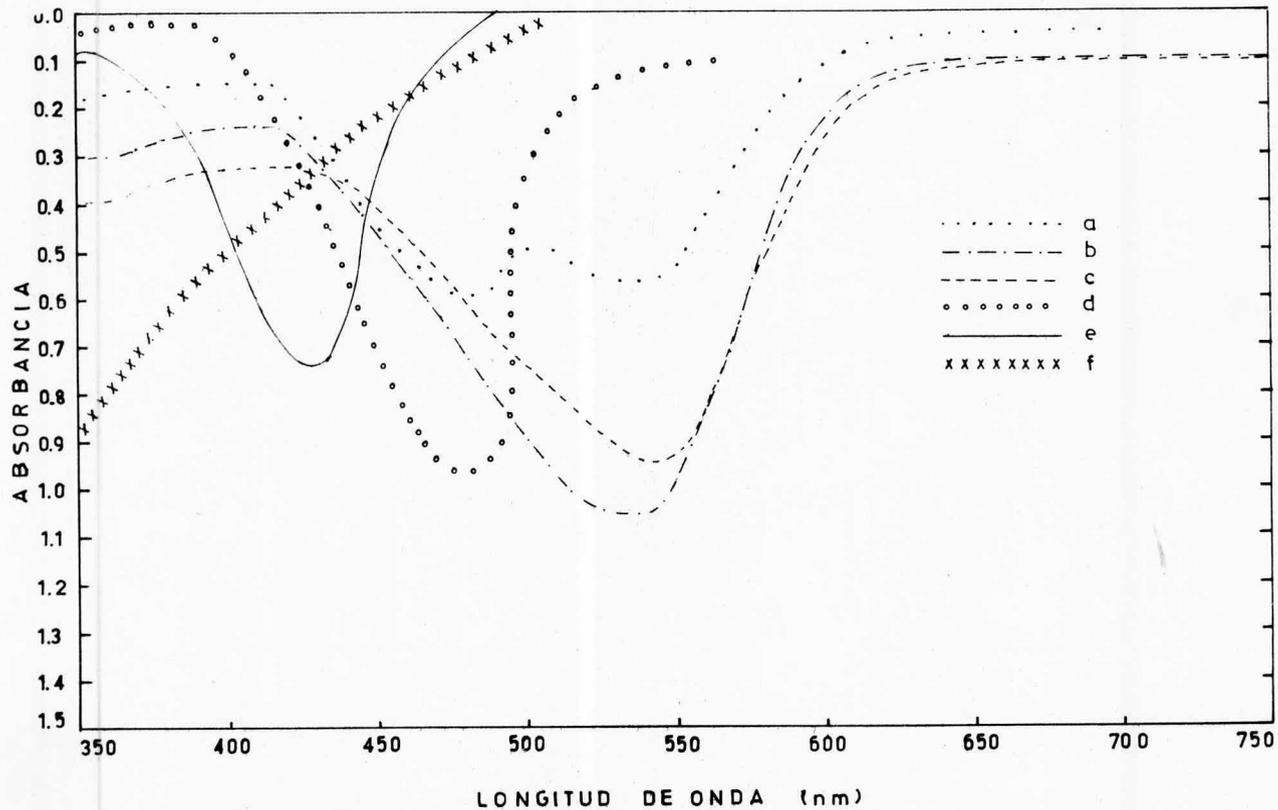


Tabla no. 14

1. Muestras Comerciales:	% Colorante (Betacianinas)
Deco	0.32
No. 1728 Polvo de jugo de betabel	0.25
Betatom No. 180	0.35
Aditivo con betabel No. 4003	0.30
2. Preparación de concentrados en mezcla por el proceso a. (Extra- ción acuosa)	
Variedad Crosby's Egyptian	0.32
Variedad Perfect-Detroit	0.35
Betabel no clasificado	0.38
Por el proceso b. (Fermentación)	
Variedad Crosby's Egyptian fermen- tada durante 24 hrs.	3.8
y durante 48 hrs.	8.4
3. Preparación de muestras separadas por columna.	
Por el proceso a. Variedad Crosby's Egyptian	0.35
Por el proceso b. Variedad Crosby's Egyptian (Fermentada durante 24 hrs)	5.92

En la tabla No. 15 se observan los resultados de la extracción exhaustiva de los colorantes de betabel.

Tabla No. 15

Peso del Betabel (g)	Cantidad de Agua	°Bx	T(°C)
100	250 ml	2.5	24
100	jugo diluído	4.0	26
100	"	5.1	26
100	"	6.1	26
100	"	7.0	26
100	"	7.5	26
100	"	7.5	26
100	"	7.5	26

A los 700 g de betabel, la densidad permaneci6 constante (7.5 °Bx). Esto indica que para incrementar la densidad a los 14°Bx deseados, se tendrían que adicionar dextrinas, como indican las muestras comerciales. En la parte experimental (página 58), se muestra la determinación del volumen de agua y número de extracciones requeridas -- para agotar una muestra de betabel.



En la tabla No. 16, se muestran las concentraciones usadas de colorante en gelatina, así como su correspondiente absorbancia y longitud de onda de los concentrados de betabel, preparados y comparados con los colorantes sintéticos FD&C rojos núms. 5 y 40.

Tabla No. 16

Colorantes	Concentración (mg/ml)	Absorbancia	λ máx. en H ₂ O (nm)
Rojo No. 5 (50 ppm)	1×10^{-2}	1.025	505
Rojo No. 40 (50 ppm)	1×10^{-2}	0.635	500
Concentrados de betabel preparados por los procesos:			
a. Rojo (2000 ppm)	$0,394 \times 10^{-2}$	0.360	538
b. Rojo-violeta (200 ppm)	4×10^{-2}	0.187	545

El concentrado de betabel, preparado por el proceso a. (Extracción acuosa) y con un tono rojo intenso. Se uso en proporción de 48 ppm, 100 ppm y 2000 ppm en gelatinas, la concentración ideal para colorear gelatinas de sabor frambuesa, fué de 2000 ppm.

Mientras que el concentrado de betabel, preparado por el proceso b. (fermentación) y con un tono rojo violeta, -

se usó en proporción de 48 ppm, 113 ppm y 200 ppm en gelatinas, observando que la concentración ideal, para colorear gelatinas de sabor uva, fué de 200 ppm.

También se usaron, los colorantes FD&C, rojos núms. 5 y 40 en gelatinas, para comparar las tonalidades, concentraciones y absorbancia obtenidas, contra los concentrados de betabel.

La concentración necesaria de colorante FD&C rojo No. 40, para colorear gelatinas de sabor mandarina fué de 50 ppm. Mientras que la concentración necesaria de colorante rojo No. 5, para colorear gelatinas de sabor fram-
buesa fué de 50 ppm. En resumen, se puede decir que los concentrados de betabel preparados por los procesos a. y b. son mucho más débiles en fuerza tintoreal, comparados con los colorantes sintéticos FD&C, pero el costo de estos últimos es más elevado (10-20 veces más/Kg).

V. CONCLUSIONES

1. Se prepararon extractos acuosos de las variedades Crosby's Egyptian y Perfect-Detroit de betabel; se -- concentraron por destilación a presión reducida, obteniéndose un residuo sólido higroscópico de color rojo intenso.

2. Se prepararon concentrados fermentados de la variedad Crosby's Egyptian, usando la levadura *Cándida útilis*. En éste proceso se buscaron las condiciones óptimas para lograr la máxima reducción de sólidos totales sin -- afectar la concentración de los colorantes. El residuo de la fermentación ya clarificado, se evaporó obteniéndose un sólido higroscópico de color rojo violeta.

3. Los concentrados por extracción acuosa y posterior fermentación, de la variedad Crosby's Egyptian, se -- sometieron a un proceso de separación por cromatografía -- de exclusión molecular, pudiendo de ésta manera separar betanina, betacianinas y betaxantinas que en sus usos, -- las dos primeras son utilizables para tonos rojo y violeta y la tercera para tonos amarillos.

4. Se compararon los extractos acuosos sin fermentar de las variedades estudiadas con las muestras de extractos comerciales importadas, observándose que presentan características similares, lo que haría a los concentrados obtenidos aceptables en el mercado.

5. Los concentrados obtenidos por fermentación del jugo de betabel, son superiores a las muestras comerciales analizadas, en cuanto a su contenido de betacianinas, textura, solubilidad, color (rojo violeta oscuro) y estabilidad.

BIBLIOGRAFIA

1. ✓ Viades, J., Estudio de los Colorantes Artificiales - FD&C, usados en Alimentos , Tesis Profesional; Facultad de Química, U.N.A.M. (1977).
2. ✓ Mabry T. J. and Dreiding, A. S., In Recent Advances in Phytochemistry I (ed. T. J. Mabry)., Amsterdam., 145-160 (1968).
3. Schudel, G., The Antocyanins of Beta Vulgaris L. and Raphanus Sativus L., Doctorate Dissertation, Eidgenoss Tech. Hochschule, Zurich., 1-64 (1918).
4. Wyler, H. et al., Experientia., 17, 23-25 (1961 a).
5. ✓ Color Index, the Society of Dyers and Colourist, Inglaterra, 2, 2773-2784 and 4, 4027-4597 (1971).
6. ✓ Reglamentos de Aditivos, para Alimentos, Diario Oficial, México, 1-6 (1958).
7. ✓ Code of Federal Regulations (21, Food and Drugs, -- Parts 1-9, revised as of April 15) (1973). The -- Office of the Federal Register, National Archives and Record Service, General Service Administration. Washington, 186-187 (1973).
8. ✓ Kuzio, W., Candy & Snack Industry., 30 and 50 (1977).
9. ✓ Bajguseva, M. M. Vaprosy y Pitaniya, 27, 46-50 (1968).

10. ✓ Federal Register, the office of the Federal Register, National Archives and Record Service, General Service Administration, 41 28, 754 (1976).
11. Ibidem, 41 28, 5824 (1976).
12. ✓ Ibidem, 41 186, 41852 (1976).
13. ✓ Code of Federal Regulations, (cita I, capítulo II), p. 187 (1973).
14. Piattelli, M., et al., Tetrahedron., 20, 2325-2329 (1964).
15. Piatelli, M., et al., Phytochemistry., 4, 121-125 (1965 a).
16. Mabry, T. J., the Betacyanins, and Betaxanthins. In Comparative Phytochemistry (ed. T. Swain)., Academic Press, London, 231-244 (1966).
17. Wilcox, M. E., et al., Helv. Chim., Acta. 48: fasc. 1, 252-258 (1965 a).
18. Piatelli, M. et al., Annali. Chim., 54, 955-962 -- (1965 c).
19. Mabry, T. J. et al., Helv. Chim., Acta 45: fasc. 1, 640-647 (1962).
20. Wyler, H. and Dreiding, A. S., Helv. Chim., Acta 42: fasc. 2, 1699-1702 (1959).

21. Schmidt, O. et al., Chem. Ber., 93, 1296-1304 (1960).
22. Wyler, H. et al., Helv. Chim., Acta 46: fasc. 2, 1745-1748 (1963).
23. Mabry, T. J. et al., Tetrahedron., 23, 3111-3127 - (1967).
24. Badgett, B. et al., Helv. Chim., Acta 53, 433-448 (1970).
25. Wyler, H. et al., Helv. Chim., Acta 18: fasc. 2, - 361-366 (1965).
26. Kimler, L. et al., Chem. Commun., 1329-1340 (1971).
27. Sciuto, L. et al., Phytochemistry., 11, 2259 (1972).
28. Pucher, G. and Curtis, L., Journal of Biological -- Chemistry., 123, 1, (1938).
29. Peterson, R. and Joslyn, M., Food Research., 25, 429 (1960).
30. Piattelli, M. and Minale, L., Phytochemistry., 3, -- 547-557 (1964).
31. Nilsson, T., Lantbrukshogskolans Annaler., 36, -- 179-219 (1970).
32. Aronoff, S. and Aronoff, E. M., Food. Res., 13, -- 59-65 (1948).

33. Peterson, R. and Joslyn, M., *Nature.*, 45, 182 (1958).
34. ✓ Von Elbe, J. H., et al., *Journal of Food Science.* 37, 932-934 (1972).
35. ✓ Adams, J. P. and Von Elbe, J. H., *Journal of Food Science.* 42, 2, 410-415 (1977).
36. Vincent, K. R. and Scholz, R. G., *J. Agric. Food Chem.*, 26, 4, 812-816 (1978).
37. ✓ Powrie, W. and Fennema, O., *J. Food Science.*, 28, 214-220 (1963).
38. ✓ Von Elbe, J. H. and Maing, Y., *Journal of Food Science.*, 39, 334-337 (1974).
39. ✓ Von Elbe, J. H., *Food Technology.*, 29, 5, 42-46 (1975).
40. ✓ Pasch. J. H. and Von Elbe, J. H., *Journal of Food Science.*, 40, 1145-1146 (1975).
41. ✓ Von Elbe, J. H. et al., *Proc. IV Int. Congress Food Sci. and Technol.*, 1, 485-492 (1974).
42. ✓ Von Elbe, J. H. and Maing, I. Y., *Cereal Science Today.*, 18, 9, 263-264, 316-317 (1973).
43. ✓ Von Elbe, J. H. et al., *Journal of Food Science*, 39, 128-132 (1974).

44. ✓ Von Elbe, J. H., Dairy and Ice Cream Field., 161 (3), 60 (1977).
45. ✓ Pasch, J. H. and Von Elbe, J. H., Candy an Snack - Ind., 142 (3), 32 (1977).
46. Adams, J. P. et al., J. Food Sci., 41, 78 (1976).
47. Nilsson, T. and Swedish J., Agric. Res. 3, 187-200 (1973).
48. Cruz, R. J., Estudio Comparativo de Saccharomyces Carbajali con Cándida Utilis, para la Obtención de Biomasa, Tesis Profesional; Facultad de Química, - U.N.A.M. (1977).
49. Dávila, J. G., Obtención y Caracterización de Mutantes Estructurales y Regulatorias de Glutamino Sintetasa en N. Crassa., Tesis Profesional; Facultad de Química, UNAM (1977).
50. Mabry, T. J. and Dreiding, A. S., the Betalains. In Recent Advances in Phytochemistry I (ed. T. J. -- Mabry), Amsterdam, 145-160 (1968).