

108 2ci



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**"AISLAMIENTO E IDENTIFICACION  
DEL COLORANTE DE  
Bougainvillea spectabilis Willd.  
(MAGENTA)**



**FALLA DE ORIGEN**

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**LIDIA ROMANA PEÑA FLORES**



## **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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

## INDICE

INTRODUCCION	1
BUGAMBILIA	4
GENERALIDADES	7
BETALAINAS	14
a) Propiedades	15
b) Extracción	18
c) Usos	19
ASPECTOS TOXICOLOGICOS	21
DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	25
a) Extracción	26
b) Propiedades fisico-químicas	30
c) Determinaciones químicas	32
d) Determinación estructural	35
por espectroscopia	
e) Analisis toxicológico preliminar	46
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	50

BUGAMBILIA

NYCTAGINACEAE.<sup>92</sup> FOUR-O'CLOCK FAMILY

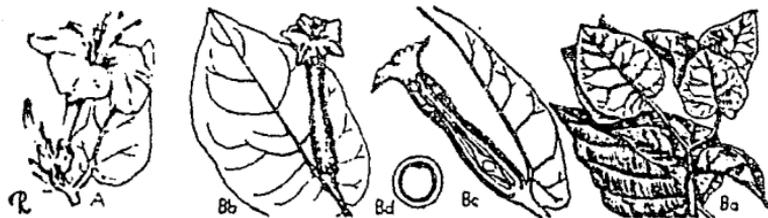


Fig. 124. NYCTAGINACEAE. A, *Mirabilis Jalapa*: flowering branch tip,  $\times 14$ . B, *Bougainvillea spectabilis*: Ba, flowering branch,  $\times 14$ ; Bb, flower and subtending bract,  $\times 1$ ; Bc, same, vertical section,  $\times 1$ ; Bd, ovary, cross-section,  $\times 3$ . (From L. H. Bailey, *Manual of cultivated plants*. The Macmillan Company, 1949. Copyright 1924 and 1949 by Liberty H. Bailey.)

## I N T R O D U C C I O N

Un factor muy importante en la elaboración de alimentos es el color. Influye de modo determinante en la aceptación o rechazo de un producto alimentario tanto en sus características externas como internas.

La coloración de los alimentos es una práctica muy antigua, probablemente desde tiempos prehistóricos. Las primeras fuentes de color fueron las que se encontraban en la naturaleza como productos animales, vegetales y minerales que se sustituyeron a finales del siglo pasado, por los colorantes sintéticos. (11,25)

A mediados del siglo XIX, las únicas materias coloridas se derivaban de fuentes naturales, pero es en 1856 cuando se obtuvo el primer colorante sintético: fue así como su uso se extendió desmesuradamente.

En 1900, el Dr. Bernard C. Hesse es el primero en estudiar la naturaleza de los colorantes sintéticos y su relación con la salud. Sus estudios lo llevaron a la conclusión de que había ciertos pigmentos que no podían ser utilizados, por ser tóxicos, lo cual restringió su uso (especialmente, los de color rojo, rojo violeta, etc.). (25,33)

Actualmente, se continúan los estudios de toxicidad de los colorantes sintéticos, pero se sigue disminuyendo y restringiendo su uso en el área alimentaria. Es debido a esta problemática que la investigación de los colorantes naturales ha tomado gran importancia en los últimos años, ya que es indispensable la obtención de nuevas fuentes de aditivos, que no afecten la salud del ser humano.

Una de las ventajas más importantes de los colorantes naturales sobre los sintéticos, es que la mayoría no son mutagénicos ni carcinógenicos; por lo que, es de gran interés la extracción y obtención de éstos a partir de plantas y animales.

Son muchas las fuentes animales y vegetales de las que se pueden obtener pigmentos de origen natural. Una de ellas, es la planta de la bugambilia (Bougainvillea spectabilis), de una gran variedad de colores como el magenta, pigmento vegetal que aún no ha sido aislado ni estudiado a fondo en nuestro país, como posible sustituto de colorantes sintéticos.

Por lo cual, esta investigación se enfocó principalmente, a la extracción y estudio de este compuesto colorido; a su identificación utilizando métodos químicos y espectroscópicos, además de un estudio toxicológico preliminar.

La extracción se realizó con solventes orgánicos y se determinaron algunas características químicas y fisicoquímicas, también se estudió el comportamiento espectral del compuesto para poder proponer una posible estructura de éste y tener así un conocimiento mas amplio sobre esta sustancia, la cual ofrece una nueva expectativa con gran potencial en la Industria Alimentaria.

## B U G A M B I L I A

La bugambilia es una vid leñosa, de crecimiento firme, muy apreciada por su gran colorido y variedad. Se utiliza generalmente como planta ornamental para cubrir paredes y casas, también se conoce con el nombre de camelina.

Es originaria de America del sur, principalmente del Brasil; es una planta cultivada de climas tropicales y templados que pertenece a las Dicotiledóneas, es miembro de la familia de las Nictagináceas o comunmente llamada de las 4 en punto, que junto con las Chenopodiaceae, Portulacaceae, Basillaceae, Cactaceae, Amaranthaceae, Phytolaccaceae, Stegnospermaceae, Aizoaceae y Didieraceae integran el orden de las Centrospermae que se ha caracterizado por sus familias con betacianinas y betaxantinas como el betabel, el amaranto y la bugambilia.(13,18,27)

Se caracteriza por ser una planta leñosa, trepadora que puede llegar a medir hasta 3 metros de altura. En general presentan espinas curvas por pares con hojas simples de color verde vivo alternas y sin estípulas; pueden ser desde lanceoladas hasta oblongadas según la especie.

Las flores son tetrámeras, del grupo de las flores desnudas, con perigonio sencillo o doble. Son hermafroditas y

a veces unisexuales agrupadas en cimas o cabezuelas de 3 tubulosas con 7 a 8 estambres. Cada grupo esta rodeado de 3 brácteas (hoja modificada colorida que se observa en la base de las flores) que en ocasiones asemejan a un cáliz, son de colores muy vistosos y variados como las de color rojo violeta o magenta de la Eugambilia spectabilis Willd o Choisy, las rojas, las amarillas y blancas de otras especies o variedades.

Estas plantas estan provistas, en la mayoría de los casos de pelos urticantes, óvulos derechos, estambres opuestos a las divisiones del perigonio. El perigonio es tubular, petaloide con el limbo pentalobulado. Tiene anteras biloculares, deshiscentes por líneas longitudinales. El ovario superior, unilocular con un lóbulo solitario erecto, invertido, de estilo simple, estigma agudo o globoso a veces en forma de pincel.

La semilla de 2 dicotiledones y el fruto (antocarpio) es un aquenio envuelto por la base del perigonio endurecido.

Existen varias especies en nuestro país, la más común y abundante es la de brácteas grandes y llamativas de nombre Bougainvillea spectabilis Willd de color rojo violeta intenso o magenta, con espinas, las flores se dan en ramillete. Es una enredadera muy rígida y más alta que otras especies.

En primavera, las flores aparecen con brácteas mas grandes y de color mas intenso que en el resto del año. Se considera la de mayor antigüedad y abundancia en América. Tambien se conocen otras bugambilias que presentan otros colores como rosado, carmesi, rojo ladrillo, anaranjado, amarillo y las muy raras de color blanco.

Las 3 principales bugambilias en América son la de brácteas color violeta intenso o magenta, la de color violeta pálido o desteñida y la tercera de color rojo muy vistoso. La variedad más rara es la que se da en Chiapas de brácteas blancas, difícil de cultivar y poco abundante.

La bugambilia es una planta muy abundante en nuestro país, fácil de cultivar y con una amplia gama de pigmentos vegetales que ofrecen una fuente importante de colorantes naturales que aún no han sido aislados ni identificados y que ofrecen un gran potencial para la obtención de aditivos alimentarios .

## GENERALIDADES

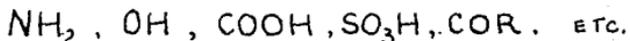
El color es la sensación visual percibida por nosotros debido a la acción de la luz, sobre la superficie de un objeto. La luz (radiación electromagnética visible para el ojo humano en el intervalo de 400 a 800 nm de longitud de onda) cae directamente sobre el objeto, después de haber sido modificada por éste, forma un impulso neural en el ojo que es mandado al cerebro donde lo interpreta como color. (15)

El color de un objeto se debe a sustancias que tienen la capacidad de absorber la luz en la región del espectro visible. Esta absorción se debe a la transición de los electrones, en los átomos y moléculas, manifestándose en la región del espectro visible; sólo ocurre si los electrones son lo suficientemente movibles, aumentando esta movilidad con la insaturación de enlaces químicos entre los átomos y la resonancia de los electrones.

Para que se lleve a cabo este fenómeno la sustancia debe contener un grupo cromóforo ; que es un núcleo que tiene átomos unidos por dobles enlaces como :

$\text{NO}_2$  ,  $\text{NO}$  ,  $\text{CO}$  ,  $\text{C}=\text{C}$  ,  $\text{N}=\text{N}$  ,  $\text{C}=\text{NH}$  , ETC.

Si tienen mas de 2 grupos se les llama cromógenos: son capaces de generar sustancias colorantes, sin indicar que éstos lo sean por si mismos. Para que esto ocurra, la molécula necesita otro grupo que se le nombra auxócromo : es cualquier átomo o grupo sustituyente que influye en el tono o intensidad de los colores, tiene la capacidad de poder cambiar la banda de absorción de un cromóforo como :



Todo alimento, tanto natural como procesado, tiene color el cual es producido por sustancias químicas, que reflejan la radiación de ciertas longitudes de onda y absorben las de otras. A estas sustancias se les denomina colorantes o pigmentos.

Se usa este término para referirse a las sustancias naturales o sintéticas empleadas para colorear los alimentos. Es cualquier material, ya sea tinte, pigmento o cualquier otra sustancia hecha por un proceso de síntesis, extracción, aislamiento o producto derivado de un vegetal, animal o mineral u otra fuente, que cuando se le agrega o aplica a un alimento, droga o cosmético utilizado para el cuerpo humano o cualquiera de sus partes, es capaz (solo o al reaccionar con otra sustancia) de impartir color.(12)

Pigmento es aquella sustancia que se encuentra en estado natural, la cual produce el color de los tejidos, tanto animales como vegetales, así como de diversos organismos. A diferencia de los colorantes, hay ciertos pigmentos como la hemoglobina y la clorofila, que desempeñan funciones biológicas importantes como el transporte de oxígeno y la fotosíntesis. (2)

Se consideran dos clases de colorantes: los certificados y los no certificados. (12,19,25)

Los certificados son compuestos de estructura conocida, producidos por síntesis química y que tienen especificaciones de alto grado de pureza establecida por la FDA. Cada lote es revisado para su aceptación y son ampliamente utilizados en la Industria Alimentaria, aunque hay algunos que están restringidos o su uso está prohibido.

Son de dos tipos: tintes FD & C y lacas FD & C. A los compuestos solubles en agua que manifiestan su poder colorante al ser disueltos, se les denomina tintes; hay primarios y secundarios y se fabrican en diferentes presentaciones como lo son los polvos, gránulos, líquidos, mezclas, pastas y dispersiones. Se utilizan en gran variedad de alimentos horneados, confituras, bebidas, productos lácteos, salsas, etc.

Laca se le llama a los productos obtenidos de la adsorción de tintes sobre un sustrato de hidrato de aluminio. Colorean por dispersión del mismo, más no por solubilidad. El contenido de tinte en el sustrato, varía del 10 al 40 por ciento. Son más estables al calor, la luz y al pH de 3.5 a 9.5 pero son más caras. El tamaño promedio de la partícula es de 5 $\mu$ . Se aplican principalmente en alimentos secos, tabletas, cubiertas de base oleosa, polvos, productos de goma, etc.

#### COLORANTES CERTIFICADOS

#### LISTA PERMANENTE Y PROVISIONAL DE COLORANTES CERTIFICADOS HASTA 1986

##### LISTA PERMANENTE

FD & C Rojo No. 3

Azul No. 2

Amarillo No. 5

Verde No. 3

Azul No. 1

Rojo No. 40

Laca del Rojo No. 40

Naranja B (b)

Rojo Cítrico No. 2 (c)

a) Dependiendo del reporte de la FDA.

b) Permitido hasta un nivel no mayor a 150 ppm en peso

c) Permitido hasta un nivel no mayor a 2 ppm en peso.

##### LISTA PROVISIONAL

FD & C Amarillo No. 6 (a)

Laca del Amarillo  
No. 6

Laca del Rojo No. 3

Laca del Azul No. 1

Laca del Azul No. 2

Laca del Verde No. 3

Laca del Amarillo  
No. 5

Los colorantes no certificados son los llamados naturales. Se obtienen a partir de fuentes vegetales, animales y minerales, o son duplicados sintéticos de pigmentos existentes en la naturaleza. Están exentos de certificación. Sus especificaciones están escritas en el Código de Regulaciones Federales. (12,19,25)

COLORANTES NO CERTIFICADOS  
HASTA 1986

COLORANTE	RESTRICCIÓN
Aceite del endospermo del maíz	Sólo en alimentos para pollos
Aceite de zanahoria	-----
Algas	Sólo en alimento para pollos
Azafrán	-----
Azul ultramarino	Sólo para colorear sal para uso animal (0.5% máximo)
Beta-apo-8-carotenal	15mg por lb
Betabel en polvo	-----
Beta-caroteno	-----
Cantaxantina	30mg por lb, 4.4mg por Kg
Caramelo	-----
Dióxido de titanio	1% máximo
Extracto de anato	-----

COLORANTES NO CERTIFICADOS

HASTA 1986

( continuación )

COLORANTE	RESTRICCIÓN
Extracto de cochinilla (carmin)	-----
Extracto de la cáscara de la uva	Sólo en bebidas carbona- tadas, bases de bebidas y bebidas alcohólicas
Extracto del color de la uva	Sólo en alimentos que no sean bebidas
Extracto y harina de Cempasúchil	Sólo en alimentos para pollos
Gluconato ferroso	Sólo para colorear olivas
Harina de semilla de algodón	-----
Jugo de fruta	-----
Jugo de vegetales	-----
Oxido de fierro (sintético)	Sólo en alimentos para gatos y perros (0.25% máximo)
Paprika y su oleoresina	-----
Riboflavina	-----
Turmérico y su oleoresina	-----

## C L A S I F I C A C I O N

Los colorantes naturales se clasifican en orgánicos e inorgánicos (6). Los más importantes para este trabajo, son los de origen orgánico y se subdividen en varios grupos. Los de mayor importancia por su estructura química y su utilidad son :

- a ) Carotenoides
- b ) Clorofilas
- c ) Antocianinas
- d ) Flavonoides
- e ) Taninos
- f ) Melanoidinas
- g ) Quinonas
- h ) Betalainas
- i ) Hemoglobina y mioglobina
- j ) Otros

En este estudio nos enfocaremos principalmente al grupo de las betalainas, pigmentos vegetales presentes en plantas de la familia de las Centrospermas, como el amaranto, el betabel y la bugambilia.

## B E T A L A I N A S

Son un grupo de compuestos parecidos a las antocianinas y los flavonoides en apariencia visual, derivados de la 1,7-diazheptametina. Sólo se han encontrado exclusivamente en 10 familias de las Centrospermas en diferentes partes como las flores, frutos, raíces, brácteas y otras. No se conoce ningún caso de coexistencia de las antocianinas y las betalainas en la misma planta. La función de estos pigmentos en la planta es aún desconocida pero son de gran importancia en la polinización de éstas por aves e insectos.

Hay presencia de betalainas en el betabel, la bugambilia, el amaranto, algunas cactáceas, etc. Se conocen aproximadamente 70 betalainas, todas con la misma estructura básica en la cual R y R' pueden ser hidrógeno o un sustituyente aromático, su color se debe a las estructuras resonantes. Si R y R' no extienden la resonancia de los electrones el compuesto es amarillo y si la extienden el compuesto es rojo (5).

Las betalainas más estudiadas son las del betabel. El betabel (Beta vulgaris) contiene una sustancia colorida que está compuesta por pigmentos aminoácidos de amonio cuaternario rojos y amarillos (betacianinas y betaxantinas). Los principales compuestos son la betanina (roja) y la vulgaxantina (amarilla) (4, 17,25)

La betanina representa del 70 al 95 por ciento del contenido total de betacianina del betabel. Las betaxantinas del betabel están principalmente representadas por las vulgaxantina I y II.

Si la betanina se hidroliza enzimáticamente se obtiene glucosa y el aglucón que es denominado betanidina.

Se sabe que existen otros compuestos con estructuras similares como las betacianinas aciladas, hidroxiladas, betaxantinas, etc. pero son escasos los estudios acerca de estos compuestos. (16,21,24)

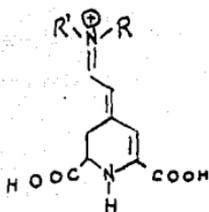
Son un grupo de compuestos poco conocidos que ofrecen un posible uso potencial como colorantes alimentarios por lo que es necesaria una investigación más a fondo.

#### P R O P I E D A D E S

Son altamente solubles en agua, poco solubles en metanol y etanol. En sistemas de electroforesis se comportan como buffers de ácidos débiles lo que hace que emigren hacia el ánodo. Se degradan fácilmente en procesos térmicos como el enlatado pero en general se aprecia su atractivo color rojo oscuro. Es bastante estable en el rango de pH de 4 a 7 lo cual las hace de gran interés como colorantes alimentarios.

(5)

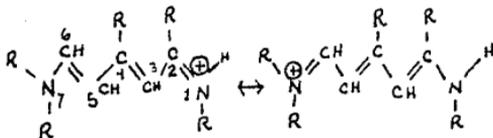
ESTRUCTURAS QUIMICAS DE LAS BETALAINAS



ESTRUCTURA BASE

1,7-DIAZOHEPTAMETINA

ESTRUCTURAS RESONANTES



La betanina (principal compuesto betacianinico del betabel) en presencia de ácido pierde la porción glucosídica quedando libre la betanidina. Se obtienen por esta hidrólisis ambos isómeros (betanidina e isobetanidina). (1,16,17)

La determinación de la estructura de la betanidina se hizo a partir del análisis de la 5,6-d-O-acetilbetanidina. Este compuesto mostraba una combinación de formas estructurales muy peculiar: anillos de dihidroindol (en algunos casos) con anillos de dihidropiridina y un cromóforo polimetilencianina. Presentando una posible estructura de resonancia para la betanidina con una carga positiva en el nitrógeno de la dihidropiridina.

Al someterse la betanidina a una degradación alcalina se obtiene el ácido 5,6-dihidroxi-2,3-dihidroindol-2-carboxílico, ácido fórmico y ácido 4-metilpiridin-2,6-dicarboxílico.

Se observó también que la betanina o la betanidina al tratarse con ácido transforma los pigmentos en compuestos isoméricos como la isobetanina y la isobetanidina respectivamente. La diferencia entre estos pares isoméricos sólo es la inversión de configuración del C15 puesto que si ambas eran sometidas a tratamiento con diazometano se transforma en el mismo producto que es el trimetilester de 5-6-di-O-metil-2 neobetanidina.

Para poder conocer la parte glucosídica del compuesto se realizó una hidrólisis con  $\beta$ -glucosidasa y con algunos datos de RMN llegándose a la conclusión de que había un O- $\beta$ -D-glucopiranosido (glucosa) unido a la molécula aunque no se determinó la posición del enlace de la glucosa.

De estos estudios se concluyó que las diferencias entre las betacianinas incluía modificaciones en la parte glucosídica, la configuración del C15 y quizá la esterificación de los grupos carboxílicos.(16)

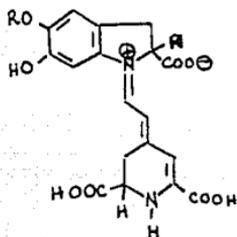
Piatelli y Minale reportaron la existencia de 44 diferentes betacianinas con estructuras similares a la arriba mencionadas pero recomendaron el estudio a fondo de cada una ellas.

Se confirmó la relación estructural entre los pigmentos rojo-violeta ( betacianinas ) y los pigmentos amarillos ( betaxantinas ). Al aislarse las vulgaxantinas I y II del betabel, las cuales tienen en su estructura glutamina y ácido glutámico combinado con el residuo de dihidropiridina que se ha encontrado en todos los pigmentos betacianina-betaxantina.

Su estructura pudo establecerse mediante la hidrólisis alcalina y ácida obteniéndose el ácido 4-metilpiridin-2,6-dicarboxílico y el respectivo aminoácido, incluso pudo

BETACIANINA Y BETAXANTINA

DEL BETABEL



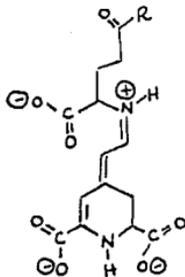
BETANIDINA R=H

BETANINA R=GLU

VULGAXANTINA I Y VULGAXANTINA II

R=NH<sub>2</sub>

R=OH



comprobarse que las betaxantinas podían transformarse en betacianinas debido a las reacciones de intercambio de los aminoácidos con el componente de dihidropiridina de las betacianinas-betaxantinas o a la posible relación biosintética. Han sido reportados varios pigmentos y todos presentan una absorción máxima en la región de 474 a 486 nm. Tienen modificaciones estructurales entre una y otra principalmente se deben a las reacciones de intercambio de aminoácidos con el componente de dihidropiridina de las betalainas; lo cual probablemente se deba a la relación biosintética.

En base a estos resultados se pudo concluir que las modificaciones estructurales entre las betacianinas y las betaxantinas se debían a los diferentes aminoácidos al final de la parte dihidropiridinica.

#### E X T R A C C I O N

La extracción comercial de la betanina es a partir del betabel. Se tritura y el jugo es acidificado generalmente con ácido cítrico o se realiza una extracción con agua en condiciones ácidas. El jugo puede ser secado en tambor para obtener el polvo del betabel o puede ser clarificado y someterse a una fermentación aeróbica para reducir los niveles de

azúcar y posteriormente concentrarse. La concentración del jugo se realiza por destilación al vacío o también por espreado y se obtienen los polvos del concentrado. (6)

Se obtienen 3 productos a partir del extracto de betabel :

- a ) Concentrado obtenido por la eliminación de agua al vacío. ( 60 por ciento de sólidos totales ).
- b ) Polvo obtenido por el secado del jugo en un secador de tambor o equipo similar.
- c ) Polvos del concentrado obtenidos mediante el secado por espreado del concentrado.

#### U S O S

Se utilizan generalmente en productos de vida de anaquel corta o en aquellos que no requieran un tratamiento térmico prolongado o elevado. Debido a su estabilidad se utilizan en alimentos del rango de pH 4 a 7 preferentemente en aquellos de AW bajo. La gama de colores que produce el betabel es desde rojo-azulado muy intenso hasta amarillo. Es inestable al aire y la luz por lo que debe de evitarse una exposición prolongada a éstos. Su estabilidad al benzoato y al sorbato son buenas.

La betanina, principal compuesto colorido del betabel es muy estable a pH 5. Se usa principalmente en bebidas suaves, helados, productos de proteína de soya y carne, en polvos como la gelatina, etc. (6)

Actualmente, las betacianinas y las betaxantinas del betabel son las mas conocidas y utilizadas pero aún restan muchas otras fuentes naturales de las cuales, se pueden extraer estos compuestos por lo que se ofrece un amplio campo de investigación.

## A S P E C T O S T O X I C O L O G I C O S

La toxicología es toda una recolección y evaluación de la información necesaria para determinar la seguridad de los ingredientes utilizados en la elaboración de alimentos para consumo humano. Para recabar esta información es necesario un amplio y exhaustivo estudio sobre el compuesto por lo que todas las investigaciones toxicológicas son muy complejas además de que continuamente son modificadas y mejoradas debido al rápido crecimiento científico y tecnológico.(7)

La evaluación toxicológica de extractos vegetales es sumamente complicada debido a la presencia de otros compuestos asociados al que se va a estudiar. Por lo que es importante la descripción del método de obtención del compuesto aunado a los resultados de las pruebas toxicológicas de éste.

A pesar de que muchos pigmentos naturales no poseen una larga historia de uso seguro para el consumo humano es indispensable verificarlo con los procedimientos toxicológicos modernos.

### REQUERIMIENTOS PARA PRUEBAS DE SEGURIDAD

La toxicología alimentaria comenzó a manifestarse como una disciplina científica alrededor de 1960 con una publicación de los requisitos de prueba necesarios para realizar una evaluación confiable de uso seguro de un compuesto colorido.(9)

En principio, los colorantes naturales deberían de evaluarse bajo los mismos criterios de los colorantes certificados, pero en la práctica, no es así ya que no es posible dar una definición química exacta para la mayoría de los pigmentos naturales debido a su compleja composición y lo único que se establece es la materia prima de la cual se obtiene y el método de obtención. Por esta situación fue necesario establecer una clasificación por categorías específica para estos compuestos coloridos:

a) Colorantes derivados de alimentos naturales obtenidos por procesos físicos. Para estos colorantes la aceptación o rechazo depende de la ingestión normal diaria en la dieta humana. La cantidad de este colorante no debe elevarla como lo es la betanina del betabel, el licopeno del jitomate, etc.

b) Colorantes obtenidos de fuentes naturales pero que no son alimentos naturales. En este grupo se encuentra el carmín de la cochinilla, el amarillo del cempasúchil y el rojo violeta de las betacianinas del betabel y de la bugambilia. Para el uso de estos colorantes se requiere una investigación completa de toxicidad.

c) Colorantes sintetizados químicamente nombrados como "idénticos a los naturales". También deben de realizarse estudios completos de toxicidad.

TABLE 2  
TOXICOLOGICAL STATUS OF NATURAL FOOD COLORING MATERIALS

Common name	EFC serial number	Composition	Typical use <sup>a</sup>	Estimated ADI <sup>b</sup> (mg/kg body wt/day)	Toxicological studies required
Anthocyanins	E163	(a) Certain glycosides of 2-phenylbenzopyrylium salts  (b) Cyanidin, perilaginidin, delphinidin, pelunidin, malvidin (Anthocyanidin glycosides)	Wine	From grape skins—tentative specifications only	Studies on known anthocyanins acceptable
Beetroot red	E162	Aqueous extract of red beetroots containing betanaine	Yogurt	Temporary ADI, not specified <sup>c</sup>	M: C
Orchil or orosea	E121	Extract of the red colouring matter of Roccella, Lecanora and Orchella		Not possible	Unacceptable
Cochineal, carmalum acid	E120	Extract of <i>Coccus cacti</i> (anatomium salts included)	Deserts, jellies	Not possible	Temporarily acceptable <sup>d</sup>
Carmum	E100	1,7-dihydroxy-3-methoxy-phenyl-betate-1,6-diene 3,5-dione. Rhizome of <i>Curcuma longa</i> V contains curcumin	Meat products	0.1 (temporary curcumin)	C, B, in progress; M
Riboflavin, lactoflavin	E101	7,8-Dimethyl-10-(D-1-riboyl) isochalazone	Flour confectionery	0.5	C in progress; B, acceptable <sup>d</sup>
Carbon black	E153	(Vegetable carbon)	Confectionery	—	Adequate
General colours	E150	Products obtained exclusively by heating sucrose or other edible sugars, or water-soluble amorphous brown products obtained by controlled action of heat on soluble sugars (see text)	Dry mixes, confectionery, meat products	100. Adequate on salivary process only (max. 200 ppm & ready <sup>e</sup> imitations)	Specification to be clarified. Identical principle causing reported effect
				Adverse process (non-salivary)—not possible	C, T

En base a esta clasificación las betalainas entran en el grupo de colorantes tipo B por lo que se considera que es necesario todo un estudio toxicológico completo para conocer su toxicidad. Se desconoce aún el ADI (Ingesta Diaria Aceptable) debido a que los resultados que se tienen hasta ahora no son suficientes para calcular este valor, además de que es necesario realizar estudios metabólicos adicionales (Tabla 3) en varias especies; de preferencia en el ser humano, estudios de ingestión a corto plazo (90 días) en roedores, y a largo plazo (2 años) en ratas y ratones (80 semanas) según lo indicado por el Comité de Expertos sobre aditivos alimentarios de la FAO/OMS. (9)

La presente investigación sobre el colorante de la Bugambilia requeriría de un estudio toxicológico completo y así se podría establecer un punto de referencia para su consideración como sustancia segura o riesgosa; tal estudio tendría que ser extensivo y profundo pero debido a la falta de recursos y tiempo no pudo realizarse, por lo que se optó por llevar a cabo un estudio preliminar y obtener un parámetro inicial para la evaluación toxicológica del pigmento vegetal, que a futuro facilitará su investigación toxicológica.

En el estudio preliminar se utiliza un método de larvas de camarón para determinar el DL50 de compuestos activos de extractos en un medio salado. Las actividades de un gran número de compuestos activos conocidos se manifiestan como

tóxicas para el camarón, dicho método se considera rápido, confiable, barato y muy adecuado para el laboratorio de investigación. (20)

Este método fué desarrollado por la creciente necesidad de bioensayos generales que puedan detectar un amplio espectro de actividades farmacológicas y toxicológicas de plantas, para así poder seleccionar fácilmente los compuestos de interés para el investigador; por su gran facilidad y rapidez se utiliza aquí para la evaluación preliminar del compuesto colorido de la bugambilia.

Las larvas de camarón son muy lábiles a compuestos tóxicos en dosis muy bajas (  $5\text{mg/Kg}$  ) por lo que al término de 24 horas es posible conocer la letalidad del compuesto en sistemas zoológicos y posteriormente dar una pauta para continuar con pruebas biológicas más elaboradas y complejas.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Se recolectaron 2 Kg de flores magentas de Bougainvillea spectabilis, las cuales fueron secadas en una estufa a 60°C por 5 horas evitando así la descomposición del compuesto colorido, principal objetivo de este trabajo. (8)

El secado se realizó a esta temperatura para evitar cambios químicos. La ventaja de llevar a cabo el secado de la planta fué que el material biológico sobrante podía utilizarse para otras determinaciones posteriores o almacenarse por un tiempo largo. De hecho, se ha visto que los análisis para determinación de flavonoides, alcaloides, quinonas, terpenoides y algunos otros compuestos son más exitosos cuando se realizan años después de su recolección, ya que estos compuestos son muy estables al paso del tiempo, especialmente los flavonoides y los alcaloides. (14)

Fué muy importante la revisión minuciosa de la planta para evitar guardar un espécimen enfermo o contaminado lo cual podría provocar datos irreales y erróneos en el estudio. También fué necesaria la identificación y clasificación de la planta por una persona calificada para que el reporte de nuevas sustancias tuviera validez y autenticidad.

Después del secado de la planta, se eliminaron aquellas partes que no eran de interés para este trabajo las cuales fueron hojas, pistilos, flores y toda materia extraña diferente a las brácteas. Las brácteas magentas fueron molidas cuidadosamente y colocadas en un cartucho de papel filtro para la extracción de la sustancia que provoca el color de este tipo de plantas ornamentales muy abundantes en nuestro país.

#### E X T R A C C I O N

El método de extracción depende principalmente de la textura, del contenido de agua de la planta y sobre todo del tipo de sustancia que se va a extraer. En base a la literatura consultada y a la existencia del pigmento orgánico del tipo de las betacianinas se analizaron diferentes técnicas, especialmente las de Piatelli e Imperato, en este grupo de plantas. (14)

La extracción fué el paso decisivo para esta investigación puesto que el objetivo principal es la extracción del colorante magenta de la bugambilia. (13)

El procedimiento químico mas usual para la obtención de compuestos orgánicos de este tipo a partir de tejidos vegetales secos es la extracción la cual se realizó en un equipo soxhlet. Este método presentó ciertas ventajas sobre otros, como el ser muy útil cuando se trabaja a gran escala, se

utiliza poco solvente el cual puede ser recuperado al finalizar la extracción, además de que se puede trabajar a bajas temperaturas evitando la descomposición del compuesto colorido. (22,23,24)

Debido a las características del compuesto colorido y a los datos obtenidos en la literatura, se supuso que el colorante era de naturaleza muy polar por lo que se decidió utilizar, solventes muy polares como el agua, metanol, etanol y mezclas de éstos.

Se hicieron pruebas con estos solventes y se obtuvo el extracto mas puro con agua antecedido por una extracción con metanol. Fué descartado el uso del etanol por que se obtenia un extracto impuro además de provocar la descomposición del pigmento de la planta. Se prosiguió a realizar la extracción con mezclas en diferentes proporciones de metanol y agua.

La extracción mas eficaz fué la que se realizó con 600ml de metanol para extraer compuestos de menor polaridad que el colorante pero que dificultaban la extracción de éste; se hizo una segunda extracción con 300ml de agua destilada, en esta fracción se obtuvo el colorante magenta de la bugambilia al que se le denominó BUG.

La extracción se realizó a 50°C (temperatura del disolvente dentro del recolector) durante 4 horas a reflujo

en un equipo soxhlet. Se consideró que el colorante estaba totalmente extraído cuando no se observó color en el solvente.

Se obtuvo una fracción de 200ml la cual se prosiguió a eliminar las clorofilas y otros compuestos que pudieran haberse encontrado presentes con acetato de etilo en un embudo de separación. Se formaron 3 fases. La fase acuosa (parte inferior) de color rojo violáceo muy intenso, la fase intermedia de menor densidad con apariencia jabonosa y la fase orgánica (parte superior) de color ligeramente verde. Se desechó la fase orgánica y la fase intermedia, ambas se secaron y guardaron para otros estudios.

La fase acuosa (100ml) se concentró en un rotavapor a 40°C al vacío para eliminar el agua. Para disminuir el tiempo de concentrado se utilizó acetato de etilo seco. Se obtuvo un concentrado de 10ml el cual se dejó enfriar y se dividió en 2 muestras que se les denominó de la siguiente manera:

Clave BUG-L (muestra que fué liofilizada)

Clave BUG-A (muestra que fué reducida en volumen a presión reducida)

Se eligieron estos 2 métodos de secado debido a las características del compuesto que es muy lábil a las altas temperaturas y muy inestable.

La liofilización es un método que ofrece la ventaja de eliminar el agua a bajas temperaturas. La muestra BUG-L obtenida fué un polvo rojo sangre, muy soluble en agua pero que presentó el inconveniente de que al solubilizarlo en agua formaba una solución de color rojo que no era el deseado en la investigación. El secado a baja temperatura y vacío había provocado cambios estructurales en la molécula. Además este método presentaba el inconveniente de ser muy costoso y poco práctico para nuestros recursos. No fué posible la recristalización de este producto debido a la eliminación total del agua por este método, lo que dificultó bastante su solubilidad y por consiguiente la obtención de cristales.

La muestra BUG-A presentó varias ventajas con respecto a la muestra BUG-L. Se obtuvo mediante la aplicación de vacío parcial a la muestra durante 2 horas y se colocó en un desecador por 24 horas para eliminar cualquier rastro de agua.

El producto obtenido fué un polvo rojo violeta, altamente soluble en agua formando una solución magenta. La muestra pudo cristalizarse en metanol obteniéndose un producto más puro que favorecía la obtención de su comportamiento espectral del colorante BUG.

Después de haber obtenido las muestras puras por estos métodos, era necesario obtener información acerca de la estructura química del compuesto y para esto se necesitaba establecer el grupo al que pertenecía y sus funciones para así tener idea de su comportamiento.

Es posible obtener esta información mediante la determinación de propiedades físicas y sus características químicas, cromatográficas y espectroscópicas por lo que se realizó un análisis para poder vislumbrar su fórmula y estructura. Se pueden determinar los metoxilos, los grupos N-metilo, los hidroxilos, insaturaciones, etc.

Las determinaciones fisicoquímicas fueron solubilidad, estabilidad al pH, pureza etc. Las pruebas químicas realizadas fueron: la preparación de derivados acetilados para el comportamiento espectroscópico, determinación del N presente por el método Kjeldhal (micro), hidrólisis ácida del compuesto para determinar e identificar los azúcares junto con los resultados de los espectros en infrarrojo, ultravioleta, visible y resonancia magnética nuclear y al final se llevó a cabo un estudio toxicológico preliminar para la obtención del DL50 en larvas de camarón.

## PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

### SOLUBILIDAD.

Ya obtenido el compuesto colorido por los 2 métodos de secado se realizaron pruebas de solubilidad de ambas muestras (BUG-L y BUG-A).

Ambos colorantes son altamente solubles en agua y medianamente solubles en metanol y etanol, pero al

calentarlos ligeramente su solubilización es total. La solubilidad se favorece y aumenta si el sólido obtenido fue por el método de presión reducida en lugar del de liofilización.

#### PUNTO DE FUSION

Las muestras BUG-L y BUG-A funden en el rango de 130 a 200 °C con descomposición pasando del color magenta al rosado y por último a incoloro. Si la muestra era recristalizada en metanol fundía en el rango de 180°C a 200°C. No se continuó la recristalización debido a que era primordial realizar la prueba de toxicidad del compuesto en lugar de llegar a un producto totalmente puro.

#### pH

Se realizó la titulación del colorante BUG con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico valorados, para obtener datos acerca del comportamiento y estructura del compuesto con respecto a los cambios de pH. Se encontró que la molécula no se destruía en el rango de pH 3-7 esto es que no había cambio de color al compararlo con una solución estandar del colorante. A pH 1 y 2 el colorante intensificaba su tinte rojizo y a pH 8-14 se incrementaba la tonalidad violácea.

## PUREZA

La determinación de la pureza de los compuestos se realizó mediante cromatografía en capa fina sobre sílica-gel lo cual se corroboraba con los resultados, del punto de fusión y los espectros de infrarrojo, ultravioleta, luz visible y RMN.

El Rf obtenido para BUG fué de 0.57 utilizando como eluyente una mezcla de agua/metanol 4:1, además, para asegurar la pureza del colorante se realizaron placas bidimensionales donde sólo se observaba una sola mancha al igual que en las placas unidimensionales. Ya obtenidos los resultados de las pruebas fisicoquímicas del colorante, se prosiguió a realizar las determinaciones químicas para proponer una estructura al compuesto colorido BUG.

## D E T E R M I N A C I O N E S   Q U I M I C A S

Con las muestras BUG-A y BUG-L se realizaron diferentes determinaciones químicas. Una de éstas, fué la obtención de derivados acetilados los cuales se clasificaron en la siguiente forma:

- DAL-L    Derivado acetilado del colorante liofilizado
- DAL-A    Derivado acetilado del colorante secado a presión reducida.

De cada una de las muestras se hicieron derivados por 2 métodos para determinar el tipo de hidroxilos presentes en la molécula ya que en el espectro de infrarrojo (No.1) se observa banda de éstos.

La acetilación se hizo para determinar los hidroxilos alifáticos (anhidrido acético y piridina) y los hidroxilos aromáticos (anhidrido acético y ácido paratoluensulfónico). (28,30,31)

Se hicieron 4 tipos de derivados: DAL-L1 y DAL-L2; DAL-A1 y DAL-A2. El número 1 correspondía a la prueba de hidroxilos aromáticos y el número 2 para los hidroxilos alifáticos.

#### PREPARACION DE LAS MUESTRAS DAL-L1 y DAL-A1

Se colocó 0.01gr de la muestra seca del colorante (BUG-L o BUG-A), se agregaron 10ml de anhídrido acético y 0.3gr de ácido p-toluensulfónico, se agitó y se dejó reaccionar por 24 horas obteniéndose un compuesto café oscuro en solución y un precipitado. A la solución se le agregó cloroformo para su disolución y posteriormente se eliminó el exceso de ácido con una solución de bicarbonato de sodio al 10 por ciento. El exceso de anhídrido acético y de ácido de la reacción fue neutralizado con pequeñas porciones de agua. Cuando eliminaron todas las sustancias en exceso se separó la fase

clorofórmica y se trató de cristalizar sin obtener ningún producto lo que nos indicó que no hubo presencia de hidroxilos aromáticos en el compuesto. El precipitado se filtró y se pudo observar que era el exceso de ácido y que al lavarse con bicarbonato de sodio al 10 por ciento se obtuvo una sal soluble en agua y se comprobó que era la sal del ácido p-toluensulfónico.

Al realizar una cromatoplaqa de la fase clorofórmica no hubo presencia de ningún compuesto sin embargo en la cromatoplaqa de la fase acuosa se presentó una mancha que correspondía a la muestra BUG.

Al no obtenerse producto acetilado por el método del ácido p-toluensulfónico en ninguno de los casos, no se pudo aumentar la información sobre el compuesto por lo que se prosiguió con el segundo derivado acetilado.

#### PREPARACION DE LAS MUESTRAS DAL-L2 Y DAL-A2

Se colocó 0.1gr de colorante y se agregó 3ml de piridina y 1ml de anhídrido acético. Se agitó y se dejó reaccionar por 24 horas. Al término del tiempo de reacción se disolvió el producto en cloroformo para solubilizar el derivado acetilado. Se escogió el cloroformo como solvente por que al acetilar el compuesto, la polaridad debería de disminuir. Se agregó ácido clorhídrico al 2 por ciento para eliminar los

residuos de piridina, se hicieron 3 lavados para así formar el clorhidrato de piridina. Cuando se comprobó que ya no había piridina presente en el medio se prosiguió a eliminar el exceso de ácido acético que se había formado durante la reacción con una solución de bicarbonato de sodio al 20 por ciento. Se eliminó la fase acuosa y se prosiguió con la fase clorofórmica para obtener un producto puro y totalmente acetilado al cual se le hicieron determinaciones espectroscópicas.

Por este método se logró obtener el derivado acetilado que proporcionó gran parte de la información acerca de la estructura química del compuesto.

De la muestra DAL-A2 se obtuvo un espectro que dió bastante información sobre la naturaleza química del compuesto y proporcionó los suficientes datos para dirigir acertadamente la determinación estructural.

## D E T E R M I N A C I O N      E S T R U C T U R A L P O R      E S P E C T R O S C O P I A

La completa identificación de un compuesto depende en gran parte de la medida de sus propiedades y la comparación de datos con las de la literatura. Estas propiedades pueden ser punto de fusión, solubilidad, Rf, etc. (8,14)

Sin embargo, son igualmente informativos los datos de sus características espectroscópicas como son las mediciones espectro infrarrojo, ultravioleta, visible y de resonancia magnética nuclear. Otra técnica que ha ayudado bastante a la identificación de un compuesto es la fluorometría donde nos proporciona información sobre los cationes presentes en la molécula.

Se hicieron varios espectros del colorante BUG y sus derivados DAL por la técnica de película, estado sólido y pastilla. Los espectros fueron realizados en el rango de infrarrojo, ultravioleta y visible; también se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear para los derivados acetilados y un estudio de fluorometría para la identificación de cationes.

Se prepararon varias muestras para las espectroscopías, las más importantes y decisivas se presentan en este trabajo.

## INTERPRETACION DEL ESPECTRO DE INFRARROJO

El espectro No.1 fué tomado de la muestra BUG-A y se efectuó en el rango de radiación infrarroja, la técnica utilizada fué por película. La referencia utilizada fué aire en una celda de 1 cm.

Los datos obtenidos fueron :

- a) De 3600 - 3100cm<sup>-1</sup> se observa una banda de absorción ancha correspondiente a un compuesto con grupos hidroxilo.
- b) De 2960 - 2860cm<sup>-1</sup> hay señales de metilo, probablemente de dos o más, desplazadas ligeramente y se confirma su presencia en las señales de 1390 - 1370cm<sup>-1</sup>.
- c) De 1630 - 1590cm<sup>-1</sup> hay presencia de pequeñas señales de dobles enlaces conjugados.
- d) En 1610cm<sup>-1</sup> se observa una señal de grupo carbonilo.
- e) A 1030cm<sup>-1</sup> hay señales de pequeños picos de un enlace C-N unido a dos hidrógenos o dos metilos.
- f) A 1080cm<sup>-1</sup> se observa la presencia de un alcohol primario o secundario.

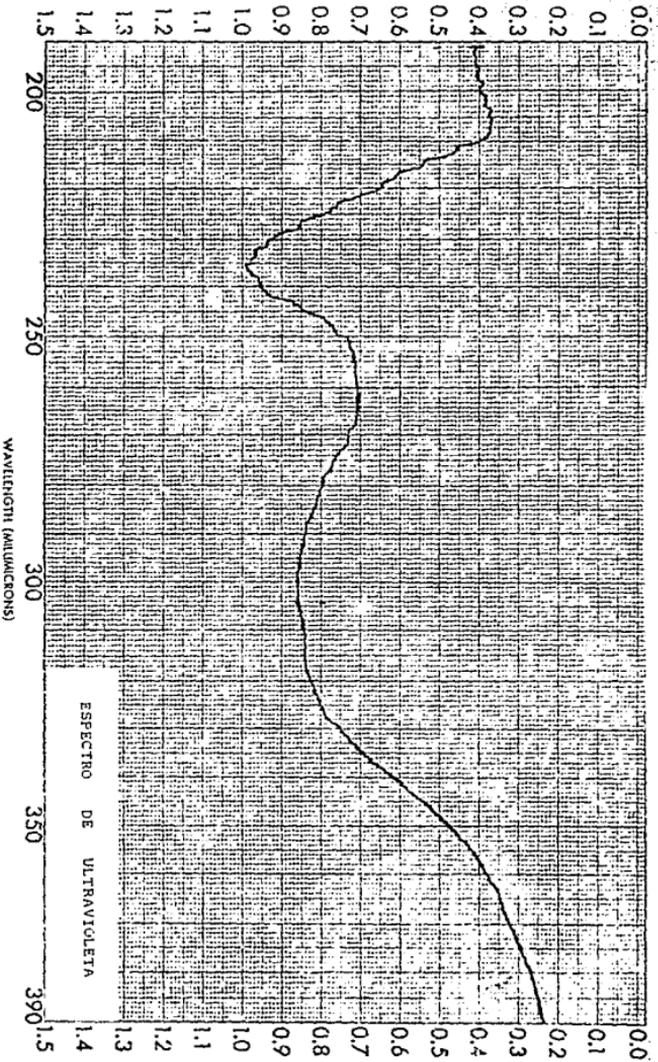


## INTERPRETACION DEL ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA.

El espectro No.2 se realizó en el rango del ultravioleta, se utilizó una celda de 1 cm y la referencia fue metanol. La muestra utilizada fué BUG-A, recristalizada en metanol.

Hay un pico de absorción máxima a 236nm y una banda de absorción muy ancha desde 270 hasta 330nm con una máxima absorción a 305nm.

Este comportamiento corresponde al patrón de absorción de betalainas, aunque los picos de absorción son muy anchos lo que nos indicó que había un elemento probablemente de la 4a familia lo que provocaba un ensanchamiento en las señales de los espectros, especialmente el de RMN; también se observaba un efecto paramagnético el cual solo podía ser provocado por metales como Fe puesto que la muestra utilizada era pura, fué necesario hallar una explicación a este fenómeno.



SAMPLE <i>Calceína Argemónica S</i>		CURVE NO. <i>5945</i>	
ORIGIN <i>Merck S.A.</i>		CONC. _____	
SOLVENT <i>EtOH</i>		CELL PATH <i>1 cm</i>	
REFERENCE _____		DATE <i>1-1-54</i>	
SCAN SPEED <i>2000</i>		OPERATOR <i>ChA</i>	
SLIT <i>5</i>		REMARKS _____	

ESPECTRO NO 2

PART NO. 2031511 59°

PERKIN-ELMER

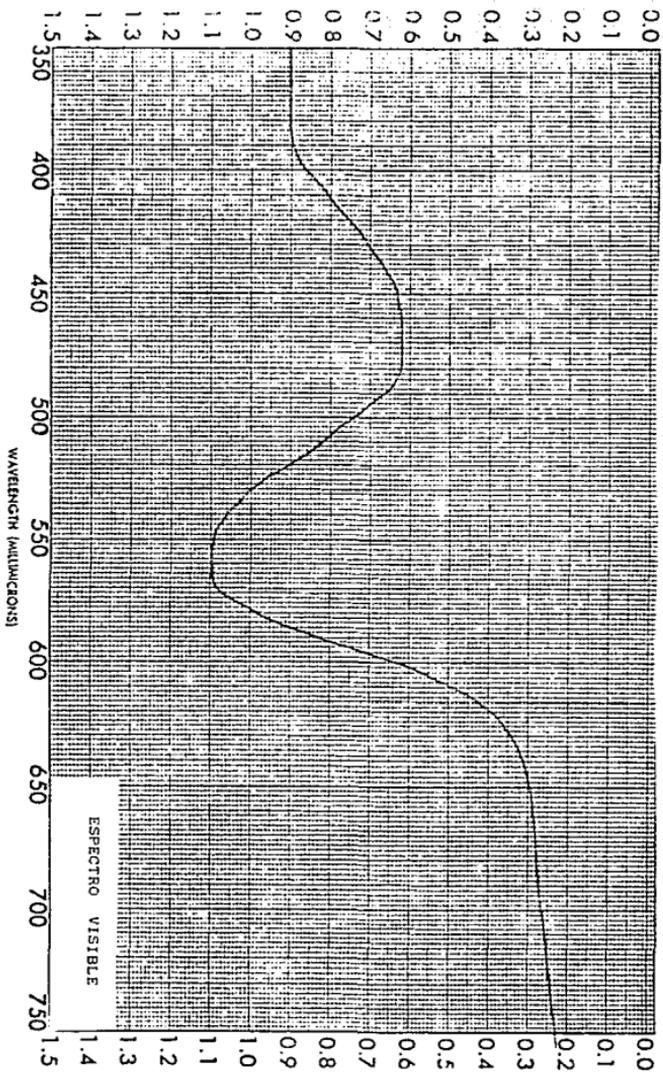
## INTERPRETACION DEL ESPECTRO VISIBLE

El espectro No. 3 fué hecho en el rango del visible en una celda de 1cm utilizando como referencia al agua debido a la alta solubilidad de BUG en ésta.

Se observa un pico de absorción ancho con una máxima absorción a 562nm, característica de los compuestos betacianinicos. Concuerdia con los valores espectrales en el rango visible de las betacianinas de color magenta.

Se efectuó un estudio de fluorescencia para determinar cationes y se encontro fierro en trazas suficiente para provocar una distorsión y ensanchamiento de las bandas en los espectros 1, 2 y 3.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



SAMPLE <u>BUG</u>		CURVE NO. _____		SCAN SPEED _____		OPERATOR _____	
ORIGIN <u>Bachha Sata</u>		CONC. _____		SLIT _____		DATE _____	
SOLVENT <u>Agua</u>		CELL PATH <u>1 cm</u>		REMARKS _____			
REFERENCE <u>Agua</u>							

PAET NO. 202-1312 35\*

PERKIN-ELMER

ESPECTRO 3

Hubo también presencia de otros metales que se encuentran en general presentes en las plantas pero no afectan el comportamiento de los espectros. Se intuía que probablemente el fierro formaba parte de la molécula.

Para comprobar la presencia del fierro dentro de la molécula se utilizó una columna ácida para eliminar los cationes presentes. Se hizo pasar el colorante magenta puro BUG por la columna y al final de ésta se obtuvo una solución café BUG-3 totalmente distinta a la muestra BUG.

La solución BUG-3 se concentró en rotavapor y se tomaron 10ml que se colocaron en un matraz de bola y se agregó 15ml de ácido clorhídrico al 2 por ciento para realizar una hidrólisis en condiciones suaves y lograr la separación del - aglucón y el glucósido. (22,23)

Se colocó a reflujo durante 4 horas, se dejó enfriar y se colocó en un embudo de separación, se agregó cloroformo para separar los azúcares del aglucón. Se hizo una cromatoplaca a ambas fases, observando que la fase clorofórmica no presentaba ningún compuesto aún al concentrarla. Esto nos indicó que los compuestos que se requerían se encontraban en la fase acuosa y que eran de polaridades muy similares.

En la cromatoplaça de la fase acuosa se observó la presencia de 2 compuestos por lo que se prosiguió a separarlos e identificarlos. Para la separación de estos compuestos se montó una columna de fluorisil-celite en una bureta de 25ml y se colocó 5ml de la muestra H1 (hidrolizado de BUG, fase acuosa, sin fierro). Se eluyó con una mezcla de metanol y cloroformo 4:1 y se tomaron fracciones cada 5ml.

En las fracciones 1 y 2 se obtuvo un compuesto colorido amarillo (H1A), las fracciones 3 a 8 no presentaron ningún compuesto por lo que fué necesario cambiar la polaridad de la columna para obtener el segundo compuesto colorido café (H1B). La mezcla utilizada fué metanol y cloroformo 1:1 y al final se utilizó una mezcla de metanol y agua 2:8 con la que corrió el compuesto H1B, fracción café sumamente polar.

Al obtener los compuestos H1A y H1B se realizó un análisis para la identificación de estos compuestos.

#### ANALISIS DEL COMPUESTO H1A.

Debido a la menor polaridad de este compuesto con respecto al H1B y partiendo de la posibilidad de que se trataba del grupo aglucón, se realizó una determinación de N por el método Kjeldhal, para confirmar que la molécula

contenia nitrógeno, esto en base a lo reportado en la literatura. (16,17,22,23)

Se eligió este procedimiento debido a que se considera la técnica más fidedigna para la determinación del nitrógeno orgánico. Este método consiste en la combustión húmeda de la muestra, la cual se calienta con ácido sulfúrico concentrado (digestión) en presencia de catalizadores metálicos para así llevar a cabo la reducción del nitrógeno orgánico, el cual es retenido en solución como sulfato de amonio. La solución alcalina se destila o se arrastra con vapor para obtener el amoniaco el cual es atrapado y titulado (titulación). (10)

Se prepararon 3 muestras por duplicado. La primera fue una muestra del colorante BUG-L denominada N1, la segunda fue H1A que se consideraba el agluón, se le dió el nombre de N2 y la tercera muestra fue el blanco.

Se pesó 0.05gr de muestra en un pedazo de papel blanco y se introdujo en el matraz de microkjeldhal. Se colocó sulfato de potasio, óxido de mercurio y ácido sulfúrico concentrado y piedras de ebullición. El matraz fue colocado en el digestor y se calentó hasta la total destrucción, esto fue cuando el liquido del matraz se observó completamente claro.

Se dejó enfriar y se disolvió en agua, colocándose en el aparato de destilación. Se enjuagó el matraz y se colocó en el aparato. A la salida del condensador se colocó un vaso de precipitados con un volumen conocido de ácido bórico titulado. Se agregó hidróxido de sodio 1:1 a la copa de adición del microdestilador poco a poco, para evitar así la aceleración de la reacción y disminuir la posibilidad de perder la muestra.

Se continuó la destilación hasta obtener toda la muestra la cual se tituló con una solución de ácido clorhídrico 0.02 N.

Los resultados fueron que las muestras N1 y N2 contenían 27.81 y 27.85 por ciento de nitrógeno que dividido entre el peso molecular del compuesto BUG hidrolizado (sin azúcares) que corresponde a 2 átomos de nitrógeno en la molécula. Este resultado concordó con la estructura de las betacianinas y contribuyó a aumentar la información acerca de la naturaleza química del compuesto colorido BUG.

También se preparó la muestra H2B para la obtención de un espectro de resonancia magnética nuclear (No. 5). Esta muestra se preparó de la siguiente manera: se colocó 1ml de muestra en un matraz y se eliminó el agua por el método de presión reducida durante 2 horas, posteriormente se dejó en el desecador por 24 horas para la total eliminación del agua.

## INTERPRETACION DEL ESPECTRO DE RMN

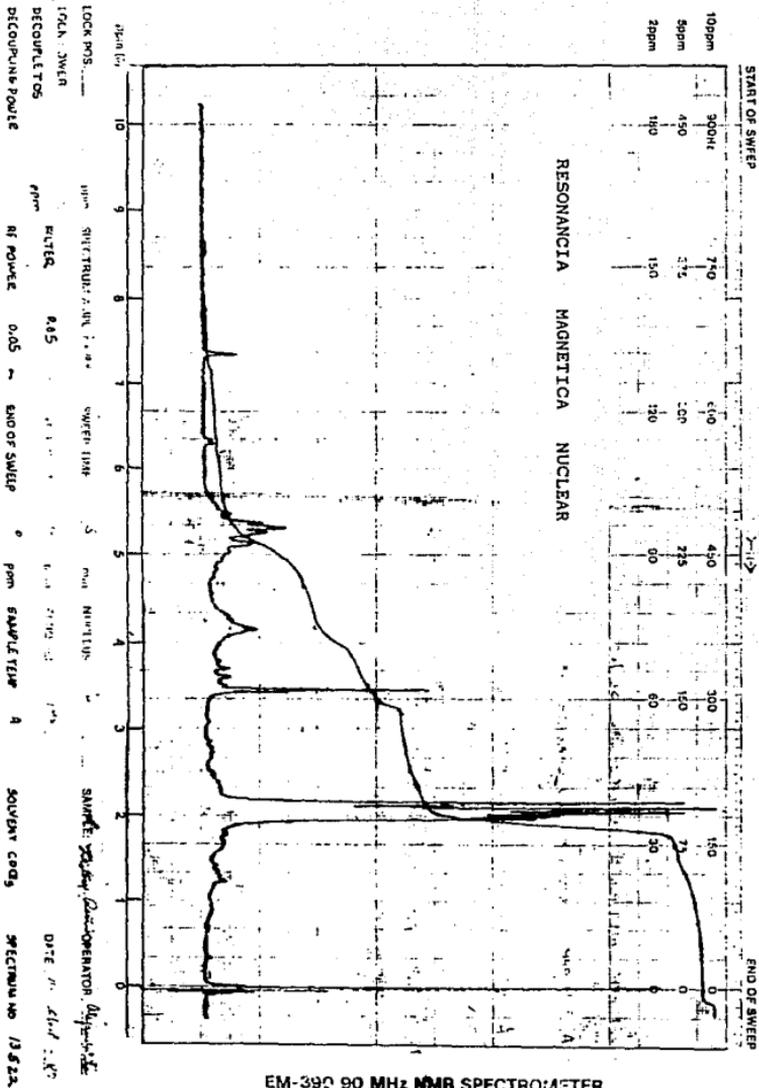
Al cabo de este tiempo se realizó el espectro de RMN, se utilizó como solvente cloroformo deuterado y se obtuvieron las siguientes señales:

- a) En 2.1ppm se observa un multiplete que indica las interacciones de un hidrógeno con un nitrógeno.
- b) A 3.4ppm hay señal de 2 singuletes correspondientes a hidrógenos de 2 metilos unidos a nitrógeno, la señal esta desplazada por la presencia del nitrógeno.
- c) A 3.7ppm se encuentra un multiplete correspondiente a los hidrógenos de 3 o 4 acetilos.
- d) A 4.1ppm hay un multiplete de los protones de la base del azúcar.
- e) A 5.3ppm se observa un multiplete que indica la presencia del protón anomérico del hemiacetal del azúcar y un singulete correspondiente a un protón vinílico.
- f) A 6.35ppm hay una señal de un singulete de un protón vinílico.



Perkin Instrument Division

Palo Alto, California



EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

#### ANALISIS DEL COMPUESTO H1B

Debido a las características tan polares y contemplando la posibilidad de que se tratara de la parte glucosídica del colorante se comparó con diferentes patrones de azúcares que podrían ser porciones del colorante como glucosa, fructosa, ramnosa, etc.

Al compararse con los patrones por cromatografía en capa fina se obtuvo como resultado que la parte glucosídica de la betacianina estaba conformada por glucosa.

## A N A L I S I S T O X I C O L O G I C O P R E L I M I N A R

Como el colorante se propone para utilizarlo en la Industria Alimentaria se realizó un estudio toxicológico preliminar en larvas de camarón para obtener datos acerca de la toxicidad del colorante.

Este método es un bioensayo simple en el cual se determinan valores de DL50 en mg por ml. Se utilizan larvas de camarón (*Artemia salina* Leach) las cuales son altamente sensibles a compuestos tóxicos (<5mg/Kg). Se utilizó este método debido a su rapidez, bajo costo, confiabilidad y facilidad de desarrollo dentro de nuestro laboratorio. (19)

Se colocaron 0.02gr del colorante BUG-A y se disolvieron en la mínima cantidad posible de metanol. Se dejó evaporar el metanol y entonces se colocó la sustancia en diferentes frascos con distintas concentraciones de colorante en una solución salina.

Se formaron 3 lotes con las siguientes diluciones 10, 100 y 1000ppm de BUG, la prueba se realiza por triplicado. En cada frasco se colocaron con una pipeta 10 larvas de camarón y los camarones pueden contarse macroscópicamente transcurridas las 24 horas

Se reporta el número de sobrevivientes y se estima el porcentaje de muertes en cada una de las dosis.

#### R E S U L T A D O S

CONCENTRACION	1000ppm	100ppm	10ppm
	10/10	10/10	10/10
No. sobrevivientes	10/10	10/10	10/10
	10/10	10/10	10/10
No. muertes	0/30	0/30	0/30

Por lo tanto la DL50 > 1000ppm

Las actividades de los extractos o sustancias se consideran significativos cuando DL50 es menor o igual a 30mg/ml por lo que el compuesto se considera no tóxico. Esto nos indica que el colorante puede ser utilizado en alimentos pero aún son necesarias otras pruebas toxicológicas para completar este estudio.

## CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un extracto puro del colorante magenta denominado BUG de la planta Bougainvillea spectabilis mediante una extracción con metanol y posteriormente con agua.

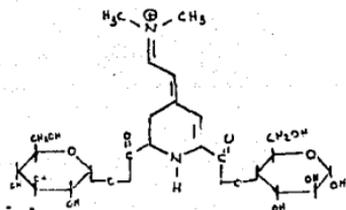
2. El extracto puro de BUG pudo ser cristalizado y purificado (BUG-L y BUG-A), pudiéndose así caracterizar el compuesto colorido magenta de la bugambilia.

3. De los 2 métodos de purificación, el mejor fué el de secado a presión reducida, el cual no modificó la estructura ni las características físicas ni químicas del colorante BUG. Además de que este método es el más conveniente a nivel laboratorio por su bajo costo y facilidad.

4. La elucidación de la estructura del colorante BUG pudo obtenerse mediante la realización de derivados acetilados y la interpretación de espectros del visible, ultravioleta y RMN.

5. El DLSO del compuesto está considerado dentro de los compuestos no tóxicos pero son necesarios estudios más completos para poder utilizar el colorante en alimentos.

6. Para el compuesto BUG se propone la siguiente estructura:



GLUCOSIDO DE LA 1,7-DIAZOHEPTAMETINA

7. Las brácteas magentas de la *Bougainvillea spectabilis* son un material adecuado para la obtención del colorante BUG de uso potencial en el área alimentaria.

8. La investigación de este tipo de compuestos obtenidos de fuentes naturales ofrecen un amplio campo de desarrollo en la Industria Alimentaria puesto que aún no se han agotado todas las posibilidades de estudio sobre pigmentos vegetales.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Acheson, R. (1981). Química Heterocíclica, tr. del inglés por Ofelia Espejo, 1ª ed., Publicaciones cultural, México. pags.223,383
- 2) Badui, D.S. (1988). Diccionario de Tecnología de Alimentos, 1ª ed., Alhambra Mexicana, México.pags 39-42,89,94 y 191.
- 3) ----- (1984). Química de los Alimentos, 2ª. reimpresión., Alhambra Mexicana, México. pag. 284-285
- 4) Bilyk, A.(1979). "Extractive Fractionation of Betalaines". J. Food Sci., 44,1249-1251
- 5) Clydesdale, F.; Francis, F. J. (1976). "Pigments" in Principles of Food Science Part 1 Food Chemistry, Fenemma Owen R., 4ª pr., Marcel Dekker, New York. pp. 413-416
- 6) Coulson, J. (1980). "Miscellaneous naturally occurring colouring colouring materials for foodstuffs", en Development in Food Colours -1 (The development series), Applied Science Publishers LTD, London pp. 189-217.
- 7) Dinesen, N. (1975). "Toxicology and Regulation of Natural Colors, Simposium :utilization of plant pigments", Food Techol. 29(5),40.

- 8) Dominguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica, Limusa, México. pags.20-27
- 9) Drake J. (1980) "Toxicological Aspects " en Developments in Food Colors -1 (The Developments series), Applied Science Publishers LTD, London, pp. 219-235
- 10) Egan, H.; Kirk, R.S.; Sawyer, R. (1987) Análisis de Alimentos de Pearson, tr del inglés por Ma. del Consuelo Hidaigo y Mondragón, 2a. impr., Compañía Editorial Continental, México pags.19-36
- 11) Fernicola A.G.G.,N; Jauge P. (1985) Nociones básicas de Toxicología. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS/OMS. México pags. 4-13.
- 12) IFT (1980). "Food Colors". A scientific status summary by the IFT Expert Panel on Food Safety & Nutrition and the Committee on public information, Food Technol., 34(7),77-84
- 13) Hegnauer, R. (1969). Chemotaxonomie der Pflanzen Band 5, Birkhäuser Verlag Basel und STUTTGART, pp. 199-205
- 14) Harborne, J.B. (1984) Phytochemical Methods, 2nd edn., Chapman and Hall, London. pp. 4-20
- 15) Kirk - Othmer (1979). Encyclopedia of Chemical Technology, 3rd. ed., John Wiley and sons.

- 16) Mabry, T.J. (1966). "The betacyanins and betaxanthins" in Comparative Phytochemistry, Swain, T. Academic Press, London pp. 231-243.
- 17) Mabry, T.J.; Taylor, A.; Turner, B.L., (1963) "The betacyanins and their distribution" Phytochem. 2,61-64
- 18) Martinez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, 1ª ed. Fondo de Cultura Económica, México.
- 19) Meggos, H.N. (1984). "Colors-Key Food Ingredients" Food Technol. 38(1),70-74.
- 20) Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E. et al, (1982) "Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plants Constituents" Planta Medica 45,31-33
- 21) Minale, L.; Piatelli, M.; et. al., (1966). "Pigments of Centrospermae - VI. Acylated Betacyanins" Phytochem. 5,1037-1052.
- 22) Piatelli, M; Imperato, F. (1970). "Betacyanins from Bougainvillea". Phytochem. 9,455-458
- 23) ----- (1970) "Pigments of Bougainvillea glabra", Phytochem. 9,2557-2560.

- 24) Piatelli, M. Minale, L. (1964). "Pigments of Centrospermae - II. Distribution of Betacyanins" *Phytochem.* 3, 547-557
- 25) Rosetta, L. (1986). "Food Colors. A scientific status summary by IFT expert panel on Food Safety & Nutrition. *Food Technol.* 40(7),49-56
- 26) Saguy, I. (1979). "Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin - I): Influence of pH and Temperature". *J Food Sci.* 44,1554-1555.
- 27) Sanchez, S.O. (1980) *La Flora del Valle de México*, reimp, México pags. 154-157
- 28) Shriner, R. (1972) *Identificación Sistemática de compuestos orgánicos*. 1ª reimr., Limusa, México. pags.269-272, 320-324
- 29) Stahl, E. (1969) *Thin layer Chromatography. A laboratory Handbook*, 2nd. ed., Springer-Verlag, Berlin pp.580-581,810-816.
- 30) Vogel, A. (1980). *Vogel's Elementary Practical Organic Chemistry*, 3rd. ed., Longman, London. pp. 312-313
- 31) ----- (1978). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, including qualitative organic analysis, 4th. ed., Longman, London, pp 1372

- 32) Von Elbe, J.H. (1975). "Stability of Betalaines as Food Colors. Symposium: Utilization of Plant Pigments, Food Technol., 29(5), 42-46.
- 33) Weissler, A. (1975) "FDA Regulation of Food Colors" Symposium : Utilization of plant pigments." Food 29(5), 38, 46.