



Ciencia e Ingeniería de
Materiales



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

**“ESTABILIZACIÓN DE UN COLORANTE
NATURAL (BETALAÍNA) USANDO PARTÍCULAS
CERAMICAS PARA SU EMPLEO EN
ALIMENTOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA

E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A

I.Q. MARÍA CELENE MÉNDEZ ESPINOZA

Director de Tesis: Dra. Miriam Rocío Estévez González

México, DF

2010



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.

RESUMEN

Reacciones de estabilización son propuestas para incrementar la durabilidad de un colorante natural (betalaína) contra los efectos de Temperatura, Luz UV, pH, (por mencionar algunos), aumentando el número de aplicaciones que hasta ahora presentan los colorantes naturales. El colorante betalaína es obtenido de la planta betabel (*Beta Vulgaris*). Se diseñó un método de extracción, seis sistemas de estabilización usando principalmente partículas cerámicas de SiO_2 (hidrolizadas del Tetraetilortosilicato) para las reacciones. Las muestras en polvo del colorante obtenidas después de un proceso de liofilización fueron sujetas a pruebas de estabilidad (calentamientos, exposición a luz UV, pH alcalinos y agua), haciendo la comparación con el colorante natural (sin reacción). Se cuantifico el color rojo (betanina) después de cada prueba mediante espectrofotometría UV-VIS. Se realizó una evaluación del color rojo de los sistemas de estabilización y el colorante natural ya aplicados en bebidas simuladas, mediante un espectrofotómetro. Finalmente un análisis de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se llevó a cabo para el colorante con mejor comportamiento en estabilidad con la finalidad de obtener información de la existencia de partículas de óxido de silicio (SiO_2) rodeando a la molécula betanina.

Palabras claves: colorante natural, betalaina, partículas ceramicas, betanina, tetraetilortosilicato, estabilización.

ABSTRACT

React stabilization are proposed to increase the sustainability of a natural dye (betalains) against the effects of temperature, UV light, pH, (to name a few), increasing the number of applications so far has natural colors. The dye is obtained from beet plant (*Beta vulgaris*). Design an extraction method, six stabilization systems using mainly SiO₂ ceramics particles (hydrolyzed tetraethylorthosilicate) for reactions. Samples of the dye powder obtained after freeze-drying process were subjected to stability tests (heating, exposure to UV light, alkaline pH, water) making the comparison with natural coloring (no reaction). We quantified the color red (betanine) after each test by UV-VIS spectrophotometer. Assessment was carried red stabilization systems and natural dye and applied to simulated drinks through a spectrophotometer. Finally, a nuclear magnetic resonance analysis of ¹H and ¹³C was carried out for the best performing dye stability, with the purpose of obtaining information about the existence of particles of silicon oxide (Si-O-Si) surrounding the betanina molecule.

Keywords: natural dye, betalain, ceramics particles, betanine, tetraethylortosilicate, stabilization.

DEDICATORIA

Este trabajo es para mis padres, Hortencia Espinoza y Jesús Méndez, que con su mayor esfuerzo y apoyo han logrado que en este momento de mi vida este dando un paso más a mi formación personal. A mi hermano Jesús Olaf, por darme motivos para seguir adelante, para que sigas creciendo profesionalmente. A José Antonio Guerra, porque gran parte de este trabajo también es tuyo.

Esto es de ustedes que siempre han estado detrás de mí para levantarme cuando este a punto de caer. Los quiero muchoii

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Dios el seguir fortaleciéndome en esta vida, el iluminarme en momentos difíciles y el permitirme ser lo que hasta ahora soy.

A mis papas: No me alcanzarían las palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, sé que hemos pasado por difíciles etapas pero les agradezco que en todo momento me hayan y sigan dando palabras de aliento que me permiten continuar y poner todo de mi parte para no defraudarlos. Los amo y siempre habrá motivos para agradecerles.

A olafo: Gracias hermanillo por existir y porque el saberte mi hermano me hace sentir responsable de ti. Esto es solo algo de lo que se puede lograr si tú lo deseas. TQM.

A Jagc (toñito): Tú sabes lo mucho que me has ayudado y apoyado en todo este tiempo. Mil gracias por estar siempre conmigo en los momentos más importante de mi vida, gracias por auxiliarme en este proyecto y echarme la mano, gracias por tus consejos que me ayudaron a pensar siempre positivamente, pero sobre todo gracias por ser parte de mi vida. Te Amo.

A la Dra Miriam: Le agradezco su confianza para realizar este proyecto y su apoyo tanto académico como personal brindado. Gracias por su tiempo y su valiosa colaboración en este trabajo de investigación, así como su increíble amistad y consejos.

A los doctores Rogelio, Susana, Pedro: Gracias por su gran apoyo, amistad y tiempo brindado durante mi estancia en Cfata. Por sus críticas que me han ayudado a crecer como persona. Gracias Dr. Pedro por confiar en mí y prestarme su equipo de laboratorio.

Al Dr. Fernando: Le agradezco toda su dedicación, amistad y apoyo brindados, usted me brindo un importante incentivo que me hizo echarle muchas ganas para no quedarles mal. Mil gracias.

A mis grandes amigos Yuli, Dany: Gracias infinitas por ese recibimiento que nos dieron cuando no teníamos nada, gracias por compartirnos sus mejores momentos, por darnos siempre un espacio en su corazón y por su tiempo para ayudarnos cuando los necesitábamos, los quiero mucho y espero nunca dejar de ser su amiga. A Laez: A ti mí querido amigo te agradezco tu valiosa amistad y apoyo en más de estos dos años, fue un

gusto compartir contigo esta parte de mi vida. Gracias también por el apoyo moral, porque sabemos que esta maestría no fue tan fácil, tqm.

A Mari Tere, Yoxkin, Gerardo, Alfredo, Peña (negrito), Luza, Astrid, Carlos Ortiz, Diego (maquina), Erik, Erika (taço), Flor, Luis Ida, Minerva (mine), Néstor (gordo), Jesús (chucho risas), Iván (talivan), Bárbara, Dany, Miriam, Luis parcero: Gracias por hacernos menos difícil esta estancia, por su amistad, por ayudarnos cuando lo necesitábamos, por asesorarnos en cosas que no entendíamos, y por considerarme dentro del equipo de voleibol ¡aja me gustó mucho aprenderlo. Fue un gusto conocerlos, créanme que siempre los recordare y se les extrañara. A Paloma: por su grandísimo apoyo para la realización de cualquier trámite pero sobre todo por su amistad sincera y su simpatía hacia mi persona, se te extrañara.

A Maribel y Ángel ramón: gracias por auxiliarme dentro del laboratorio, por su amistad y paciencia si es que alguna vez me la tuvieron, pero sobre todo por su tiempo ya que estaban ahí cuando los necesitaba.

A mis jurados, Dra. Miriam Estévez, Dra. Susana Vargas, Dr. Francisco Quintanilla, Dr. Sergio Jiménez, Dr. Pedro Salas: Gracias por su valioso tiempo para la revisión de este trabajo ya que con sus puntos de vista le dieron un mejor panorama a mi proyecto de investigación.

Al centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada por recibirme y permitirme ejercer como persona. A todos mis catedráticos que me hicieron poner a trabajar mi cerebro, gracias por sus enseñanzas. A los laboratorios de Dispersión de Luz y Catálisis por prestarme las herramientas necesarias para la elaboración de este trabajo. Al laboratorio neurobiología y al laboratorio de nutrición animal de la UAQ, por permitirme el uso de equipos para la realización de este proyecto. De igual manera al Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) y a la empresa ALTECSA, por la realización de pruebas que le dieron un mejor enfoque a este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado un apoyo económico para la realización de este proyecto y sustentarme durante estos dos años. A CONCYTEQ, por su apoyo para poder asistir a congresos internacionales y poder dar a conocer mi trabajo de investigación.

“El agradecimiento es la memoria del corazón”. Para todas las personas que me ayudaron, estarán siempre presentes.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
JUSTIFICACIÓN	5
CAPÍTULO 1	7
1. Antecedentes	7
1.1. Historia del uso de los colorantes naturales.....	7
1.2. Definición de colorante.....	10
1.3. Clasificación de los colorantes	10
1.4. Regulación de colorantes.....	13
1.5. Colorantes disponibles en la actualidad.....	14
1.6. Normas de los colorantes.	17
1.7. Tendencias del mercado.....	18
1.8. Disponibilidad y Demanda de los colorantes.	19
1.9. Problemática en la utilización de los colorantes sintéticos.....	20
CAPÍTULO 2	21
2. Marco teórico.....	21
2.1. Colorantes naturales.....	21
2.2. Fuentes de colorantes naturales y aplicaciones.....	21
2.3. Principales pigmentos de origen vegetal.....	22
2.3.1. Carotenoides.	22
2.3.2. Clorofilas	23
2.3.3. Flavonoides.	24
2.3.4. Antocianinas.	25
2.3.5. Ácido carmínico.	26
2.3.6. Betalaínas.....	27
2.3.6.1. Estructura.	29
2.3.6.2. Betacianinas.....	29

2.3.6.3. Betaxantinas.....	31
2.3.6.4. Clasificación de betacianinas y betaxantinas.	32
2.4. Betalaínas como aditivo alimentario.....	34
2.5. Estabilidad de las betalaínas.....	35
2.5.1. pH.....	36
2.5.2. Temperatura.....	37
2.5.3. Luz.....	39
2.5.4. Oxígeno.....	40
2.5.5. Actividad de agua.....	40
2.5.6. Efecto de antioxidantes y secuestrantes.....	40
2.5.7. Efecto de enzimas.....	41
2.6. Aspectos de la fuente natural utilizada “Betabel (Beta vulgaris)”.....	42
CAPÍTULO 3	44
3. Generalidades.....	44
3.1. Intercambio Iónico.....	44
3.2. Extracción-Estabilización.....	45
3.2.1. Métodos de extracción.....	45
3.2.2. Estabilización.....	47
3.2.2.1. TEOS/Oxido de silicio (SiO ₂).....	47
3.2.2.2. Hidrólisis y Condensación.....	49
3.3. Espectroscopía UV-visible.....	50
3.4. Espectroscopia RMN (Resonancia magnética nuclear).....	52
3.4.1. Naturaleza de las absorciones de resonancia magnética nuclear.....	53
3.4.2. Desplazamientos químicos.....	53
3.4.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear del ¹³ C.....	54
3.4.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ¹ H.....	54
CAPÍTULO 4	55
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	55
4.1. Materiales.....	55
4.1.1. Materia Prima.....	55
4.1.2. Equipo de laboratorio.....	55
4.1.3. Equipo analítico.....	57
4.1.4. Reactivos.....	57
4.2. Metodología.....	58
4.2.1. Evaluación de resinas de intercambio iónico.....	58

4.2.1.1. Especificación de resinas.	58
4.2.1.2. Condiciones de operación.	59
4.2.1.3. Método para la evaluación de resinas de intercambio iónico.	60
4.2.2. Método de Extracción - Estabilización del colorante betalaína.	62
4.2.2.1. Método de extracción.	62
4.2.2.2. Método de estabilización.	62
4.2.3. Método de liofilización.	69
4.2.4. Pruebas de Estabilidad.	71
4.2.5. Caracterización del colorante.	73
4.2.5.1. Caracterización por espectroscopía UV-VIS.	73
4.2.5.2. Cuantificación de color rojo, betanina.	74
4.2.5.3. Evaluación de estabilidad del color en bebidas simuladas.	74
4.2.5.4. Resonancia Magnética Nuclear.	77
CAPÍTULO 5	78
5. Resultados: Análisis y discusión	78
5.1. Evaluación de resinas de intercambio iónico.	78
5.2. Extracción-Estabilización.	82
5.3.1. Pruebas de estabilidad - Cuantificación de color rojo (betanina).	87
5.3.2. Evaluación de estabilidad del color en bebidas simuladas.	103
5.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).	110
CONCLUSIONES	116
BIBLIOGRAFÍA	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla. 1.1. Colorantes publicados en el Acta de alimentos y Medicamentos Puros-	9
Tabla.1.2. Cromóforos Fuertes-----	12
Tabla.1.3. Cromóforos débiles-----	12
Tabla.1.4. Colorantes permitidos por la Comunidad Económica Europea (CEE) y por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (F.D.&C.)-----	15
Tabla.1.5. Colorantes exentos de certificación para Estados Unidos-----	16
Tabla.1.6. Colorantes permitidos en México-----	17
Tabla.2.1. Principales sustituyentes identificados en betalaínas naturales-----	33
Tabla.4.1. Condiciones de operación de resinas de intercambio iónico-----	59
Tabla.4.2. Pesos de las muestras para llevar a cabo la dilución de las bebidas ----	76
Tabla.5.1. Volumen cargado de jugo de betabel -----	78
Tabla.5.2. Volumen retenido por cada resina de intercambio iónico-----	80
Tabla.5.3. Volumen usado de acetato de amonio para la desorción de color por cada resina -----	81
Tabla.5.4. Pesos de colorante en gramos obtenido en cada sistema-----	83
Tabla.5.5. Valores de absorbancia inicial y final a 45°C y 70°C de temperatura durante 5 min, para betanina y betaxantina-----	88
Tabla.5.6. Porcentaje en color rojo (betanina) y pérdida del color durante el tratamiento térmico a 45 y 70°C-----	89
Tabla.5.7. Valores de absorbancia inicial y final de betanina y betaxantina frente la radiación UV-----	91
Tabla.5.8. Porcentaje inicial y final de color rojo (betanina) frente a la radiación UV y pérdida del color después de 30 min. de radiación-----	92
Tabla.5.9. Valores de absorbancia para betanina y betaxantina en la prueba de estabilidad a pH-----	94
Tabla.5.10. Porcentaje en color rojo de acuerdo al cambio de pH-----	95

Tabla.5.11. Absorbancias y porcentaje de color rojo de betanina inicial y después de 20 días. Pérdida de color rojo (%) -----	97
Tabla.5.12. Valores en absorbancia para la segunda evaluación de los sistemas de estabilización a 45°C y 70°C durante 10 min-----	100
Tabla.5.13. Porcentaje de color rojo inicial y después del tratamiento térmico a 45°C y 70°C, así como pérdida de color rojo después del calentamiento para la segunda evaluación-----	101
Tabla.5.14. Absorbancias de radiación UV, segunda evaluación-----	102
Tabla.5.15. Porcentaje en color rojo de betanina inicial y después de 30 minutos de radiación. Pérdida de color rojo-----	103
Tabla.5.16. Análisis de los parámetros de espacio color L*a*b* para las bebidas sin calentamiento inicial a temperatura ambiente y al sol-----	105
Tabla.5.17. Análisis de los parámetros de espacio color L*a*b* para las bebidas con calentamiento inicial a temperatura ambiente y al sol-----	107
Tabla.5.18. Valores teóricos citados para las señales de Resonancia Magnética Nuclear de protones 1H y carbono 13 (13C) para la molécula de betanina-----	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1.1. Clasificación de los colorantes naturales -----	11
Fig.1.2. Porcentaje de mercado de los colorantes alimentarios -----	18
Fig.1.3. Mercado estimado para los colorantes en México -----	19
Fig.2.1. Estructura química del β -Caroteno -----	23
Fig.2.2. Estructura química de la luteína -----	23
Fig.2.3. Estructura química de la clorofila a y b -----	24
Fig.2.4. Estructura química del Flavonol -----	25
Fig.2.5. Estructura química de Flavona -----	25
Fig.2.6. Estructura química de la Pelargonidina -----	26
Fig.2.7. Estructura química de la Cianidina -----	26
Fig.2.8. Estructura del ácido carmínico -----	27
Fig.2.9. Estructura general de las betalaínas -----	28
Fig.2.10. Estructura del ácido Betalámico -----	28
Fig.2.11. Transformación estructural del cromóforo de betalaína -----	29
Fig.2.12. Estructura de las Betacianinas -----	30
Fig.2.13. Betanina -----	31
Fig.2.14. Indicaxantina -----	31
Fig.2.15. Miraxantina III, Miraxantina IV -----	31
Fig.2.16. Vulgaxantina I, Vulgaxantina II -----	32
Fig.2.17. Lugares posibles de descarboxilación (línea de puntos, ovalada), deshidrogenación (línea continua, cuadrado) y desglicosilación (línea de puntos en trazos, círculo) en betacianinas -----	36
Fig.2.18. Degradación reversible de la betanina -----	38
Fig.2.19. Diagrama de degradación de la Betanina -----	39

Fig.3.1. Orientaciones de los espines o giros nucleares en el campo magnético-----	52
Fig.4.1. Betabel -----	55
Fig.4.2. Centrifugación -----	63
Fig.4.3. Rotor JS 13.1 -----	63
Fig.4.4. Columna con la resina de intercambio iónico -----	64
Fig.4.5. Retiro de azúcar libre, sabor y otros componentes orgánicos, con la solución de acetato de amonio -----	65
Fig.4.6. Recolección del color -----	65
Fig.4.7. Esquema de reacción de estabilización -----	66
Fig.4.8. Frascos para liofilizar -----	67
Fig.4.9. Montado de muestras en el equipo de liofilización -----	67
Fig.4.10. Diagrama general del método extracción-estabilización -----	68
Fig.4.11. Congelamiento de muestras -----	70
Fig.4.12. Liofilizadora -----	70
Fig.4.13. Radiación UV -----	71
Fig.4.14. Muestras diluidas del colorante natural y modificado en tubos de ensaye para realizar calentamientos -----	72
Fig.4.15. Espectrofotómetro Genesys 2PC -----	73
Fig.4.16. Celdas ópticas rectangulares -----	73
Fig.4.17. Espectrofotómetro Minolta -----	76
Fig.5.1. Retención de color -----	78
Fig.5.2. Desorción de color -----	80
Fig.5.3. Colorantes en polvo -----	83
Fig.5.4. Mecanismo propuesto de la reacción de estabilización -----	85

Fig.5.5. Espectro de absorción del colorante (betalaína) extraída del betabel --	87
Fig.5.6. Tratamiento térmico a 45°C y 70°C durante 5 min -----	88
Fig.5.7. Espectro de absorción de radiación UV -----	91
Fig.5.8. Sistemas de estabilización ante el cambio de pH -----	93
Fig.5.9. Espectros de estabilidad al agua, absorbancias iniciales y después de 20 días -----	96
Fig.5.10. Colorantes de cada sistema de estabilización después de 45 días almacenados en frascos ambar y a temperatura ambiente -----	98
Fig.5.11. Espectros de absorción de estabilidad a la temperatura al cabo de 45 días. Tratamiento térmico a 45°C y 70°C durante 10 minutos -----	99
Fig.5.12. Estabilidad a radiación UV. Segunda evaluación de los sistemas de estabilización -----	101
Fig.5.13. Muestras de colorantes diluidos en agua destilada. a) Color inicial, sin calentamiento. b) Colorantes analizados a temperatura ambiente sin calentamiento. c) Colorantes sin calentamiento y expuestas al sol por 3 días--	104
Fig.5.14. Muestras de colorantes diluidos en agua destilada. a) Color inicial, sin calentamiento. b) Colorantes con calentamiento a temperatura ambiente (3 días). c) Colorantes con calentamiento y expuestas al sol por 3 días -----	106
Fig.5.15. Espectro de absorbancia en bebidas sin calentamiento. Patrón, N y 2RTA -----	108
Fig.5.16. Espectro de absorbancia en bebidas con calentamiento. Patrón, N y 2RTA -----	109
Fig.5.17. Espectros de RMN, a) 1H -colorante natural, b) 13C-colorante natural	110
Fig.5.18. Espectros de RMN, a) 1H-sistema 2RTA, b) 13C-sistema 2RTA -----	111
Fig.5.19. Numeración de los carbonos e hidrógenos en betanina para la identificación de los espectros RMN -----	119

INTRODUCCIÓN

Vivimos en un mundo lleno de color, en los paisajes, las plantas, los animales, en nosotros mismos. El color representa una parte esencial en el desarrollo del hombre, en sus diversas manifestaciones sociales, culturales, ambientales, etc. El color se basa en una serie de procesos físicos, químicos, fisiológicos, y psicológicos [1].

Las sensaciones que percibe el hombre cuando observa un objeto en particular las asocia con las cosas que le rodean, esto es especialmente evidente en el área alimentaria, donde la relación entre el color y el sabor son muy importantes para que el consumidor adquiera un producto ya que con el hecho de verlo, lo sustituirá por otro si no cumple con las propias “normas de calidad” del consumidor, como el no tener un color homogéneo y consistente, por lo que se busca siempre una apariencia natural [2].

Actualmente existe un gran interés en limitar el uso de colorantes artificiales utilizando en su lugar colorantes naturales. Esto es debido a las disposiciones, emitidas por la Food & Drug Administration de los Estados Unidos de Norteamérica. La situación actualmente es crítica, debido a que existe en el mundo gran desconfianza en cuanto a la completa inocuidad de los colorantes artificiales, por lo que la Food & Drug Administration constantemente realiza estudios y el número de colorantes sintéticos que pueden aplicarse en bebidas y alimentos van disminuyendo en forma continua. Por otra parte, hay una creciente búsqueda de nuevas fuentes para la extracción de colorantes naturales como son betalaínas, clorofilas, carotenoides y flavonoides, entre otros. Además, se busca sustituir a los colorantes sintéticos sobre todo los rojos [3]. Una razón por la cual se prefieren los pigmentos naturales es que son de menor toxicidad que los colorantes sintéticos en una misma dosis, concentración y metabolismo humano [4]. Debido a esto se han intensificado los estudios orientados a utilizar colorantes naturales, como posibles colorantes alimenticios.

Los colorantes en el área de los alimentos se usan para [2]:

- Restablecer la apariencia original de los alimentos donde los colorantes han sido destruidos por el proceso de manufactura, almacenamiento y control de los alimentos.
- Asegurar la uniformidad del color debido a las variaciones naturales en la intensidad en color.
- Ayudar a proteger el sabor y las vitaminas sensibles al calor durante su empaque, por un efecto de exposición al sol.
- Ayudar a preservar la identidad o carácter por la cual los alimentos son reconocidos.
- Como indicativo visual de la calidad del producto.

Los pigmentos rojos obtenidos de raíces de betabel (*Beta vulgaris L.*) han presentado considerable interés como pigmentos naturales, pertenecientes al grupo de las *betalaínas* [5]. Son pigmentos nitrogenados que remplazan a las antocianinas en un pequeño número de familias de plantas relacionadas taxonómicamente [6,7]. Las betalaínas se acumulan en flores, frutos y ocasionalmente en tejidos vegetativos de las plantas pertenecientes a la mayoría de las familias de los Caryophyllales [8]. Las betalaínas también se han detectado en algunos hongos, por ejemplo, en la amanita muscaria [9].

Aunque existen colorantes rojos naturales como las de carotenoides, antocianinas y las del betabel en el procesamiento de alimentos, las betalaínas suelen ser menos comunes que las antocianinas y carotenoides, aunque estas sean pigmentos solubles en agua, estables a pH 3 y 7 [9].

Las betalaínas describen a dos grupos principales, las betacianinas y betaxantinas [10]. La principal betacianina del betabel es la *betanina*.

Un amplio conocimiento sobre la degradación de betalaína y estrategias para su estabilización está destinado a aumentar la demanda de esta clase de pigmento

hasta ahora infravalorado [11]. Un requisito evidente en un colorante es su estabilidad a largo plazo, debiendo resistir no solo los procesos industriales a los cuales están sometidos los alimentos sino también a las condiciones de pH e interacción con otros componentes de los alimentos en los cuales se encuentra. Se conoce que la estabilidad de los colorantes naturales es menor que la de su contraparte sintética, es por eso que la estabilidad es considerada un factor importante y limitante, ya que restringe su uso para aplicaciones en alimentos y demás productos en los cuales se puedan aplicar.

Por tal motivo, en el presente trabajo de investigación se plantean las condiciones de extracción y sistemas de estabilización para un colorante natural (Betalaína) proveniente del betabel (*Beta vulgaris*) con el fin de incrementar su uso en la industria alimentaria y otras aplicaciones.

La reacción de estabilización del colorante natural se basó en los grupos carboxilos de la betanina (molécula cromófora), y en la molécula del Tetraetilortosilicato (TEOS). Mediante reacciones de hidrólisis – condensación del TEOS se llegara a la formación de partículas de óxido de silicio, estas partículas serán enlazadas con tres grupos carboxilos y un carbón de la molécula de betanina, conformando así una red de SiO_2 que pueda rodear y proteger a la betanina.

Este proyecto de investigación se dividió en 4 capítulos los cuales se resumen a continuación:

En el **Capítulo 1** se tratan los antecedentes, fundamentando la importancia de los colorantes naturales, su existencia desde tiempos antiguos y por qué se sugirieron como los indicados para remplazar a los sintéticos. **Capítulo 2** se describen los colorantes naturales, el concepto de betalaína, sus componentes principales como las betacianinas y betaxantinas, la estructura química, propiedades, factores que afectan a su estabilidad y su uso dentro de la industria alimentaria.

En el **Capítulo 3** se presentan las generalidades de técnicas empleadas en este proyecto. Intercambio iónico: utilizada para el retiro de azúcar libre y retención de color del jugo de betabel. Estabilización: método que se implementó para aumentar la durabilidad del color de la betalaína. Técnicas de caracterización: Espectrofotometría UV usada para corroborar la presencia de picos correspondientes a betalaína así como su cuantificación de color rojo, y Resonancia Magnética Nuclear para relacionar la estructura de betanina con las partículas de óxido de silicio. El **Capítulo 4** describe la parte experimental del proyecto, se especifican los materiales utilizados y las metodologías empleadas para la realización de este. Por último en el **Capítulo 5** se hace el análisis y discusión de los resultados obtenidos en el capítulo 4.

OBJETIVO GENERAL.

Mejorar la estabilidad de un colorante natural (Betalaina) usando partículas cerámicas, para su empleo en productos de categoría alimenticia y/o demás aplicaciones comerciales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Desarrollo de un método para la obtención del colorante natural.
- Establecer los sistemas de estabilización (reacciones de estabilización) para mejorar la estabilidad del colorante natural.
- Pruebas de estabilidad: temperatura, radiación UV, cambios de pH y agua.
- Caracterización del colorante natural; Espectrofotometría UV (cuantificación de color rojo). Resonancia Magnética Nuclear.
- Aplicación del colorante en bebidas y evaluación de estabilidad.

JUSTIFICACIÓN.

A raíz de la creciente preocupación por posibles efectos tóxicos de los colorantes sintéticos, se postulan como posibles reemplazantes a los pigmentos de origen natural. Son muy pocos los alimentos industrializados que no tienen colorantes a pesar de que el color es considerado un importante atributo de un alimento, aumentando su atractivo o más aún, vinculándolo con su calidad.

Al igual que la mayoría de los aditivos alimentarios, los colorantes son en general de origen sintético. Sin embargo, en vista de las dosis relativamente altas que se pueden llegar a consumir de estos ubicuos compuestos se ha empezado a poner mayor atención a los efectos sobre la salud, como ejemplo, en niños siendo la cifra mayor dado su bajo peso [10].

Como resultado de esto, las autoridades sanitarias han ido retirando la autorización de uso de un gran número de compuestos. Por ejemplo, la FDA ha reducido la lista de colorantes sintéticos autorizados de setecientos a siete [10] y la EFSA (Agencia de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea) ha recomendado minimizar el agregado de aditivos en general, utilizándolos solamente cuando haya una necesidad real vinculada con la preservación, sabor o estabilidad de los alimentos.

En general, las desventajas que llegan a presentar los colorantes naturales es que su costo puede ser elevado debido a los procesos de extracción y purificación los cuales llegan a ser complicados. Por otro lado, la mayoría de este tipo de colorantes suelen ser inestables por lo cual su uso es restringido. En base a esta inestabilidad presente en colorantes naturales, lo que se propone en este trabajo es mejorar la estabilidad de la Betalaina. Esta estabilización será a través de su principal componente Betanina (molécula cromófora que constituye el mayor porcentaje de color rojo en el betabel), justificando que esta molécula cromófora puede ser capaz de reaccionar mediante sus grupos carboxilo con las partículas de óxido de silicio hidrolizado del TEOS y llegar a formar una red de óxido de silicio (sílice) que pueda protegerla de factores que afectan a cualquier colorante natural.

CAPÍTULO 1

1. Antecedentes

1.1. Historia del uso de los colorantes naturales.

Los colorantes han sido ampliamente utilizados en la preparación de alimentos y bebidas, y a nivel mundial constituyen una importante contribución en la preparación y procesamiento de los mismos. Antes del desarrollo de la industria de colorantes la síntesis y el teñido de las fibras se hacían con plantas conteniendo colorantes naturales, llamadas especies tintóreas, que eran cultivadas a gran escala constituyendo una importante fuente de ingresos para los países productores [12].

Algunas de estas plantas son: *cártamo* o *alazor*, este es uno de los cultivos más viejos de la humanidad. Es una planta que aunque originalmente fue cultivada por sus flores, el cultivo se destinó a la industria de colorante amarillo y rojo. *Genista tinctoria* planta poco conocida, hasta el siglo XV se empezaron a realizar estudios sobre ella. Se usaba por su color amarillo, gracias a un producto llamado luteolina que contienen las flores. *Aladierno* otra planta usada desde la antigüedad, la parte utilizada fue la raíz ya que aportó colores rojo, naranja y rosado [13].

La adición de colorantes para alimentos se cree que ocurrió en las ciudades egipcias, donde los fabricantes de dulces alrededor de 1500.a.C. añadieron extractos naturales y vino para mejorar la apariencia de sus productos [14]. Desde los tiempos prehistóricos hasta la mitad del siglo XIX, el teñido fue hecho con colorantes naturales. La importancia de estos colorantes naturales disminuyó cuando en 1856 el inglés William Henry Perkin, en su intento de sintetizar quinina, óxido de sulfato de anilina con dicromato potásico produjo el primer colorante sintético: *la mauveína*, de color púrpura o también llamada en su honor púrpura de Perkin [12,10]. Posteriormente, los químicos alemanes, perfeccionaron los colorantes derivados del alquitrán de hulla hasta tal punto que empresas de colorantes vegetales, se arruinaron totalmente antes de que finalizara el siglo XIX.

A raíz de la revolución industrial, la industria alimentaria se desarrolló rápidamente. La adición de color a través de minerales y compuestos a base de metal se utilizó para disimular la baja calidad y alimentos adulterados, algunos ejemplos son [10]:

- Rojo de plomo (Pb_3O_4) y bermellón (HgS) se usaron rutinariamente para el color de queso y productos de confitería.
- Se utilizó el arseniato de cobre para recolorar las hojas de té para su reventa. Causo dos muertes cuando se utilizó para un postre de color en 1860.

En 1900 comenzó la mayor parte de colores químicamente sintetizados derivados de la anilina, un producto de petróleo que es tóxico. Originalmente, estos eran conocidos como colores "alquitrán" porque los materiales de partida se obtuvieron a partir de carbón bituminoso [10]. En esta misma década, la oficina de química del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América contrató al Doctor Bernard C. Hesse, experto alemán en colorantes, para que estudiara el efecto que tenían en la salud de los consumidores la ingestión de los pigmentos y conservadores empleados en los alimentos [15]. Su opinión fue que cualquier colorante sintético podía ser utilizado en los alimentos siempre que fuera fisiológicamente inofensivo y tecnológicamente necesario [16].

Después de estudiar la información disponible sobre 284 colorantes empleados hasta ese momento en alimentos, solo aprobó la utilización de 7 de ellos. Esta lista fue publicada en 1907 en el Acta de Alimentos y Medicamentos Puros [16], y contenía los siguientes (Tabla 1.1):

Tabla 1.1. Colorantes publicados en el Acta de alimentos y Medicamentos Puros.

Colorantes (Nombre común)	Nombre posterior utilizado por F.D.A
Ponceau	F.D. &C. Rojo N°1
Amaranto	F.D. &C. Rojo N°2
Eritrosina	F.D. &C. Rojo N°3
Naranja 1	F.D. &C. Naranja N°1
Amarillo Naftol S	F.D. &C. Amarillo N°1
Verde Claro Amarillento SF	F.D. &C. Verde N°2
Indigotina	F.D. &C. Azul N°1

Con los años la industria de alimentos necesitó más pigmentos, de tal manera que en 1938, ocho nuevos colorantes se añadieron a la lista original de siete, y el proceso de certificación se hizo obligatorio, es decir, para permitir el uso en alimentos de un nuevo colorante se requería de presentación de un certificado que indicara que el pigmento en cuestión había sido estudiado por expertos y que después, de realizarle análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos, se habían comprobado que estaba libre de componentes nocivos a la salud [16,17].

Antes de 1938 los colorantes de alimentos eran conocidos por sus nombres comunes, pero para asegurar que no se confundieran con pigmentos elaborados para otros usos, a los colorantes específicos para alimentos se les designó con una nueva nomenclatura; así Ponceau 3R se convirtió en F.D.&C. Rojo N°1; Tartrazina en F.D.&C. Amarillo N°5, etc. Los colorantes F.D.&C. son más puros que los utilizados con fines industriales, a los cuales se les conoce con sus nombres comunes.

Químicamente los colores sintetizados simplemente fueron más fáciles de producir, menos caros y superiores en propiedades de color. Solamente fueron necesitadas pequeñas cantidades. Se mezclaban fácilmente y no impartían

sabores no deseados a los alimentos. Pero a medida que su uso creció, también las preocupaciones de seguridad [10]. Esto llevo a numerosas regulaciones por todo el mundo, que por ejemplo en los Estados Unidos la lista de colores sintéticos permitidos en el presente es de 7 de los 700 que fueron usados [10].

1.2. Definición de colorante.

La homogeneidad del color de los productos durante todo el año es fundamental, el público desea encontrar siempre el alimento con los mismos colores, por estas razones existen en el mercado diversos agentes que sirven para colorear, denominados colorantes [18].

Un colorante es un compuesto que imparte color, puede ser definido como la sustancia obtenida de los vegetales, animales, minerales o por síntesis, empleada para impartir o acentuar el color a los alimentos [19]. La definición entre colorante y pigmento a menudo se encuentra relacionado, aunque hay cierta diferencia entre ellos, ya que al pigmento se le caracteriza por ser responsable del color visble en una planta mientras que al colorante se le considera como un producto que colorea principalmente productos alimenticios como se menciono anteriormente.

1.3. Clasificación de los colorantes.

Existen varias formas de clasificar a los colorantes, estas se basan en su procedencia o fuente de origen, en su certificación, o por su grupo cromóforo; esto es, el radical que les confiere un determinado color [20, 21].

De acuerdo con su origen y procedencia, los colorantes son obtenidos por fuentes naturales, ya sean microorganismos, vegetales, animales o minerales y aquellos producidos por síntesis química (sintéticos) incluyendo los idénticos a los naturales. En la figura 1.1. se muestra dicha clasificación.

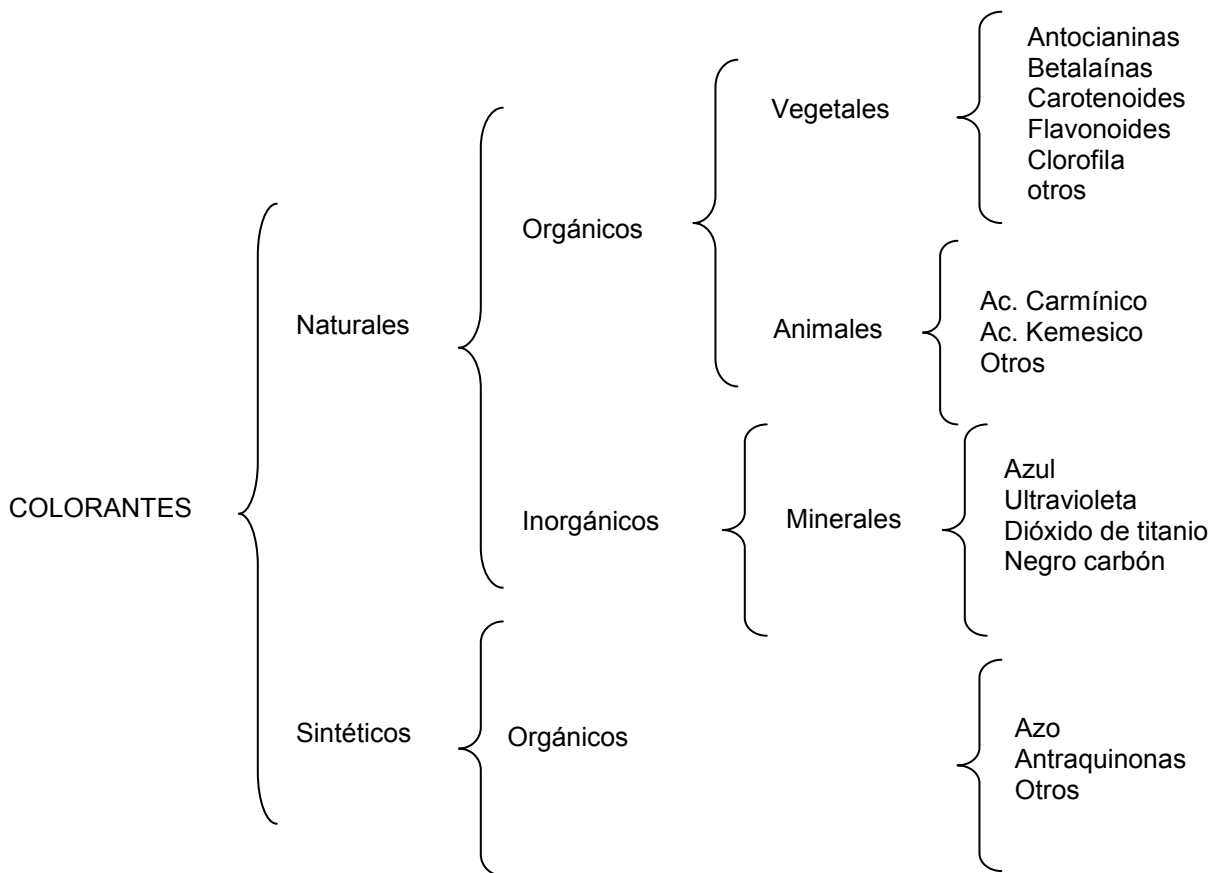


Fig.1.1. Clasificación de los colorantes naturales [22].

La clasificación con base a su certificación, se agrupa en dos bloques: 1. Aquellos colorantes que no requieren certificación y 2. Los que requieren certificación [23,24]. Los primeros incluyen a los colorantes obtenidos de fuentes naturales así como a los idénticos a los naturales, estos colorantes deben cumplir con especificaciones [20].

La FDA creó tres categorías para clasificar a los colorantes [25]:

1. Colorantes FD&C: Certificados para su uso en alimentos, drogas y cosméticos en general.

2. Colorantes D&C: Tintes y pigmentos considerados seguros en drogas y cosméticos ingeridos o usados en contacto directo con membranas mucosas.
3. Colorantes Ext. D&C: Colorantes que, por su toxicidad oral, no se usan en productos para ingestión, pero que son considerados seguros para su uso externo.

En base al grupo cromóforo existen dos tipos. Con el primer tipo de ellos llamado Cromóforos fuertes (Tabla 1.2.), basta la presencia de uno de ellos en la molécula para que ésta sea colora; mientras que con el segundo tipo llamados débiles (Tabla 1.3.) producen color solamente cuando se encuentran varios de ellos en la molécula.

Tabla 1.2. Cromóforos Fuertes [26].


Nombre	Cromóforos
Quinoide	
Azo	-N=N-
Nitroso	-N=O

Tabla 1.3. Cromóforos Débiles [26].

Nombre	Cromóforos
Doble enlace Carbono-Carbono	$\text{>C} = \text{C} <$
Compuestos Nitro	-NO₂
Aldehídos, cetonas, ésteres	$\text{>C} = \text{O}$

También existen grupos que por sí solos no producen color en una molécula, pero, cuando se encuentran en combinación con un cromóforo cambian el color o la tonalidad del mismo, son llamados Auxocromos (del griego auxo: aumentar). Estos son grupos radicales positivos de átomos que intensifican la acción de un grupo de átomos no saturados que, estando presentes en una molécula de una sustancia química, hacen que esta sea coloreada. Es decir, son grupos cargados positivamente que intensifican una sustancia o cromóforo en la síntesis de colorantes, capaces de donar electrones de pares no compartidos mediante un mecanismo de resonancia al sistema insaturado (posee al menos un doble enlace entre carbono-carbono) del cromóforo [26].

1.4. Regulación de colorantes.

Los colorantes se añaden a los alimentos en muchos países del mundo pero, el tipo de colorantes cuyo uso está permitido varía notablemente de unos países a otros. De cualquier manera, el comercio internacional es cada día más importante, por lo que la regulación sobre colorantes actualmente es una preocupación internacional. Desgraciadamente, no existe una lista mundial de todos los aditivos colorantes permitidos; por tanto, los aditivos colorantes en algunos casos representan una barrera al comercio. Sin embargo, los principios que rigen la legislación en alimentos son similares en todo el mundo. *La Unión Europea* se basa en tres principios importantes: 1) protección de la salud del consumidor, 2) prevención de fraudes, 3) eliminar barreras de comercialización. Las autoridades legislativas de la antes Comunidad Económica Europea (CEE) intentaron uniformizar la legislación para aditivos colorantes en los países del Mercado Común y a cada colorante permitido se ha asignado un número E [27].

En *Estados Unidos* a partir de 1938, el uso de colorantes está controlado por la FDA (Food and Drug Administration) y se refiere a dos categorías de colorantes: colorantes certificados y colorantes exentos de certificación [28,29]. El uso de colorantes alimenticios es gobernado por el Código Federal de Regulaciones (CFR). Es dividido en 50 y 21 títulos asignados a la Food & Drug Administration.

Las dos categorías mencionan lo siguiente [10]:

- Aditivos colorantes certificados.- colorantes FD&C. Estos son moléculas orgánicas producidas sintéticamente que su pureza ha sido controlada por la FDA. Hay 7 de estas, de los cuales uno es pigmento soluble en agua y 6 insolubles.
- Colorantes exentos de certificación. Estos son derivados de origen animal, vegetal, mineral o son duplicados sintéticos de colorantes naturalmente existentes. Como tales, contienen una mezcla compleja de numerosos componentes. Hay 26 de estos.

Desde un punto de vista reglamentario no hay tal cosa como un colorante natural. Aunque, en general se acepta que los colorantes exentos de certificación suelen ser naturalmente derivados.

En *México* se puede permitir el uso para alimentos (F), medicamentos (D) y cosméticos (C), pudiendo restringir su uso para alguno de los productos anteriores. Así mismo en algunas ocasiones se permite el uso restringiéndolo a medicamentos y/o cosméticos para aplicación externa únicamente (Ext) [30]. Las regulaciones para los aditivos alimentarios permitidos en México se encuentran en el Reglamento de Aditivos para alimentos, emitido por la Secretaría de Salud; por lo general adopta varias de las disposiciones de la FDA [30].

1.5. Colorantes disponibles en la actualidad.

Dentro del Reino Unido y muchas ciudades Europeas ha habido una clara tendencia al uso de colorantes naturales e idénticos a lo natural en los últimos 10-15 años. Esto ha sido como resultado de la presión de consumidores e importantes minoristas en desarrollar productos más naturales y limitar la inclusión de colorantes sintéticos en los alimentos.

En los USA, colorantes certificados (por ejemplo, sintéticos) han sido históricamente utilizados, principalmente debido a la gama, bajo costo y buena

estabilidad. Sin embargo, existe una tendencia creciente hacia productos naturales y el crecimiento en el mercado de color natural se prevé, por el hecho de que se aprueban solo siete colorantes sintéticos [10].

Dependiendo del país, se permite el uso de determinados colorantes. En la Tabla 1.4. se muestran los colorantes permitidos tanto para la Comunidad Económica Europea como para la Administración de Alimentos y Medicamentos y Cosméticos (por sus siglas en ingles F.D.&C), en donde se observa que para los colorantes sintéticos algunos son permitidos por la CEE mientras no lo son para la F.D.&C. Sin embargo para colorantes naturales todos son permitidos, incluyendo las betaninas. En la Tabla 1.5. se muestran los colorantes exentos de certificación para Estados Unidos (naturales). Comparando la Tabla 1.5. con los colorantes permitidos para México (Tabla 1.6.), ambas presentan semejanza en cuanto a los colorantes orgánicos naturales, y encontramos que el betabel deshidratado (polvo) esta aprobado tanto para EU como México.

Tabla 1.4. Colorantes permitidos por la Comunidad Económica Europea (CEE) y por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (F.D. &C) [31, 10].

Color	CEE	F.D &C.
Sintéticos		
Rojo allura AC	No permitido	F.D &C. Rojo N°40
Azul brillante FCF	No permitido	F.D &C. Azul N°1
Carmoisina	E122	No permitido
Eritrosina	E127	F.D &C. Rojo N°3
Verde rápido FCF	No permitido	F.D &C. Verde N°3
Indigotina	E132	F.D &C. Azul N°2
Ponceau 4R	E124	No permitido
Amarillo sunset FCF	E110	F.D &C. Amarillo N°6
Tartrazina	E110	F.D &C. Amarillo N°5
Colores poliméricos	No permitido	No permitido

Naturales		
Antocianinas	E163	Permitido
Betaninas	E162	Permitido
Carotenoides	E160	Permitido
Clorofila	E140	Permitido
Riboflavinas	E101	Permitido
Idénticos a los naturales	Permitido	Permitido

Tabla 1.5.

Colorantes exentos de certificación para Estados Unidos [32].

Extracto de annato
Betabel deshidratado (polvo)
Caramelo
β -apo-8-carotenol
β -caroteno
Extracto de cochinilla (carmín)
Harina de semilla de algodón (parcialmente tostada)
Glutamato de hierro
Extracto de cascara de uva (enocianina)
Jugo de frutas
Jugo de vegetales
Aceite e Zanahoria
Aceite de endospermo de maíz
Paprika
Riboflavina
Azafrán
Dióxido de titanio

Tabla 1.6. Colorantes permitidos en México [31].

<p>1. Colorantes orgánicos naturales</p> <p>Aceite de zanahoria (<i>Daucus carota</i>)</p> <p>Achiote, annato (extracto de semillas de <i>Bixa Orellana</i>)</p> <p>Azafrán, (estigmas de <i>Crocus sativus</i> L.)</p> <p>β-apo-8 carotenol</p> <p>Betabel deshidratado</p> <p>β-caroteno</p> <p>Caramelo</p> <p>Clorofila</p> <p>Cochinilla (extracto de <i>Coccus Cacti</i> L. o carmín)</p> <p>Cúrcuma</p> <p>Extracto de tegumento de uva (enocianina)</p> <p>Harina de semilla de algodón cocida y tostada (parcialmente desgrasada)</p> <p>Jugo de frutas</p> <p>Jugo de vegetales</p> <p>Riboflavina</p> <p>Dioxido de titanio</p>
<p>2. Colorantes orgánicos sintéticos o artificiales</p> <p>Amarillo No.5 (tartrazina)</p> <p>Azul No.2 (indigotina)</p> <p>Rojo cítrico No.2 (solo se permite para colorear)</p> <p>La corteza de la naranja</p> <p>Rojo No.3 (eritrosina)</p> <p>Rojo No.40</p> <p>Verde No.3</p>

1.6. Normas de los colorantes.

La secretaria de Salud en el artículo núm. 664, establece que se prohíbe la adición de aditivos para las siguientes finalidades [31]:

- Encubrir alteraciones y adulteraciones en la materia prima o en el producto terminado.
- Disimular materias primas no aptas para el consumo humano.
- Ocultar técnicas y procesos defectuosos de elaboración, manipulación, almacenamiento y transporte.

- Reemplazar ingredientes en los productos que induzcan a error o engaño sobre la verdadera composición de los mismos.
- Alterar los resultados analíticos de los productos en que se agregan.

Considerando a los colorantes como aditivos coloridos estos se sujetan a dicho artículo, lo que implica que actualmente los colorantes no deben utilizarse como materiales para adulteración sino para restablecer el color original del producto, que por el proceso de elaboración y almacenamiento factores químicos y físicos le afectaron y por lo tanto su coloración natural disminuyó.

1.7. Tendencias del mercado.

No hay estadísticas fiables publicadas en el tamaño del mercado de color, sin embargo a escala mundial una estimación razonable sería de \$940 millones de dólares que puede ser segmentada como en la Figura 1.2. [10].

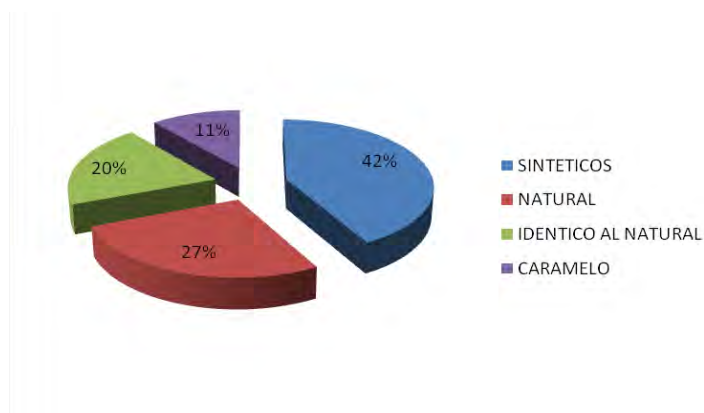


Fig.1.2. Porcentaje de mercado de los colorantes alimentarios

En términos de tamaño de los distintos sectores, se estima que la división es la siguiente:

- Colores sintéticos – 400 millones de dólares;
- Colores naturales - 250 millones de dólares
- Colores de la naturaleza idéntica – 190 millones de dólares;
- Colores de caramelo – 100 millones de dólares.

La presión de los consumidores, los cambios sociológicos, y los avances tecnológicos que conducen a más avances en la industria de procesamiento de alimentos han aumentado el mercado de color en forma general. El crecimiento más significativo ha sido en los colores naturalmente derivados debido a las mejoras en estabilidad, las industrias alimentarias tienen como objetivo satisfacer la creciente percepción de los consumidores que “natural llega a ser mejor que lo sintético” [10, 33].

1.8. Disponibilidad y Demanda de los colorantes.

La proporción de pigmentos naturales usados en alimentos es creciente, esto es debido a la toxicidad de algunos de los compuestos sintéticos; sin embargo, cerca del 80% de las ventas totales de los colorantes para esta área en Estados Unidos (uno de los principales mercados) es cubierto por tres químicos monoazoicos, como la tartrazina (amarillo), dos azonaftoles y el rojo 40 [1]. En México, el mercado estimado para los colorantes (excluyendo el color caramelo) es cubierto en su mayor parte por los amarillo-naranja (55%) y los rojos (25%) Fig.1.3.

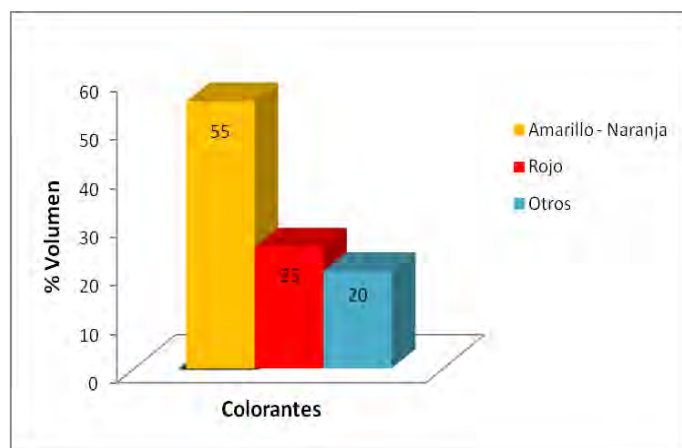


Fig.1.3. Mercado estimado para los colorantes en México [31].

Nuestro país es un productor-exportador de colorantes. Comparando las exportaciones con las importaciones de colorantes naturales, estas últimas son muy pequeñas. Por lo anterior, se puede inferir que la producción de colorantes naturales tiene en nuestro país un mercado en crecimiento con perspectivas de

exportación, dada la necesidad creciente de estos compuestos, la cual está probablemente relacionada con el aumento en alimentos procesados, el cambio preferencial al uso de colorantes naturales y los ajustes de la reglamentación en colorantes sintéticos que se dan a nivel mundial [34,35]. La demanda de colorantes naturales se espera que continúen siendo los productores más importantes de colorantes naturales los de artículos de confitería, refrescos, bebidas alcohólicas, aderezos para ensaladas y productos lácteos [36].

1.9. Problemática en la utilización de los colorantes sintéticos.

La FDA en la cláusula Delaney (bautizada en honor a su promotor, James Delaney (D-NY)) originalmente adicionada en 1958 [37], se basa en la determinación de cierto riesgo de cáncer por algunos aditivos coloridos, establece la prohibición de que ningún aditivo puede ser utilizado si se encuentra que induce cáncer cuando es ingerido por el hombre o por algún animal. Así, por medio de esta cláusula se prohibieron los siguientes colorantes: azul núm.6, rojo núm. 10, 11, 12, 13; amarillo núm. 1 (aplicación externa), amarillo núm.3 y 4 para medicamentos y cosméticos. Por otro lado, se prohibió para alimentos, medicamentos y cosméticos: el rojo num.2, violeta num.1, grafito y anaranjado B [37]. El rojo num.2 ha sido reemplazado por el rojo num.40 en algunos países y los colorantes azo han sido prohibidos en ciertos países y la lista continua. Muchos otros colorantes causan al parecer ciertos daños menores a la salud como el amarillo Sunset, el amarillo tartrazina, a los que se asocian problemas como alergias, por ejemplo urticaria. En particular, la tartrazina causa reacciones adversas como el asma o rinitis, además también parece inducir o agravar síntomas de hiperactividad, especialmente en niños [32]. La situación actual que presentan los colorantes sintéticos puede ser ejemplificada por el comportamiento del uso de los colorantes en las bebidas carbonatadas, considerada hasta hace poco como una de las áreas de mayor uso para los colorantes artificiales [31]. Todo tipo de colorante sintético ha perdido popularidad porque se requiere de productos con mejor calidad nutricional, ya que la mayoría de los consumidores buscan bebidas saludables (nutraceuticos).

CAPÍTULO 2

2. Marco teórico

2.1. Colorantes naturales.

Hacer una distinción real entre los colorantes naturales y artificiales es difícil, porque al final lo natural debe ser tratado químicamente para que sea estable, identificable, uniforme en el tono. La idea de natural se aplica a la consideración general de ser inocuo para la salud, GRAS (generally regarded as safe), permitido su uso sin restricciones y por ser obtenido de fuentes naturales y no por síntesis química [29].

Por extensión, se consideran también naturales los colorantes obtenidos de materiales biológicos como algunos insectos o incluso los que se forman espontáneamente al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo [38]. En este sentido y aunque pudieran tener composición y potencial de tinción idénticos, se contraponen a los artificiales que son, en esencia, los obtenidos por síntesis química [29].

Los colorantes naturales son exentos de certificación para pureza química por parte de la FDA. Aunque estos compuestos están exentos de los requerimientos de certificación formal de la FDA para asegurarse que su pureza está de acuerdo con las especificaciones y que se usan en consonancia con la legislación; requieren permiso de la FDA para ser incluidos en la lista de colorantes no certificados.

2.2. Fuentes de colorantes naturales y aplicaciones.

Como fuente de colorantes naturales podemos tener a las plantas (hojas, flores y frutos), insectos (grana de cochinilla) y algunas algas marinas. Se han investigado más plantas, como los residuos o cáscaras de bananas (*Musa X paradisiaca*), frutos como el del pigmento de rojo de jiotilla (*Escontria chiotilla*), garambullo y el betabel como fuente potencial de colorantes [39, 40].

Además de impartir color, los colorantes naturales han demostrado tener beneficios a la salud, como por ejemplo el licopeno, un caroteno que se usa como colorante y que es un factor en la reducción de la morbilidad de ciertos cánceres, lo que alienta aún más la producción de colorantes naturales [41]. Otras investigaciones han descubierto que las antocianinas y betalaínas poseen una actividad antioxidante elevada (reducción de la oxidación), por lo que se busca incluirlos en alimentos [42, 43]. Las betalaínas obtenidas del betabel ayudan a mantener sanas las células por su buena fuente de folato, así como también se les podría considerar como un potencial anticancerígeno [44].

2.3. Principales pigmentos de origen vegetal

2.3.1. Carotenoides.

Los carotenoides son los responsables de la gran mayoría de los colores amarillos, anaranjados o rojos. Los carotenoides [15] representan el más extenso grupo de colorantes naturales encontrados en los reinos vegetal y animal. Son los responsables de la coloración de tomates, jugo de naranja, zanahoria, langostas de mar, por mencionar algunos.

Los carotenoides presentan un problema al igual que las betalaínas desde el punto de vista de su aplicación debido a su falta de estabilidad pero a diferencia de las betalaínas estos no son solubles en agua [45]. Algunos ejemplos son los pigmentos rojos del tomate (*Lycopersicon esculentum*) y los del chile (*Capsicum spp.*), los pigmentos naranjas de las zanahorias (*Daucus carota*), la flor de cempasúchil (*Togetes erecta*) y los pigmentos amarillos de la calabaza (*Cucurbita pepo*) y de las bananas (*Musa spp.*). La estructura química básica de la mayoría de los compuestos es poliénica de 40 átomos formadas por ocho unidades de isopreno. Su nombre genérico deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue de ésta donde se aislaron por primera vez [45].

Se dividen de acuerdo a su estructura química en carotenos y xantofilas, en términos generales. De los primeros destacan los α , β (Fig.2.1), y γ -carotenos. En xantofilas algunos ejemplos son: la fucoxantina, la luteína (Fig. 2.2) y la criptoxantina. En la naturaleza la cantidad de xantofilas sobrepasa la de carotenos, pero el β -caroteno es el carotenoide de mayor importancia en tecnología de alimentos. Sirven como precursores de vitamina A y protectores contra la formación y acción de radicales libres [19], esta última también ejercida por las betalainas.

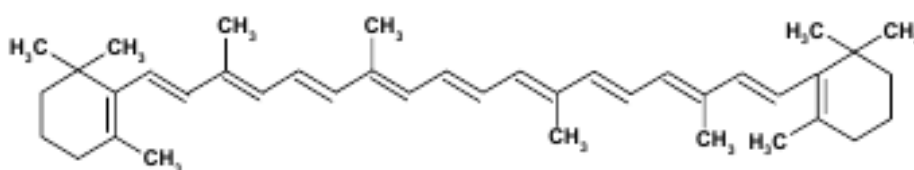


Fig. 2.1. Estructura química del β -Caroteno [19].

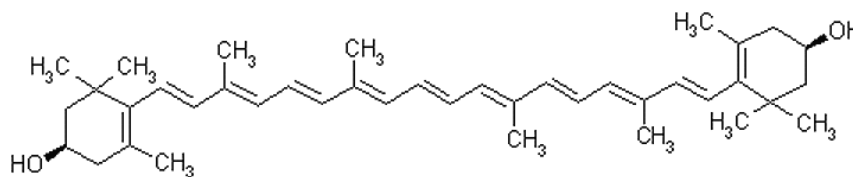


Fig. 2.2. Estructura química de la luteína [23].

2.3.2. Clorofilas.

Este es tal vez el pigmento vegetal más abundante en la naturaleza, se encuentra en la mayoría de las plantas siendo responsable de la fotosíntesis. Los tipos más importantes son la a y la b (Fig. 2.3), la "a" se encuentra en mayor proporción (3:1). De menor importancia son las clorofilas c, d y algunas de origen microbiano. Las hojas de la mayoría de las plantas deben su color verde a ésta, que va desapareciendo al acercarse la senectud (para dejar paso a otros pigmentos como carotenoides) y en frutos inmaduros. Se encuentran en los

cloroplastos. Las clorofilas son insolubles en agua; sólo es soluble en diversos disolventes orgánicos, tales como benceno, éter y acetona. Su estructura química compleja, al igual que los carotenos y betalainas, es fácilmente alterable por oxidantes (oxígeno, peróxidos), altas temperaturas, pH, luz y algunas enzimas [19].

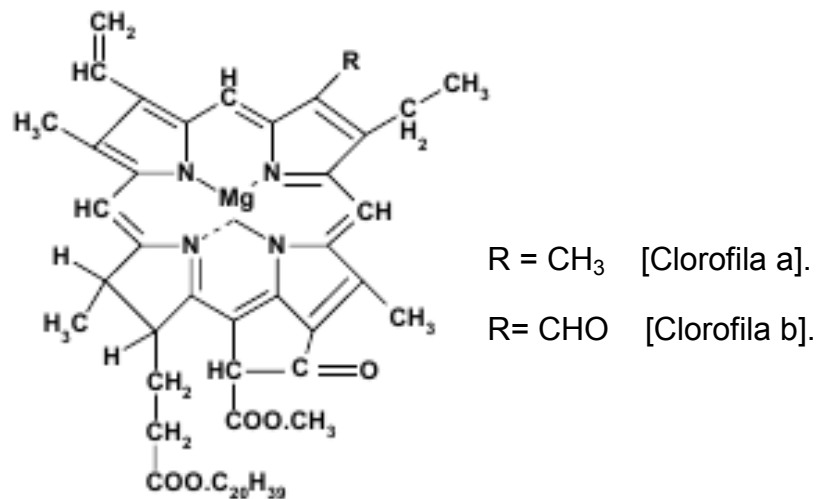


Fig. 2.3. Estructura química de la clorofila a y b [19].

2.3.3. Flavonoides.

Son compuestos fenólicos abundantes en la naturaleza, de estructura química parecida a las antocianinas, normalmente se encuentran en frutos junto a ellas, ya que ambos grupos de pigmentos siguen un proceso biosintético común. Son glucósidos formados por una aglicona, como flavonol (Fig. 2.4) y flavona (Fig. 2.5). Son solubles en agua (como las betalaínas) y etanol, presentan intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados [12]. Generalmente son amarillos, aunque existen flavonoides que proporcionan coloración rojiza, no contribuyen de manera importante al color del alimento, se encuentran en frutas como peras, cerezas, fresas, manzanas, duraznos, naranjas y limones. Su actividad antioxidante es muy alta. Inhiben la oxidación de la vitamina C en algunos alimentos. Normalmente

más estables al calor y reacciones de oxidación que las antocianinas y betalainas. Resisten la mayoría de los tratamientos térmicos en la manufactura de alimentos enlatados [19].

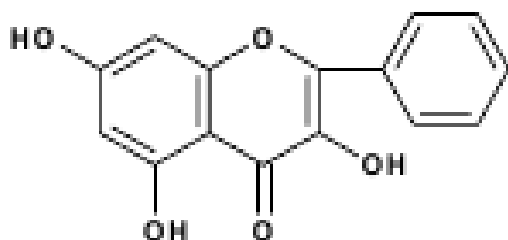


Fig. 2.4.

Estructura química del Flavonol

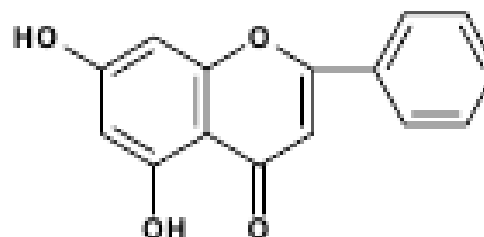


Fig. 2.5.

Estructura química de Flavona

2.3.4. Antocianinas.

El término antocianina fue utilizado por Marquat en 1835 para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no solo el color azul, sino que también el púrpura, violeta, magenta, y que todos los tonos del rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos y algunas hojas y raíces de plantas, se deben a pigmentos químicamente similares a las antocianinas de Marquat [12].

Las Antocianinas son compuestos hidrosolubles con características de glucósidos constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar. La estructura química básica de la aglicona es el ión flavilio. Ejemplo de antocianinas son la pelargonidina (Fig. 2.6) y la cianidina (Fig. 2.7); la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera alrededor de 150 antocianinas que abundan en la naturaleza. Son responsables del color rojo-naranja, azul y púrpura de uvas, manzanas, rosas, fresas, etc. Su estabilidad se ve afectada por los mismos factores que degradan la mayoría de los pigmentos vegetales, como a las betalainas [19].

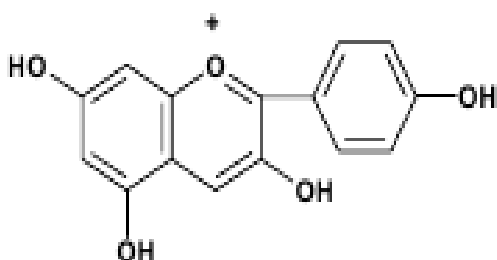


Fig. 2.6.

Estructura química de la Pelargonidina.

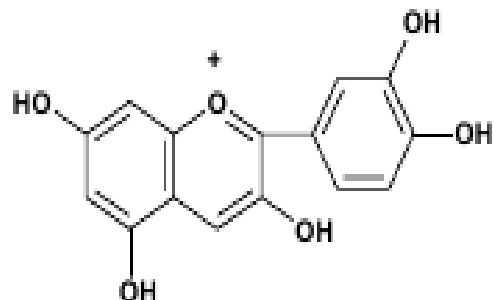


Fig. 2.7.

Estructura química de la Cianidina.

[19]

Las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, lo que se manifiestan en pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos [46, 47]. Lo que hace a estas diferentes de las betalaínas, es que en soluciones neutras las betalaínas se mantienen estables, pero al igual que las antocianinas cuando son manejadas en condiciones alcalinas suelen perder su coloración.

2.3.5. Ácido carmínico.

El ácido carmínico es un pigmento rojo-púrpura de origen animal, obtenido del insecto *Dactilopius coccus* que habita en el cactus *Nopalea cochinillifera* en México, América Central y en el Oeste de la India. El colorante solo puede extraerse de las hembras (con larvas o huevos) y aproximadamente se requiere de 700 mil insectos para producir una libra de colorante [31].

Insectos de muchas especies se han utilizado durante miles de años como una fuente de color rojo. Cada insecto se asocia con una planta huésped específica y cada uno es la fuente de un determinado color rojo como un armenio, kernes, esmalte de tinte de cochinilla, laca y la cochinilla de América [48]. El ácido

carminico es una antraquinona cuya estructura química es la que se muestra en la Fig. 2.8. [31].

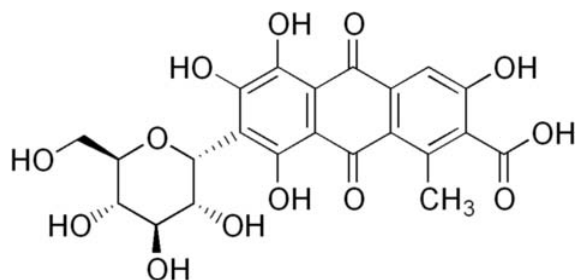


Fig. 2.8. Estructura del ácido carmínico.

El ácido carmínico es muy soluble en agua y el tono de color es dependiente del pH de la solución al igual que las betalainas. Es naranja en soluciones ácidas y violeta cuando es alcalina [48]. El número de sus aplicaciones es muy limitada debida al alto costos de producción.

2.3.6. Betalaínas.

El término “betalaínas” fue establecido por Mabry y Dreiding en 1968 basado en consideraciones estructurales y biogenéticas. En un sentido estricto, las betalaínas no pertenecen a los alcaloides porque son de naturaleza ácida debido a la presencia de varios grupos carboxilo. Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles y existen dentro de las células en las vacuolas con estructura de glucosidos [3]. Las plantas que contienen estos pigmentos se limitan a 10 familias del orden *Cariophyllales* o *Centrosperma* [45, 31, 9]: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didieraceae*, *Holophytaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolacaceae* y *Portulacaceae* [12].

Una observación muy importante en estas plantas es la presencia de betacianinas y la ausencia de antocianinas. Al parecer, las betacianinas y antocianinas no coexisten en la misma planta, ni aún dentro de la misma familia [31]. En procesamiento de alimentos, las betalaínas son comúnmente menos usadas que

las antocianinas y carotenoides. A diferencia de otros pigmentos como los mencionados anteriormente incluyendo las clorofilas, las betalaínas tienden a ser estudiadas con mucha menor intensidad [11]. Son solubles en agua, estables entre pH 3 y 7, usados para colorear alimentos de bajo pH [9]. Al igual que en la mayoría de los pigmentos naturales se ve afectado por la temperatura, la presencia de aire, metales y por las radiaciones ultravioletas [49]. Las betalaínas son pigmentos nitrogenados que reemplazan a las antocianinas en un pequeño número de plantas [6, 7].

El término Betalaína describe a dos grupos de pigmentos muy solubles en agua relacionados química y biogénicamente, las betacianinas de color rojo y las betaxantinas de color amarillo [12]. Químicamente su definición abarca todos los compuestos con estructuras basadas en la fórmula general mostrada en la Fig. 2.9, por lo tanto, son derivados de la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico (Fig. 2.10) [50, 6].

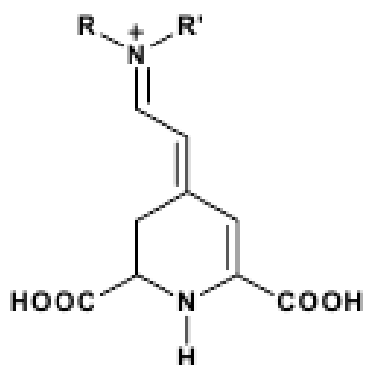


Fig. 2.9.

Estructura general de las betalaínas

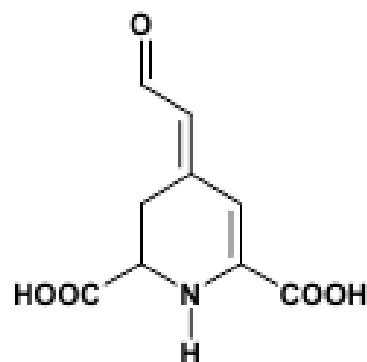


Fig. 2.10.

Estructura del ácido Betalámico

La estructura mostrada en la Fig. 2.9 representa una betacianina o una betaxantina dependiendo de los sustituyentes R y R' [51].

2.3.6.1. Estructura.

La estructura del cromóforo de la betalaína puede ser descrita como un sistema protonado 1,7-diazaheptametinamino, sistema en resonancia que exhibe 3 dobles enlaces conjugados (Fig. 2.11) [48, 52]; las *betaxantinas*, de color amarillo, se caracterizan por tener grupos R y R' que no extienden la conjugación del cromóforo 1,7-diazaheptametinamino, mientras que en las *betacianinas*, de color rojo, la conjugación está extendida con un anillo aromático sustituido (ejemplo ciclodopa) [12]. Las betacianinas son divididas en cuatro sub-grupos; y las betaxantinas, en tres grupos [53].

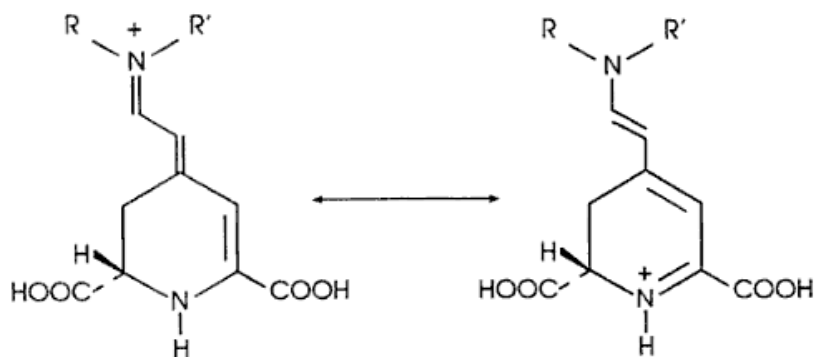


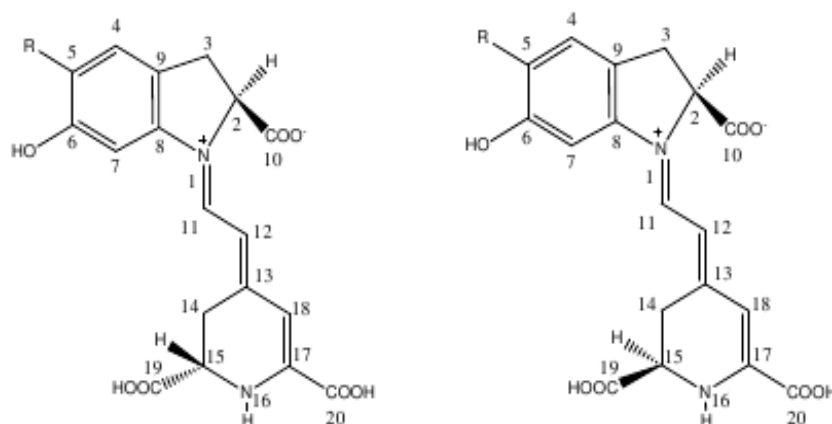
Fig. 2.11. Transformación estructural del cromóforo de betalaína.

Se conocen más de 50 betalaínas, y todas tienen la misma estructura básica, en la cual R_1 y R_2 puede ser un hidrogeno o un sustituyente aromático. Su color se le atribuye a los dobles enlaces conjugados en resonancia [51] del núcleo aromático-R sustituido con el cromóforo. La unidad de azúcar más común es la glucosa, y menos frecuente la soforosa y la ramnosa [12].

2.3.6.2. Betacianinas.

Son pigmentos de color rojo-púrpura, se consideran glucósidos, su principal componente es la Betanina (hasta un 95% del total de las betacianinas del betabel). Todas las betacianinas pueden ser derivadas de dos núcleos básicos (Fig. 2.12), la betanidina y la isobetandina, por glicosidación de uno de los grupos hidroxilos localizados en la posición cinco o seis [51, 52]. Las betacianinas son

ópticamente activas por los dos carbonos quirales C-2 y C-15. Su naturaleza es altamente iónica por contener tres grupos carboxilos (dos con un pKa de 3.4 y el otro con un pKa de 2), además de un grupo fenólico (pKa de 8.5), características que hacen a las betacianinas difícilmente separables de las betaxantinas. Absorben a una longitud de onda máxima de entre los 534 y 555 nm. Son más estables que las betaxantinas. Generalmente representan del 75 al 95% de las betalainas [3].



(a) Betanidina, R= -OH

(c) Isobetamidina, R=-OH

(b) Betanina, R= -glucosa

(d) Isobetanina, R= -glucosa

Fig. 2.12. Estructura de las Betacianinas [55, 23].

Los productos de condensación de ácido betalámico y ciclo DOPA [ciclo-3-(3,4-dihidrofénilalanina)] son comúnmente referidos como betacianinas. Su fuerte barrido batocrómico de 50 a 70 nm en comparación con betaxantinas se atribuye a la estructura del aromático del ciclo-DOPA [52].

La betacianina más abundante en el betabel es la betanina [56, 11]. La Betanina (Fig. 2.13) es un pigmento que de acuerdo a Nilsson (1970) y Piattelli (1976) es el mayor pigmento rojo en el grupo de betacianinas, betanina, fue descrita primero como "Betaciana" fue aislada del betabel en 1918 y el pigmento amarillo, betaxantinas, en 1964 del fruto nopal (*Opuntia ficusindica*) [53].

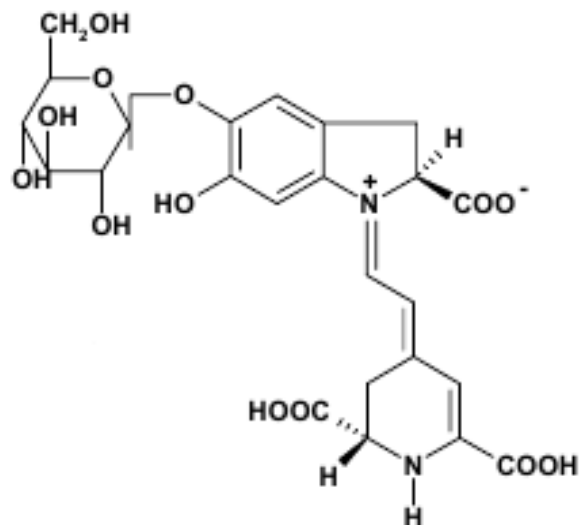


Fig. 2.13. Betanina

2.3.6.3. Betaxantinas.

Son pigmentos amarillos relacionados estructuralmente con las betacianinas, dependiendo de la estructura particular del componente amino, la absorción máxima de las betaxantinas varía entre 460 y 480 nm [54]. Son mucho más lábiles que las betacianinas en relación 1:10 [18, 24, 19, 69, 57]. Algunas betaxantinas identificadas son la Indicaxantina (Fig. 2.14), Miraxantina III y IV (Fig. 2.15) entre otras [23]:

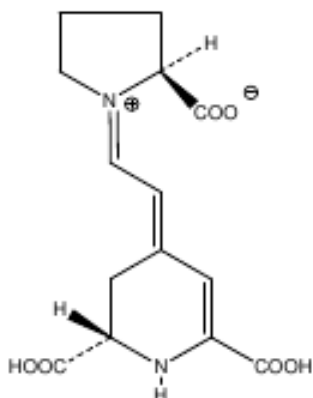


Fig. 2.14. Indicaxantina

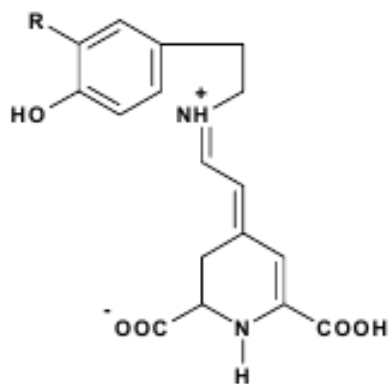


Fig. 2.15. Miraxantina III R = H

Miraxantina IV R = OH

Las betaxantinas (latin: beta = beet; Griego: xantos = amarillo) son productos de la condensación de ácido betalámico y ácidos amino o aminas, respectivamente. Las betaxantinas más comunes y frecuentemente planteadas son la glutamina-betaxantina (vulgaxantina I) Fig. 2.16, la principal betaxantina en el betabel (*Beta vulgaris L.*) [11].

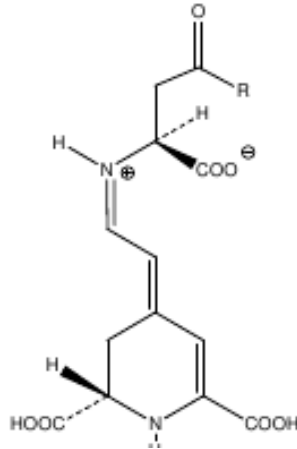


Fig. 2.16. Vulgaxantina I, R = -NH₂
 Vulgaxantina II, R = -OH [55]

2.3.6.4. Clasificación de betacianinas y betaxantinas.

Las betacianinas y las betaxantinas pueden ser clasificadas con base a sus estructuras químicas. Las estructuras de las betacianinas muestran variaciones en su azúcar (5-O-D-Glucosa) y los grupos acilo, mientras que las betaxantinas muestran la conjugación con una amplia gama de aminas (glutamina) y aminoácidos (tirosina) en sus estructuras. En la Tabla 2.1, se presentan algunas betalaínas identificadas [45].

Tabla 2.1. Principales sustituyentes identificados en betalaínas naturales [58].

Betalaína ^a	Residuo ^b	Bibliografía
Aglicona		
Betanidina	-	Piatelli, 1981.
Grupo de la Betanina		
Betanina	5-O-Glc	Böhm y Rink, 1988.
Filocactina	5-O-Glc	Piatelli y Minale, 1964.
Lamprantina-I	5-O-Glc	Bokern y Strack, 1988.
Grupo de la Amarantina		
Amarantina	5-O-Glc-2-O-GlcU	Strack et al., 1993.
Celosianina II	5-O-Glc-2-O-GlcU	Steglich y Strack, 1990.
Bugambilia		
Bugambilia	5-O-Glc-2-O-GlcU	Piatelli e Impellizzeri, 1970.
Grupo de la Gomprenina		
Gomprenina-I	6-O-Glc	Minale et al., 1966.
Betaxantinas		
DOPAxantina	DOPA	Piatelli, 1976b.
Indicaxantina	Prolina	Piatelli, 1976b.
Portulaxantina-II	Glicina	Trezzini y Zrýd, 1991.
Vulgaxantina	Ácido glutámico	Piatelli, 1981.

^a El nombre fue estandarizado por Strack et al., (1993).

^b Abreviaciones: Glc β-D-Glucosa; GlcU β-D-ácido glucorónico; DOPA 3,4, dihidrofenilalanina.

2.4. Betalaínas como aditivo alimentario.

Dado que existen restricciones de tipo ilegal en el uso de colorantes rojos sintéticos, se ha sugerido emplear las betalaínas en diversos alimentos. Estudios de toxicidad y seguridad [65] indican que las betalaínas pueden ser alternativas viables para colorantes sintéticos. Sin embargo, por las limitaciones de su estabilidad, su uso se restringe a ciertos productos en los que el pigmento se conserva más fácilmente. Se ha sugerido aplicar las betalaínas en la elaboración de productos cárnicos embutidos, debido a que los nitritos causan controversia por su implicación en la síntesis de nitrosaminas, se considera que la mezcla de betalaínas y sorbato de potasio puede sustituirlos. En embutidos con carne de pollo, el color producido por las betalaínas es más estable que el que producen los nitritos, y el sabor y la textura no se alteran [66, 19].

Las betalaínas son más solubles en agua que las antocianinas y exhiben una fuerza tintorial tres veces mayor que las antocianinas [67]. Así, las betalaínas pueden ser consideradas sustitutas para las antocianinas menos hidrofílicas en la cual bajo las mismas condiciones pierden su rendimiento a través de la decoloración y cambio de tono [68].

La concentración del pigmento en el betabel es aproximadamente del 1% [69]. Los sólidos de betabel o betanina en forma aislada que se usan como colorantes se conservan añadiendo antioxidantes y agentes secuestradores. Sin embargo, es degradado fácilmente a temperaturas superiores a 50°C, particularmente cuando es expuesto a aire o luz; es más estable al calor a pH entre 4 y 5. Por estas propiedades, las betalaínas son usadas en alimentos que reciban mínimo tratamiento térmico durante el procesado, tengan baja actividad de agua y sean empacados minimizando la exposición a luz y oxígeno. Por todo lo anterior las betalaínas tienen aplicación en productos [25, 70.]:

Alimentos secos.-	Sopas secas (especialmente sopa de tomate), mezclas de especies, aderezos para ensaladas.
Alimentos enlatados.-	Productos de tomate enlatados como salsa cátsup de tomate, salsa para pizzas, frutas enlatadas (como cerezas y fresas).
Productos cárnicos.-	Salchichas, hamburguesas, Substitutos de carne, jugos de carne.
Productos lácteos.-	Helados, yogurt, crema para sándwich, chocolates con crema, y rellenos de frutas (como cerezas).
Postres y dulces.-	Jaleas, mermeladas de frutas, pasteles, etc.
Gelatinas y polvos.-	Para hacer refrescos instantáneos.

2.5. Estabilidad de las betalaínas.

La estabilidad de las betalaínas es influenciada fuertemente por el pH, la temperatura, la luz, la actividad de agua y la presencia de oxígeno [71, 72, 73, 74, 75]. La estabilidad de las betalaínas es un factor que restringe su uso como colorante en alimentos [76, 77]. De acuerdo con estas características, las betalaínas se pueden utilizar en alimentos con una corta vida de anaquel, procesados por un tratamiento térmico de calor mínimo, envasándolos y colocándolos en un lugar seco, bajo niveles reducidos de luz, oxígeno, y humedad [78, 79].

Estudios recientes sobre el betabel demostraron que la betanina puede degradarse por rompimiento hidrolítico para producir los precursores biogénicos, ácido betalámico y Ciclo DOPA 5-O-glucosido de betanina. Además, la betanina se encontró a regenerarse hasta cierto punto por recondensación de los productos de hidrólisis asociados con una ganancia de color después del almacén en frío de los extractos calentados. Con la exposición térmica, isomerización y

descarboxilación de betanina, produce sus esteroisómeros C₁₅, isobetanina y 15-descarboxibetanina, respectivamente, sin que ello afecte la apariencia global de la betanina (Fig. 2.17) [80].

La deshidrogenación de betacianinas en C-14/C-15 produce el correspondiente neo-componente que implica un barrimiento de color amarillo, esto demostrado por betacianinas del betabel y también por pitaya morada. Aún más importante la descarboxilación en C-17 y/o C-2 y deshidrogenación en C-14/C-15 se encontraron a modificar la apariencia y estabilidad del pigmento genuino [81].

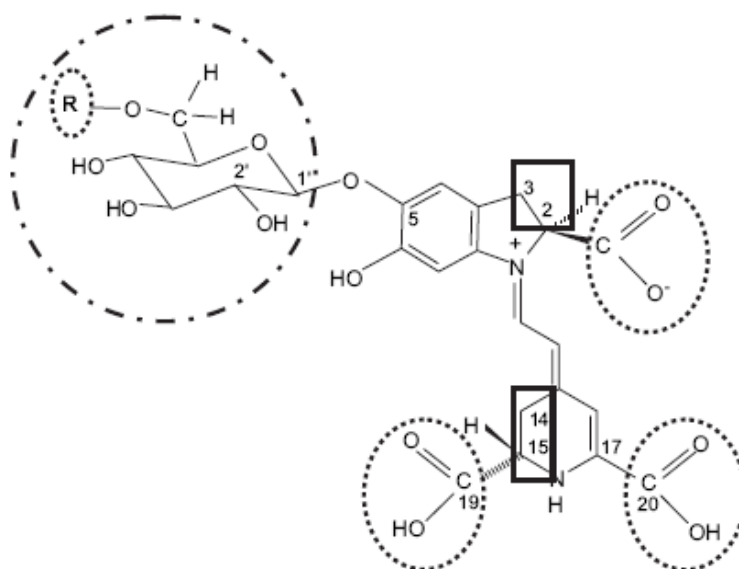


Fig. 2.17. Lugares posibles de descarboxilación (línea de puntos, ovalada), deshidrogenación (línea continua, cuadrado) y desglucosilación (línea de puntos en trazos, círculo) en betacianinas [82].

Cuando las betalainas se utilizan como colorantes en alimentos, el color es una preocupación importante. Los principales factores que afectan la estabilidad del pigmento se describen a continuación.

2.5.1. pH

A pH ácido (3.5), la longitud de onda se desplaza a un valor más bajo del intervalo dado para las betacianinas (534 y 555 nm) y betaxantinas (480 nm), por arriba de

pH 7 la longitud de onda cambia a un valor más elevado para ambas; fuera de este intervalo, la intensidad del espectro visible decrece. Huang y Von Elbe (1987) [83], mostraron que el pH óptimo para la estabilidad máxima de la betanina en presencia de oxígeno está entre 5.5 y 5.8, mientras bajo condiciones anaeróbicas los valores de pH favorables bajaron de 4 a 5. Las soluciones de betabel muestran la máxima estabilidad a pH 5.5, correspondiente al pH normal del betabel fresco [45].

En condiciones de temperatura elevada el pH óptimo se barre hacia 6 [84]. Condiciones alcalinas provocan la hidrólisis de enlace aldimina, mientras que la acidificación se encontró que inducen recondensación de ácido betalámico y componentes amino (betaxantinas) o Ciclo DOPA 5-O-β-glucósido (CDG) [80].

2.5.2. Temperatura

La temperatura puede ser considerada como el factor más crucial que influye sobre la estabilidad de la betalaína durante el procesamiento y almacén de alimentos [11, 85] dado que la conservación de alimentos usualmente incluye tratamientos térmicos de materias primas para la seguridad de estos. Las betalaínas son comúnmente conocidas por ser lábiles al calentamiento que pierden estabilidad a elevadas temperaturas [86], mientras que su velocidad de degradación se acelera con incremento de temperatura y el periodo de calentamiento [87]. Además, la estabilidad de la betalaína es considerablemente declinable entre 50°C y 80°C [84, 87].

Al calentar soluciones de betanina se produce una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento y surge la aparición de un color ligeramente marrón. Si se calienta la betanina a altas temperaturas (mayores de 60°C) y por tiempos prolongados (mayores a una hora), se acelera la hidrólisis de este compuesto en solución, produciendo ácido betalámico (BA) y ciclodopa-5-O-glucósido (CDG) como productos intermediarios, sin embargo, esta reacción es parcialmente reversible de acuerdo con el pH [45]. El mecanismo propuesto para la regeneración de betanina requiere una condensación de la base schiff (reacción

entre amina y alehdos o cetonas dando como subproducto agua) del grupo aldehído del BA y del amino nucleofílico (N=CH) de CDG. El BA muestra se más estable a pH neutro y el CDG muestra serlo en condiciones ácidas; por lo tanto la regeneración de betanina es maximizada en un rango de pH entre 4 y 5 [4].

Un estudio realizado por Von Elbe y colaboradores reporto que la proporción de isobetanina y betanina para betabeles frescos, escaldados y esterilizados difiere con el aumento de la severidad del tratamiento calórico. Esto es que cuando la betanina en solución es calentada, puede ocurrir descarboxilación. Esto puede ser determinado por presencia de dióxido de carbono y pérdida del centro quiral C-15.

La degradación de betanina puede ser resumida en la Fig. 2.18. y Fig. 2.19.

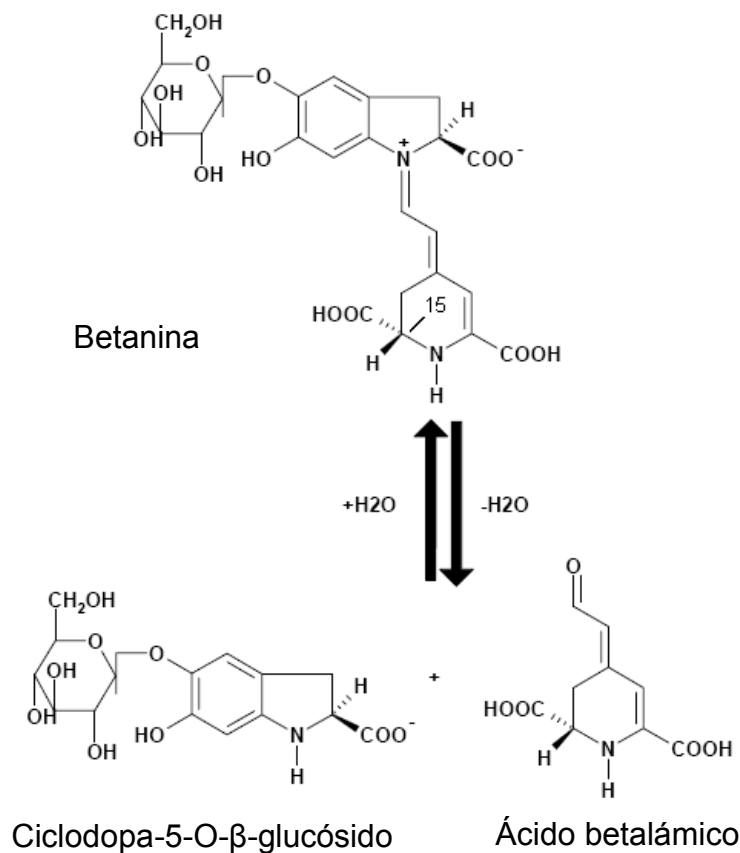


Fig. 2.18. Degradación reversible de la betanina [4, 23].

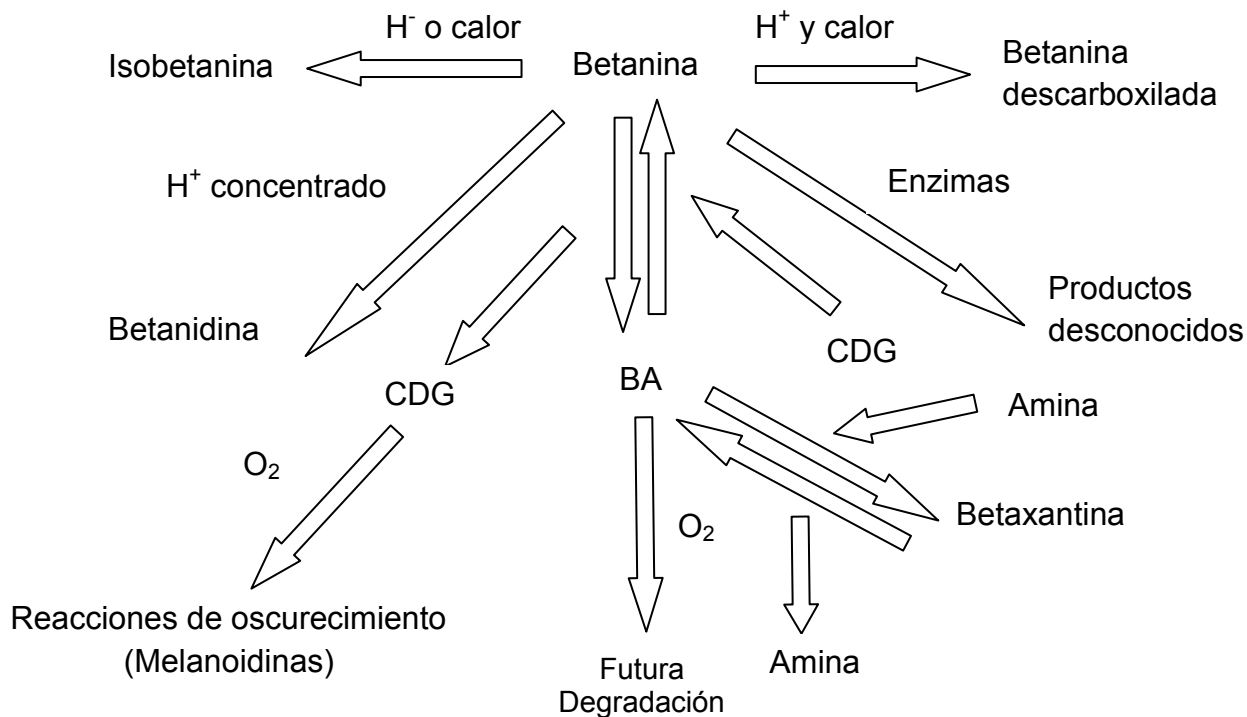


Fig. 2.19. Diagrama de degradación de la Betanina [3].

2.5.3. Luz.

La exposición a la luz visible reduce la estabilidad de betalaínas [86, 88, 89, 81]. Generalmente es reconocido que bajo la luz fluorescente, y en presencia de oxígeno, las betaxantinas son más lábiles que las betacianinas [19]. La susceptibilidad de las betalaínas a la degradación inducida por la luz es explicada por la absorción de luz en el UV y el intervalo visible llevando a la excitación de electrones del cromóforo de betalaína a estados más energéticos, causando alta reactividad o energía de activación baja de la molécula [77].

La degradación por luz es reportada a ser dependiente del oxígeno [90], ya que efectos perjudiciales de luz se encontraron a ser despreciables bajo condiciones anaeróbicas [91], produciendo retención idéntica de betanina al almacenamiento en luz y oscuridad, respectivamente. La adición de ácido isoascórbico y ácido ascórbico (0.1%) a los jugos de betabel y pitaya purpura, mostraron inhibir la degradación de betanina inducida por luz durante su almacenamiento [88, 81].

2.5.4. Oxígeno.

La presencia de oxígeno causa el oscurecimiento del producto y la pérdida del pigmento. El oxígeno atmosférico en productos de betabel enlatados es conocido por acelerar la pérdida de color del pigmento de betabel.

La betanina reacciona con el oxígeno molecular, produciendo la degradación del pigmento en soluciones saturadas con oxígeno [92]. De acuerdo a lo reportado por Attoe y Von Elbe, (1985), la degradación de la betanina es una reacción parcialmente reversible y se ha recomendado que para aumentar la estabilidad del pigmento es necesario colocar las muestras en atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno [45]. Las soluciones calentadas de betanina con bajos niveles de oxígeno muestran un incremento (de 54 a 92%) en la retención de betanina [83] ya que el oxígeno molecular está implicado como el agente activo en la degradación oxidativa de betanina.

2.5.5. Actividad de agua.

La betanina se vuelve más inestable a medida que aumenta la actividad de agua y contenido de humedad del alimento. La degradación de betanina requiere la hidrólisis de la molécula de betanina a CDG y BA. Esta reacción es altamente dependiente de la disponibilidad de agua, por consiguiente, un decremento en la actividad de agua corresponde a una menor degradación de betanina [3].

El jugo de betabel en polvo guardado en condiciones secas es muy estable aun en presencia de oxígeno [48].

2.5.6. Efecto de antioxidantes y secuestrantes.

La inestabilidad de betalaínas al oxígeno es una de las limitantes de su uso como colorante alimenticio. La adición de antioxidantes debe por lo tanto resultar en mejoramiento de la estabilidad. La adición de ácido ascórbico a jugo de betabel concentrado o polvo de extracto de betabel resulta en mejoramiento de la estabilidad del color, el ácido ascórbico protege el color rojo aun cuando es expuesto a tratamientos drásticos como esterilización [3, 93]. Sin embargo, los informes sobre la concentración óptima de ácido ascórbico para la estabilidad de

betalaínas han sido incompatibles, estos van desde 0.003% [94] a 2% [92] y 0.1% [81].

Para betacianinas del Amaranto se ha reportado un ligero efecto protector en su estabilidad en concentraciones de 0.1-0.5% [56] y para las del betabel se mostró un pequeño incremento en la estabilidad bajo condiciones de luz, en un 0.1% de ácido ascórbico [65]. Por lo que el intervalo para la estabilidad de las betalaínas se puede marcar en un intervalo de 0.1 – 1% de ácido ascórbico. Los antioxidantes no simplemente mejoran la regeneración de betalaína, si no también previenen la degradación del pigmento durante el tratamiento térmico [11].

Además de los esteroisómeros del ácido ascórbico, agentes quelantes también resultan ser adecuados para la estabilización de betalaínas, posiblemente por la parcial neutralización del centro electrofílico alrededor de la carga positiva del nitrógeno amino [95]. El ácido cítrico se encontró a mejorar la estabilidad de la betacianina [95], aunque siendo menos efectiva que el ácido ascórbico e isoascórbico [81].

Complejos de cationes metálicos catalizan la oxidación. Análogamente, el EDTA se comprobó a incrementar el tiempo de vida medio de la betanina en 1.5 veces [95], otros estudios reportaron efectos benéficos de EDTA exclusivamente bajo condiciones aeróbicas con soluciones purificadas de pigmento. La presencia de EDTA en niveles bajos (1ppm), en solución incrementa la estabilidad de betanina. El mecanismo por el cual el EDTA reduce la oxidación de betanina puede ser explicado en parte por su habilidad para quelar cationes metálicos polivalentes. También es propuesto que protege a la betanina por directa interacción con su centro electrofílico [4, 96].

2.5.7. Efecto de enzimas.

Los colorantes naturales pueden ser degradados por varias enzimas encontradas en los tejidos vegetales. Los pigmentos son fácilmente destruidos por enzimas durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Estas enzimas pueden ser

inactivadas mediante calor; la pérdida del pigmento puede ser minimizada mediante un escaldado antes de congelar o pasteurizar [3].

El escaldado se realiza con el objetivo de destruir enzimas, es un calentamiento de corta duración destinado a inactivar las enzimas propias de un alimento de forma que se detenga su actividad metabólica y cese la degradación del alimento. Comprende temperaturas que van de 95-100°C durante unos minutos con el fin de destruir las enzimas que puedan alterar sus propiedades organolépticas y nutritivas [95].

Las betalaínas se pueden decolorar por acción enzimática, el sistema enzimático betalainasa (en betabel y amaranto) tiene actividad óptima a 40°C y pH de 3.4, observándose efectos menos drásticos al aumentar el pH. Las condiciones de anaerobiosis reducen la actividad enzimática, lo cual hace pensar en una betalainasa oxidasa [19, 57]. Así mismo, la presencia de peroxidasas y polifenoloxidasas se identifican en el betabel [98]. Sin embargo, la peroxidasa del betabel puede ser inactivada a temperaturas superiores a 70°C, mientras que la polifenoloxidasa exhibe superior estabilidad térmica, perdiendo su actividad arriba de 80°C [99].

Con esto terminamos con algunos de los factores mas importantes que afectan a la estabilidad de las las betalaínas, asi como agentes que ayudan a mejorarlas.

2.6. Aspectos de la fuente natural utilizada “Betabel (*Beta vulgaris*)”.

Beta vulgaris, la remolacha, también conocida como acelga blanca, betarava, betarraga (chile), betarrada (Islas canarias) y betabel (México), es una planta de la familia Chenopodioideae de la cual las hojas y la raíz son comestibles [98]. El betabel es una planta de cultivo anual o bianual, sus raíces se dividen en cuatro clases; achatadas, ovaladas, semilargas y larga cónica, de acuerdo con su color las raíces se dividen en rojos y amarillos [15].

La mayoría de las variedades de betabel se desarrollan bien en los trópicos, aunque las altas temperaturas evitan el desarrollo de raíces de buena calidad, de

aquí que es esencial obtener cosecha en un lugar fresco. El clima más conveniente es el templado y húmedo, debiéndose evitar los extremos en humedad y temperatura [100]. La temperatura de germinación es de 10 a 30°C siendo la óptima entre los 20-25°C. La temperatura para el desarrollo es de 16 a 21°C. Esta hortaliza tolera bien las heladas; a temperaturas mayores de 25°C se forman anillos concéntricos de color blanco en el “tallo bulboso”, y baja el contenido de azúcares [101].

El betabel es muy sensible a la acidez del suelo, pero relativamente tolerante al salitre (mezcla de nitrato de sodio (NaNO_3) y nitrato de potasio (KNO_3)). Se desarrolla mejor en un suelo cuya acidez fluctúa entre pH 6 y 7. El betabel es altamente tolerante a la salinidad [101].

En México puede explotarse el betabel durante todo el año. Por lo regular las épocas de siembra varían de acuerdo a la zona. Hay existencia suficiente de esta especie, es muy popular, se cultiva en todo el mundo pues tiene muchas propiedades alimenticias [100].

El rojo betabel ha sido cultivado por muchos cientos de años en todos los climas templados. Los pigmentos presentes son conocidos como betalaínas y pueden ser divididas en dos clases, el rojo betacianinas y amarillo betaxantinas. Las betalaínas tienen una distribución limitada en el mundo de las plantas y puede aparecer que las betalaínas y antocianinas son mutuamente exclusivas. Gran variedad de betabel contienen betacianina roja, la Betanina es el componente colorante predominante y esta representa del 75 a 90% del color presente total. Vulgaxatina I y II son las principales betaxantinas amarillas [48].

Cantidades muy grandes, más de 200 000 toneladas de betabel crecen anualmente en el oeste de Europa, de la cual la mayoría es consumida como vegetal hervido o en conserva. De esta cantidad algunas 20 000 son convertidas en jugo y colorante (E-162, rojo remolacha). La cantidad de color de betabel consumida como aditivo para alimentos es pequeña comparada con lo que se consume como vegetal [48].

CAPÍTULO 3

3. Generalidades.

3.1. Intercambio iónico.

La adsorción y el intercambio iónico son operaciones unitarias de transferencia de materia en las que un soluto contenido en una fase fluida se transfiere hacia una fase sólida, bien por retención en su superficie o por reacción con el sólido [103].

El intercambio iónico consiste en la sustitución de iones de una disolución por otros contenidos en un sólido. El sólido constituye lo que se denominan *resinas de intercambio*. En realidad al intercambio iónico se le puede considerar como una adsorción química, en la que el intercambio de iones se realiza sobre puntos definidos de la resina. Dependiendo del tipo de iones que pueden intercambiar, las resinas pueden ser aniónicas o catiónicas. Unas de las aplicaciones más importantes del intercambio iónico son la desalinización y acondicionamiento de agua [103].

Una resina de intercambio iónico puede considerarse como una estructura de cadenas hidrocarbonadas a las que se encuentran unidos de forma rígida grupos iónicos libres. Estas cadenas se encuentran unidas transversalmente formando una matriz tridimensional que proporciona rigidez a la resina y donde el grado de reticulación o entrecruzamiento determina la estructura porosa interna de la misma [102].

Tipos de resinas de intercambio iónico [105]:

Resinas catiónicas o de ácido fuerte: Las resinas catiónicas fuertemente ácidas derivan su funcionalidad de los grupos ácidos sulfónicos. Estos intercambiadores funcionan a cualquier nivel de pH y dividen todas las sales.

Resinas catiónicas de ácido débil: Las resinas catiónicas débilmente ácidas contienen grupos carboxílicos como sitios de intercambio. La resina es altamente

eficiente, ya que es regenerada con casi 100% de la cantidad estequiométrica de ácido comparado con el 200% a 300% requerido para los cationes de ácido fuerte.

Resinas aniónicas de base fuerte: Las resinas aniónicas de basicidad fuerte derivan su funcionalidad de los sitios de intercambio de amonio cuaternario. Los dos grupos principales de resinas aniónicas de base fuerte son las de Tipo 1 y Tipo 2, dependiendo del tipo de amina que se utiliza durante el proceso de activación química. Químicamente, los dos tipos difieren en el tipo de especie de sitios de intercambio de amonio cuaternario que exhiben: los sitios de Tipo 1 tienen tres grupos de metilo; en los de Tipo 2, un grupo de etanol reemplaza a uno de los grupos de metilo.

Las resinas de Tipo 1 son adecuadas para la eliminación total de aniones en todas las aguas. Las resinas de Tipo 2 también presentan la eliminación de todos los aniones, pero pueden ser menos efectivas.

Resinas aniónicas de base débil: Las resinas aniónicas de basicidad débil contienen el grupo funcional de poliamina, que actúa como absorbedor de ácido, eliminando los ácidos fuertes – acidez de mineral libre – de la corriente del efluente de cationes. Esta resina débilmente ionizada es regenerada de manera eficiente por cantidades de base casi estequiométrica – tales como el hidróxido de sodio – que restauran los sitios de intercambio a la forma de base libre.

3.2. Extracción-Estabilización.

3.2.1. Métodos de extracción.

Para la extracción de este tipo de pigmentos, la fruta o planta cruda, generalmente, se macera o se muele en agua fría o temperatura ambiente. En la mayoría de los casos, es necesario el uso de soluciones acuometanólicas o acuoetanólicas (del 20 hasta el 50%, v/v) para alcanzar la extracción completa [50]. Algunas veces hay necesidad de realizar una fermentación aerobia del jugo para reducir los azúcares libres y aumentar el contenido de la betacianina [106]. En ambos procedimientos, la inactivación de las enzimas que degradan el

pigmento se realiza por un tratamiento térmico a 70°C durante 2 minutos. Las betacianinas se pueden precipitar por una ligera acidificación con ácido clorhídrico o con etanol acidificado (0.4 hasta el 1% HCl). La degradación de la betanina puede ocurrir rápidamente y su destrucción puede evitarse trabajando a bajas temperaturas y protegiéndola de la luz [6].

Es bien conocido que para extraer los colorantes, primero se recolectan betabeles, se lavan con agua, se parten y se exprimen o extraen para obtener el jugo correspondiente. El jugo así obtenido se trata con pectinasa para clarificarlo, se filtra y se concentra, este concentrado se puede almacenar así o si se desea se puede secar y obtener un polvo.

También se ha publicado [107] que los betabeles rebanados se someten a una extracción a contracorriente en forma continua, obteniéndose una solución de los colorantes. Esta solución se puede clarificar con pectinasa, luego filtrarla a través de una tierra de diatomáceas fina y evaporarla para obtener los colorantes como un polvo. Este polvo contiene los colorantes rojos, amarillos, azúcares y otros compuestos orgánicos.

En una patente U.S. [108] se describió un método en donde la fase soluble de los betabeles se somete a una fermentación, con levadura *Candida utilis* para convertir los carbohidratos solubles a una fase insoluble, dejando los colorantes en solución; al eliminar la fase insoluble y eliminar el agua se obtiene un concentrado parcialmente purificado de los colorantes del betabel, adecuadamente para usarlo en alimentos, medicamentos y productos similares.

En el presente trabajo se describe un método en donde se extrae el jugo de betabel mediante una extracción común, recolección, lavado, cortado, extracción, y filtrado. Este método tiene en particular, la obtención de color al poner en contacto el jugo de betabel con una resina intercambiadora de iones en donde el color se une con la resina intercambiadora a diferencia de los azúcares, proteínas y materiales aromáticos, los cuales son separados con facilidad del colorante mediante este intercambiador iónico. Con la ayuda de sales en una solución

amortiguadora de pH controlado el color es selectivamente eluido del intercambiador de iones.

3.2.2. Estabilización.

El método de estabilización empleado para la mejora en estabilización del colorante obtenido del betabel es un método en el cual se usaron partículas cerámicas (SiO_2) derivados del Tetraetilortosilicato (Teos) llevando a cabo una reacción de hidrólisis y a la vez de condensación, por el cual se obtuvo el óxido de silicio el cual se incorporó a la molécula del colorante (betanina) para la protección de esta.

3.2.2.1. TEOS/Oxido de silicio (SiO_2).

Los alcoxidos metálicos [109] son miembros de la familia de componentes metalorgánicos, los cuales tienen un ligando orgánico unido a un átomo metálico o metaloide. El ejemplo más estudiado es el tetraetoxido de silicio (tetraetoxisilano, o tetraetilortosilicato, TEOS), $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$. Los componentes organometálicos son definidos a tener un enlace directo metal-carbón, no uniones metal-oxígeno-carbón como un alcoxido metálico; así, los alcoxidos metálicos no son componentes organometálicos, aunque este uso aparece frecuentemente en la literatura. Los alcoxidos metálicos son precursores populares porque ellos reaccionan fácilmente con el agua. La reacción es llamada hidrólisis, porque un ion hidroxilo se une al átomo metálico (ataque nucleofílico). La facilidad de hidrólisis de los alcoxidos metálicos fácilmente conduce a la formación de hidróxidos u óxidos hidratados [110].

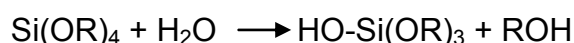
Los alcoxilanos son compuestos químicos derivados del silicio que consisten de un átomo de silicio unido a un grupo orgánico a través de un átomo de oxígeno (Si-OR). Con respecto a su nomenclatura, se nombran "alcoxi". La clasificación de los tetraalcoxisilanos se basa rigurosamente de acuerdo a si el enlace Si-OR permanece intacto o se hidroliza en la aplicación final. La susceptibilidad a la hidrólisis, volatilidad y otras propiedades de los alcoxisilanos predice sus aplicaciones particulares. Los alcoxisilanos poseen excelente estabilidad térmica.

Los alcoxisilanos son vistos operacionalmente como líquidos que dan lugar al dióxido de silicio, que es de importancia comercial considerable [111]. El Tetraetilortosilicato es un líquido a temperatura ambiente, lentamente se hidroliza en *dióxido de silicio u óxido de silicio* y etanol cuando está en contacto con la humedad del ambiente [110]. El óxido de silicio (sílice) se produce comúnmente en la naturaleza como la arenisca, arena de sílice o cuarcita. Si se encuentra en estado amorfo constituye el ópalo y suele incluir un porcentaje elevado de agua. Se usa entre otras cosas, para hacer vidrio, *cerámicas* y cemento [111]. El SiO_2 tiene una estructura de red cristalina atómica, aunque puede adoptar tres formas cristalinas en la naturaleza: cuarzo, tridimita y cristobalita. En estado vítreo (amorfo) [111] es una sustancia análoga en todos los aspectos pero que ha alcanzado un grado de viscosidad tan alto que se puede considerar, a todos los efectos, sólido. Producto inorgánico que se ha enfriado hasta un estado rígido sin pasar por cristalización. Es un material duro, frágil, transparente y amorfo.

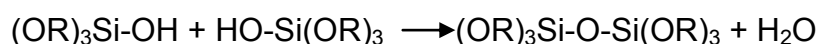
Una *cerámica* es generalmente definida por decir lo que no es: es no metálico e inorgánico, algunos también dicen que no es un calcogenuro. De esta manera incluye a todos los óxidos de metales, nitruros y carburos, tanto cristalinos y no cristalinos. Los materiales cerámicos [114] se definen como materiales inorgánicos y no metálicos. La mayoría de las cerámicas son compuestos formados por elementos metálicos y no metálicos cuyos enlaces interatómicos pueden ser de carácter totalmente iónico, o bien de carácter predominantemente iónico con algún carácter covalente. Estos materiales poseen propiedades muy características que no pueden ser obtenidas con ninguna otro material. Además de su elevada resistencia a altas temperaturas y resistencia a ataques de los agentes químicos, las cerámicas poseen las ventajas de, relativos bajos costos de producción, fácil fabricación y resistencia a la corrosión. Por consiguiente el uso de este tipo de materiales para la estabilización del colorante puede ser de gran interés para su protección contra cambios de temperaturas elevadas y demás factores de carácter químico.

3.2.2.2. Hidrólisis y Condensación.

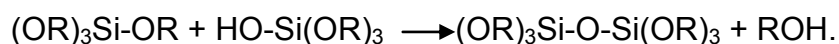
Las reacciones de hidrólisis de alcoxisilanos (compuestos químicos derivados del silicio, que consisten de un átomo de silicio unido a un grupo orgánico a través de un átomo de oxígeno) ocurren por ataque nucleofílico de los átomos de oxígeno del agua sobre los átomos de silicio [109]. Los mecanismos utilizados para explicar tanto la química de la hidrólisis y la condensación son sustitución nucleofílica y adición nucleofílica. En las reacciones de hidrólisis un ion hidroxilo ataca un átomo de metal como se ilustra en la siguiente reacción [115]:



Dos moléculas parcialmente hidrolizadas pueden ligarse en una reacción de condensación tal como:



O



Como se observa en esta relación, la condensación libera una pequeña molécula, tal como agua o alcohol. Conforme este tipo de reacción se lleva a cabo, la sílice (óxido de silicio) tiende a formar moléculas de forma lineal que ocasionalmente se entrecruzan, estas cadenas de moléculas se entrelazan y forman ramificaciones dando como resultado una red tridimensional. Se muestran las siguientes definiciones:

Hidrólisis: Es una reacción química entre agua y otra sustancia, como sales. Esta se puede considerar como lo opuesto a la reacción de condensación, ya que consiste en la ruptura de una especie química en dos por la acción de agua [116].

Condensación: La palabra condensación suele significar la combinación de dos moléculas para dar un único producto con la separación de una más pequeña como agua o un alcohol sencillo. En este caso, la reacción suele denominarse condensación sin importar cuál de los dos productos se aísla [116].

3.3. Espectroscopía UV-visible.

El análisis de las betalaínas, como el de otros compuestos coloridos, se ha basado en la espectroscopia UV-visible. La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma [117]. La longitud de onda comprende entre 160 y 780 nm. La espectroscopia de absorción molecular es valiosa para identificar grupos funcionales de una molécula. Sin embargo, son más importantes las aplicaciones de espectroscopia de absorción de ultravioleta y visible para la determinación cuantitativa de compuestos que contienen grupos absorbentes. La espectroscopia de absorción ultravioleta-visible es la más limitada para la información de compuestos, ya que solo puede ser de utilidad para aquellos que tengan un cromóforo o instauraciones visibles y sirve en muchos casos, como huella dactilar de un compuesto para demostrar su identidad [118]. El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-Visible [117].

En este tipo de absorción las energías de excitación están asociadas a los electrones que formen enlaces sencillos. Las energías de enlaces sencillos son mayores y las transiciones están restringidas a la radiación UV de vacío. En el enlace sencillo la diferencia de energía es bastante grande y la longitud de onda que absorbe son pequeñas (desplazamiento hipsocrómico; hacia el azul); UV de vacío (UV muy lejano) los componentes de la atmosfera son capaces de absorberla <185 nm. La absorción de UV-Vis de longitud de onda larga se restringe a un número limitado de grupos funcionales, llamados Cromóforos que contienen los electrones de valencia con energías de excitación relativamente bajas [118]. Si los dobles enlaces son conjugados, aumenta la longitud de onda, produciéndose un desplazamiento hacia el rojo (batocrómico = desplazamiento a

longitudes de onda más grandes o de menor energía) [118]. A medida que aumenta el número de enlaces dobles conjugados disminuye la diferencia de energía y aumenta la longitud de onda (λ) de la radiación absorbida. Cuando el número de enlaces dobles conjugados es mayor que 8, λ es mayor que 400 nm y el compuesto es coloreado porque absorbe luz visible (entre 400 y 750 nm) [118].

En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm) [117]. La *región UV* es una región de energía muy alta. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV, por lo que esta es muy importante para la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos orgánicos. Diversos factores- como pH, concentración de sal y el disolvente- que alteran la carga de las moléculas, provocan desplazamientos de los espectros UV. La *región visible* apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a longitudes de onda de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del que transmite. La fuente de radiación visible suele ser una lámpara de tungsteno y no proporciona suficiente energía por debajo de 320 nm [117].

Longitud de onda aproximada	Color de luz que se absorbe	Color de luz que se refleja o ve
390-345	Violeta	Amarillo verdoso
435-490	Azul	Amarillo
490-580	Verde	Rojo
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Azul verdoso
650-780	Rojo	Verde azulado

La cantidad de luz absorbida por una muestra dependerá del número de moléculas cromóforas y, consecuentemente, la absorbancia A está relacionada directamente con la concentración.

3.4. Espectroscopia RMN (Resonancia magnética nuclear).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN [118] (NMR, por sus siglas en inglés: Nuclear Magnetic Resonance) es la técnica espectroscópica más valiosa con que cuentan los químicos orgánicos. Muchos núcleos atómicos se comportan como si giraran en torno de un eje, como la tierra gira sobre sí misma. Dado que tienen carga positiva, funcionan como diminutos imanes rectos, por lo que interactúan con un campo magnético externo, que se representa con B_0 . No todos los núcleos se comportan así, pero por fortuna para la química orgánica, el protón, ^1H , y el núcleo de ^{13}C sí giran.

Los espines o giros nucleares se orientan al azar en ausencia de un campo magnético externo Fig.3.1a, pero tienen una orientación específica en presencia de un campo externo B_0 (Fig.3.1b). Se puede orientar un núcleo giratorio de ^1H o de ^{13}C de tal manera que su campo magnético diminuto este alineado con el campo externo (o paralelo al mismo) o en contra (antiparalelo al campo) (Fig. 3.1). El estado de espín paralelo tiene una energía ligeramente menor.

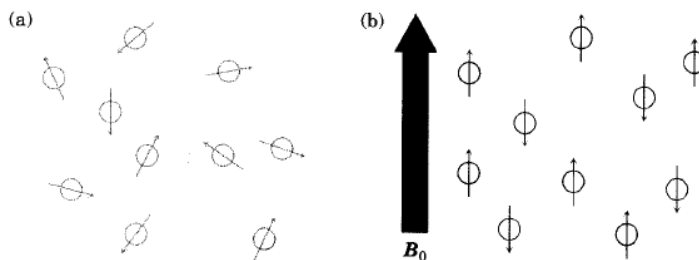


Fig.3.1. Orientaciones de los espines o giros nucleares en el campo magnético [118].

Si ahora los núcleos orientados se someten a la radiación electromagnética de la frecuencia adecuada, hay una absorción de energía y el estado de menor energía “voltea su spin” o giro y pasa al estado de mayor energía. Cuando sucede el volteo, se dice que los núcleos magnéticos están en resonancia con la radiación aplicada – de ahí el nombre *resonancia magnética nuclear*.

3.4.1. Naturaleza de las absorciones de resonancia magnética nuclear.

Si el instrumento de resonancia magnética nuclear tiene la suficiente sensibilidad, detecta las diferencias entre los campos magnéticos efectivos que sienten los diferentes núcleos y podremos ver una señal distinta de RMN para cada núcleo de carbono o de hidrógeno químicamente distinto en sus respectivas moléculas. Así, el espectro de resonancia magnética nuclear de un compuesto orgánico produce un mapa del almacén de carbonos e hidrógenos [118].

El eje horizontal de los espectros RMN del ^1H y del ^{13}C muestra la intensidad efectiva de campo que actúa sobre los núcleos, y el eje vertical, la intensidad de absorción de energía de radiofrecuencia. Cada pico del espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) corresponde a un núcleo químicamente distinto en la molécula. No es posible observar los espectros del ^1H y del ^{13}C al mismo tiempo en el mismo espectrómetro, porque se requieren cantidades distintas de energía para voltear el spín de los distintos núcleos. Hay que registrar por separado los dos espectros [118, 119].

3.4.2. Desplazamientos químicos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear [118, 119] se muestran en gráficas donde la intensidad de campo magnético aplicado aumenta de izquierda a derecha. Por consiguiente, la parte izquierda de la gráfica es el lado de campo bajo, y la parte derecha, la de campo alto. Para definir la posición de una absorción, la gráfica de resonancia magnética nuclear se calibra y se usa un punto de referencia. En la práctica se agrega una pequeña cantidad de tetrametilsilano [TMS (CH_3)₄] a la muestra para producir una absorción de referencia al obtener el espectro. Se usa TMS como referencia para medidas de ^1H y de ^{13}C , porque produce los dos espectros en un solo pico en un campo más alto que las demás absorciones que se suelen presentar en los compuestos orgánicos. La posición que absorbe un núcleo es su desplazamiento químico. Por convención, el desplazamiento químico del TMS se establece como punto cero y las demás absorciones aparecen por lo general a su izquierda. Se calibran las gráficas de RMN con una escala arbitraria, llamada escala delta. Una unidad delta (δ) equivale

a una parte por millón (ppm, una millonésima) de la frecuencia de funcionamiento del espectrómetro.

3.4.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear del ^{13}C .

En ciertos aspectos, es sorprendente que sea posible la resonancia magnética del carbono. Después de todo, el ^{12}C , el isótopo más abundante del carbono, no tiene espín nuclear ni puede verse con RMN. El carbono 13 es el único isótopo natural del carbono con espín nuclear, pero su abundancia en la naturaleza sólo es 1.1%. Así, solo más o menos 1 de cada 100 carbonos de una muestra se puede observar con resonancia magnética nuclear.

La RMN de ^{13}C [118] hace posible contar la cantidad de átomos de carbono distintos en una molécula de estructura desconocida. En su mayor parte, las resonancias con ^{13}C están entre 0 y 220 ppm hacia abajo de la línea de referencia TMS, y el desplazamiento químico exacto de cada una depende del ambiente electrónico de ese carbono dentro de la molécula.

3.4.4. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H .

Dado que cada hidrógeno químicamente distinto en una molécula suele tener una absorción propia, una aplicación de la RMN de ^1H es determinar cuántas clases de hidrógenos no equivalentes hay.

En los espectros de ^1H [118, 119] cada tipo de protón en una molécula ha causado un pico. Sin embargo, sucede con frecuencia que la absorción de un protón se descompone en picos *múltiples*; es decir, en un **multiplete**. Los protones que aparecen como cuatro picos se denominan *cuadruplete* y los protones con 3 picos se llaman *tripletes*. Este fenómeno de absorciones múltiples se llama desdoblamiento o espín-espín y se debe a la interacción, o acoplamiento, de los espines de núcleos cercanos.

CAPÍTULO 4

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Materiales.

4.1.1. Materia Prima. Se usó como materia prima la planta betabel (*Beta vulgaris* L. Var Rubra), de la familia Chenopodiaceae (Quenopodiáceas), de la especie Centrosperma, Fig.4.1. Se usaron betabeles frescos, duros con un color homogéneo y de forma redonda. Para la obtención del colorante (pigmento), se realizó la extracción de su jugo.



Fig. 4.1. Betabel

4.1.2. Equipo de laboratorio.

- Balanza granataria.
- Balanza analítica Sartorius BL 2105, Max 210g, d=0.1mg.
- Parrilla de calentamiento Cimarec 2, Thermolyne.
- Malla de tamiz de prueba física A.ST.M.E.1, No.70, con aberturas en mm de 0.210.
- Extractor Omega comercial, Modelo 1000, compuesto por un exprimidor estilo canasta. Cubierta de policarbonato, tazón pulido de acero inoxidable.3600 r.p.m. de la rueda de trituración. Potencia – 250 Watts, 2.5 Amp.

- Potenciómetro Oakton; pH/conductividad/TDS/°C/°F Meter. pH/ con 510 series. Control por microprocesador, con display dual de LCD. pH de 0.00 a +14. Temperatura de 0° a 100°C.
- Tubos para centrifuga marca Beckman.
- Centrifuga Avanti, Beckman Coulter, Js-25, con un rotor tipo JS-13.1 de aluminio 6 x 50 mL, 13.000 rpm, 26.500 xg.
- Horno imperial nivel laboratorio, Modelo No.3471 de 120 Volts, Hertz 50/60, 10,000 AMPS, 1200 watts. USA.
- Lámpara de radiación UV con una longitud de onda de 340 nm.
- Columna de intercambio iónico de 30 mm de altura por 2.5 mm de diámetro. Posee un fondo de vidrio sintetizado. Se acondicionaron conexiones de plástico para hacer pasar el jugo de betabel y se adaptaron abrazaderas de tornillo como válvulas.
- Liofilizador (Freeze dry system), Freezone 6. Volts A.C, 115, fase 1, ciclo 60, Amp 16. Adaptado a una bomba de vacío con una presión de 1.33×10^3 mbar. Cuenta con frascos para liofilizar (Fast-Freeze) de 300 y 600 mL. Estos poseen tapas de silicona de cierre a presión que proporcionan un sello confiable a alto vacío, boca grande, fondo plano y vidrio de borosilicato.
- Congelador (Shell freezer) T-50°C.LABCONCO.

4.1.3. Equipo analítico.

- Espectrofotómetro UV-VIS, Spectronic^R GENESYSTM 2PC, acoplado al programa Winspec con un ancho de banda espectral de 2nm, sistema óptico de haz-dividido, doble detector, longitud de onda de 200 a 1100nm y precisión +0.5nm (método ASTM #E275-83).
- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Eclipse 270-JEOL.
- Espectrofotómetro Minolta Mod. CM-3600D.

4.1.4. Reactivos.

- Resinas de intercambio iónico, grado industrial ROHM and HAAS.
- Agua acidulada, pH entre 4.5-5.5.
- Tetraetilortosilicato, 98% ($C_8H_{20}O_4Si$) fp. 48°C, $d = 0.933$, FW = 77.08 Aldrich.
- Acetato de amonio cristal 98.6%, (CH_3COONH_4), FW = 77.08. Baker Analyzed ACS.
- Ácido ascórbico.
- EDTA, sal disódica, dihidrato, cristal. 100% ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) FW = 372.24. Baker Analyzed ACS.
- Coadyuvante de secado Aerosil (dióxido de silicio comercial)
- Cloruro de sodio cristal 99.5%, ($NaCl$), FW = 58.44.
- Ácido acético 99.7%, (CH_3CO_2H), FW = 60.05, $d=1.049$. Baker Analyzed ACS.
- Isopropóxido de Titania (IV) 97%, $Ti[OCH(CH_3)_2]_4$, FW = 284.26, $d = 0.955$.

4.2. Metodología

4.2.1. Evaluación de resinas de intercambio iónico.

Se llevó a cabo la evaluación de resinas de intercambio iónico con el fin de usar la más adecuada para implementarla dentro de la metodología de extracción-estabilización del colorante natural. El estudio se basó en la capacidad de retención de color por las resinas de intercambio iónico, haciendo la comparación con cada una de ellas. La resina tuvo la finalidad de eliminar el azúcar libre contenido en el jugo de betabel así como también eliminar el sabor característico de este (el cual resulta ser desagradable por consumidores) y así obtener solo el color dado por las betalainas que se encuentran en el betabel.

4.2.1.1. Especificación de resinas.

- *Amberlita IRA 958 Cl*

Es una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, exhibe un amonio cuaternario funcionalizado en una matriz reticulada de polímero acrílico. La composición acrílica de la matriz contribuye una excelente desorción de orgánicos durante la regeneración de la resina. Su forma física consta de camas blancas opacas. También es usada en decoloración del jugo de azúcar para remover cuerpos de color del jarabe de azúcar y en la purificación de varios productos químicos y farmacéuticos.

- *Imac HP555*

Es una resina de intercambio anionico fuertemente básica con grupos de amino cuaternario, constituye una matriz de copolímero estireno y divinilbenceno. Su forma física consta de camas color crema. La IMAC remueve preferencialmente nitrato a sulfato.

- *Amberlita IRA 96*

La Amberlita es una resina de intercambio aniónico de base débil macroreticular. El alto grado de porosidad de esta resina provee eficiente adsorción de grandes moléculas orgánicas y su desorción durante regeneración, permitiendo así excelente protección contra suciedad orgánica. Su forma física consta de camas esféricas opacas.

- *Amberlita XAD-16*

La amberlita XAD-16 es un polímero absorbente suplido con camas blancas insolubles. Es no iónica, hidrofóbica, polímero cruzado el cual deriva sus propiedades de adsorción de su estructura macroreticular. Su distribución característica de tamaño de poro hace al polímero adsorbente amberlita XAD-16 sea una excelente elección para la adsorción de sustancias orgánicas de bajo a medio peso molecular.

4.2.1.2. Condiciones de operación.

En la Tabla 4.1., se muestran las condiciones de operación usadas en el uso y tratamiento de las resinas de intercambio iónico [120].

Tabla 4.1. Condiciones de operación de resinas.

Condiciones	Amberlite IRA 958 Cl	IMAC HP555	Amberlite IRA96			Amberlite XAD-16
Forma iónica	Cloro	Cloro	Base libre			-
Temperatura máxima de operación	80°C	80°C	100°C			248.90
Mínima profundidad de la cama	600mm	700mm	700mm			700mm
Velocidad de servicio de flujo (BV/h)	8 a 40	5 A 40	5 a 40			2-20
Regenerante	NaCl	NaCl	NaOH	NH ₃	Na ₂ CO ₃	NaOH
Concentración del regenerante (%)	10	10	2 a 4	2 a 4	2 a 4	0.1-0.5
Velocidad de flujo del regenerante (BV/h)	2 a 6	2 a 8	2 a 8	2 a 8	2 a 8	1-4
Tiempo de contacto mínimo del regenerante en la resina	30 Minutos	30 Minutos	30 Minutos			30 Minutos
Velocidad de flujo para el aclarado lento de la resina (BV)	5 a 10	2 a 5	2			1-4
Velocidad de flujo para el aclarado rápido de la resina (BV)	2 a 6	2 a 8	4 a 8			1-4

BV/h.- 1 BV (Bed Volume) = 1m³ de solución por m³ de resina.

La velocidad del flujo es expresado en bedvolumen por hora (BV/h) por ejemplo, en litros de solución por litro de resina / hora. Se realizó una conversión de BV/h a mL /min: (mL medidos de la resina X BV correspondiente a la resina e indicado en la tabla .3.1) / 60 min.

4.2.1.3. Método para la evaluación de resinas de intercambio iónico.

Lo que se tomó en cuenta generalmente en esta evaluación fue lo siguiente:

- ❖ Medida de absorbancia inicial del jugo (extracto de betabel).
- ❖ Volumen de jugo que se pasó a través de la columna la cual contenía la resina de intercambio iónico.
- ❖ Mediciones de absorbancias de alícuotas tomadas cada 40 mL del extracto que salía de la columna.
- ❖ Comportamiento de desorción del color (desprendimiento del color absorbido por la resina) presentado por las resinas.

Para comparar la capacidad de retención en color para las 4 resinas de intercambio iónico se realizó lo siguiente:

- 1) Se preparó la columna con la resina de intercambio iónico a usar. Se realizó un retrolavado con agua acidulada para asegurar el embalaje adecuado. La profundidad de la cama fue de 900 mm para todas las resinas.
- 2) Se extrajo el jugo de betabel de acuerdo al método de extracción descrito más adelante.
- 3) Se procedió a leer en el espectrofotómetro UV-Vis la absorbancia inicial del extracto. Para realizar la lectura en el espectrofotómetro se hizo una dilución de 0.02 mL en 50 mL de agua acidulada.
- 4) Se hizo pasar el jugo de betabel por la columna que contenía la resina de intercambio iónico a evaluar. La velocidad de servicio del extracto por la columna fue de 20 BV/h para las 4 resinas, es decir de 32 mL/min, de acuerdo a la Tabla. 4.1.
- 5) Conforme el paso del jugo por la columna, se tomaron alícuotas cada 40 mL cuando este salía de la columna. Se hizo la dilución para analizarla en el

espectrofotómetro UV-Vis y medir la absorbancia del jugo. Esto se realizó conforme el paso del jugo por la resina de intercambio.

- 6) Una vez que la resina estaba en su máxima capacidad, es decir; que la absorbancia de un cierto volumen de jugo que ya paso por la resina era cercana a la inicial, se suspendía la adición del jugo de betabel debido a que la resina ya no era capaz de retener más color.
- 7) Se realizó una gráfica correspondiente a la absorbancia y al volumen de jugo usado por cada resina.

Conocida la capacidad de retención de la resina, se prosiguió a desorber el color que quedo adsorbido:

- Se preparó una solución de acetato de amonio 1M con un pH de 5.5 (acidulado con ácido acético).
- Esta solución se pasó por la resina que contenía ya el color absorbido con la misma velocidad de servicio de flujo del betabel (32 mL/min).
- El volumen total de acetato usado para la desorción de color en cada resina, fue de acuerdo a un valor mínimo de absorbancia.
- De igual forma se tomaron alícuotas cada 40 mL. Estas alícuotas también fueron leídas en el espectrofotómetro UV-VIS para verificar a que volumen se obtenía la mínima concentración. Esto también era visto físicamente con el color de la solución, ya que se tornaba a un rojo más claro (transparente).
- Se realizó otra gráfica con las absorbancias tomadas cada 40 mL y el volumen usado de acetato.

Limpieza de las resinas de intercambio iónico:

- Después de usar la resinas, se desplazó la materia orgánica con un lavado de agua acidulada, la velocidad de flujo en este caso fue la velocidad para aclarado rápido 5 BV/mL (8mL/min) indicado en la Tabla 4.1.

- Cada resina fue regenerada con su regenerante apropiado, así como la velocidad de flujo correspondiente. El tiempo de regeneración para las resinas fue de 1h-30 min.
- Finalmente, después de la regeneración, otro lavado fue llevado a cabo para otro uso.

4.2.2. Método de Extracción - Estabilización del colorante betalaína.

El método de extracción que se sugirió para la obtención del colorante a partir de su fuente natural (betabel), fue mediante extracción del jugo. Seguido al método de extracción, se estableció el método de estabilización para mejorar la estabilidad del colorante natural. A continuación se describen estos dos métodos:

4.2.2.1. Método de extracción.

- 1) Selección del betabel.
- 2) Pesado del betabel sin el tallo.
- 3) Lavado y escaldado. El escaldado se llevó a cabo por dos minutos en agua en su punto de ebullición (100°C). El escaldado es una etapa muy empleada en las industrias alimentarias. El principal objetivo consiste en la inactivación de enzimas y se suele realizar como etapa previa a procesos de congelación o liofilización.
- 4) Cortado del betabel.
- 5) Extracción del jugo mediante un extractor para jugos Omega.
- 6) Medición del volumen obtenido.
- 7) Filtrado del jugo de betabel mediante una malla tamiz.
- 8) Paso a la estabilización.

4.2.2.2. Método de estabilización.

En el método de estabilización se establecieron dos rutas, la primera con una sola reacción para estabilización (a) y la segunda con dos reacciones para estabilización (b):

a) *Una reacción de estabilización usando partículas cerámicas*

- 1) Empleo del método de extracción.
- 2) Filtrado el jugo extraído como se mencionó en el paso 7 del método de extracción, se procedió a guardar 100 mL de jugo de betabel para tomarlo como blanco (referencia). Se mantuvo guardado en el refrigerador en un vaso cubierto con papel aluminio y a una temperatura de 4°C.
- 3) Posteriormente el jugo sobrante se centrifugo en una centrifuga Avanti (Fig.4.2) de 13000 rpm, colocando 41 mL en cada tubo empleado para centrifugación. El rotor usado fue un rotor tipo JS 13.1 con espacio para 6 tubos (Fig. 4.3). A continuación se muestran los parámetros usados para la centrifugación:

- Rotor 13.1 JS
- Velocidad, 130000 r.p.m
- Temperatura 18°C
- Tiempo de centrifugación, 20 min
- Aceleración máxima
- Desaceleración Lenta



Fig.4.2. Centrifugación



Fig. 4.3. Rotor JS 13.1

- 4) Realizada la primera centrifugación, se midió el volumen de lo que se obtuvo y se hizo pasar por la columna (Fig. 4.4) que contenía la resina de intercambio iónico (Amberlita IRA 958 Cl) con el fin de eliminar el azúcar libre contenido en el jugo de betabel y sabor, obteniendo de esta forma solo el color del colorante. La velocidad del flujo de betabel por la columna fue de 32mL/min (20 BV/h). El volumen de jugo centrifugado que se usó generalmente fue entre 250 y 300 mL.



Fig. 4.4. Columna con la resina de intercambio iónico.

- 5) Ya retenido el jugo de betabel por la resina, se pasó la solución de acetato de amonio (1M) con pH de 5.0 (acidulado con ácido acético) por la columna para llevar a cabo la desorción de color. La velocidad de flujo fue de 32mL/min. La cantidad usada de acetato dependió del volumen usado de extracto de betabel. Aproximadamente por cada 100 mL de jugo de betabel usado correspondieron 100 mL adicionales de acetato de amonio para desorber. Por ejemplo: si se usa 200 mL de jugo de betabel se usaran 300 mL de acetato de amonio.
- 6) Conforme el paso de acetato de amonio por la resina, se desecharon los primeros 60mL del extracto saliente de la columna. Esta fracción de volumen correspondía a la parte que contenía el azúcar, se pudo observar por el color de la solución, un color café (Fig. 4.5).



Fig. 4.5. Retiro de azúcar libre, sabor y otros componentes orgánicos, con la solución de acetato de amonio.

- 7) Posteriormente al ir pasando el acetato por la resina, el color de la solución que salía de la columna era ya de un rojo intenso (Fig. 4.6), por lo que el color comenzaba a desorberse de la resina por el acetato de amonio. Esto se recolectó en un vaso de precipitado y se midió el volumen obtenido.

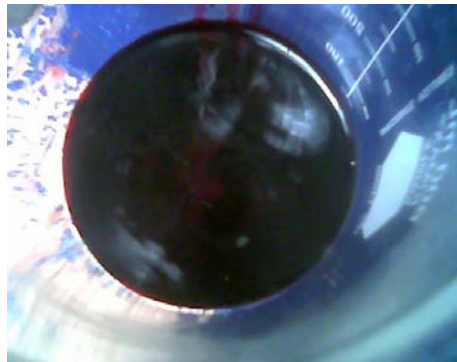


Fig. 4.6. Recolección del color.

- 8) Reacción de estabilización (Fig.4.7). El TEOS (tetraetilortosilicato) fue agregado a un matraz balón, la relación de TEOS fue de 1.96mL por 100mL de extracto. Se adiciono la solución recolectada de la columna en el mismo matraz balón y se agito durante 1h a temperatura ambiente en una parrilla de agitación.

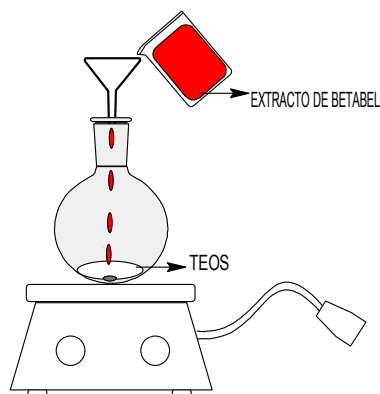


Fig. 4.7. Esquema de reacción de estabilización.

- 9) Una vez concluida la reacción de estabilización se prosiguió a centrifugar por segunda vez. En esta ocasión se centrifugó el extracto natural que se había almacenado.
- 10) Centrifugada la solución con reacción y el extracto natural (sin modificación), se midieron los volúmenes de cada uno. De acuerdo a este volumen se adicionó ácido ascórbico y aerosil (dióxido de silicio comercial) como coadyuvante de secado para ambas. En un vaso de precipitado se colocó la solución con reacción y en otro vaso se colocó el extracto natural. Para el vaso con la solución en reacción se agregó aerosil al 1% y ácido ascórbico al 0.1 %. Mientras, para el natural se agregó 3% de aerosil y 0.1% de ácido ascórbico.
- 11) Posteriormente se llevó a cabo el proceso de liofilización (método descrito más adelante) para la obtención del colorante el polvo. Dichas soluciones se colocaron en frascos de liofilización. En dos frascos de 150 mL se agregaron 100 mL de la solución con reacción (Fig. 4.8), y en un frasco con la misma capacidad se colocó el natural (70 mL).
- 12) Se congelaron dichos frascos en un congelador Shell freezer el cual contiene acetona a -50°C . Una vez congeladas las muestras se colocaron en la liofilizadora (Fig. 4.9). El tiempo de liofilización fue de 36 hrs con un vacío de 200 a 300×10^{-3} Mbar.



Fig. 4.8. Frascos para liofilizar.



Fig. 4.9. Montado de muestras en el equipo de liofilización.

13) Finalmente, llevado a cabo el proceso de liofilización se obtuvo el colorante en polvo de cada uno de los sistemas de estabilización y natural.

b) 2 reacciones de estabilización usando partículas cerámicas

El procedimiento es el mismo que el del inciso a), lo que se modificó fue el orden de la primera reacción de estabilización para poder realizar una segunda reacción:

- 1) Método de extracción
- 2) Centrifugación.
- 3) Primera reacción de estabilización con partículas cerámicas y con la misma relación TEOS que se usó en la secuencia del inciso a) paso 8. Así como las mismas condiciones.
- 4) Centrifugación
- 5) Paso de la solución obtenida de la reacción a través de la resina de intercambio iónico puesta en la columna. Retiro de azúcar y desorción del color. Las condiciones fueron las mismas que la del inciso a (paso 5, 6 y 7).
- 6) Recolectada la solución de la columna se realizó la segunda reacción de estabilización. Se usaron las mismas condiciones que en la primera y misma relación, TEOS: solución de betabel.
- 7) Centrifugación
- 8) Liofilización (36 hrs). Obtención del colorante en polvo.

Se muestra un diagrama generalizado (Fig. 4.10) del método de extracción-estabilización.

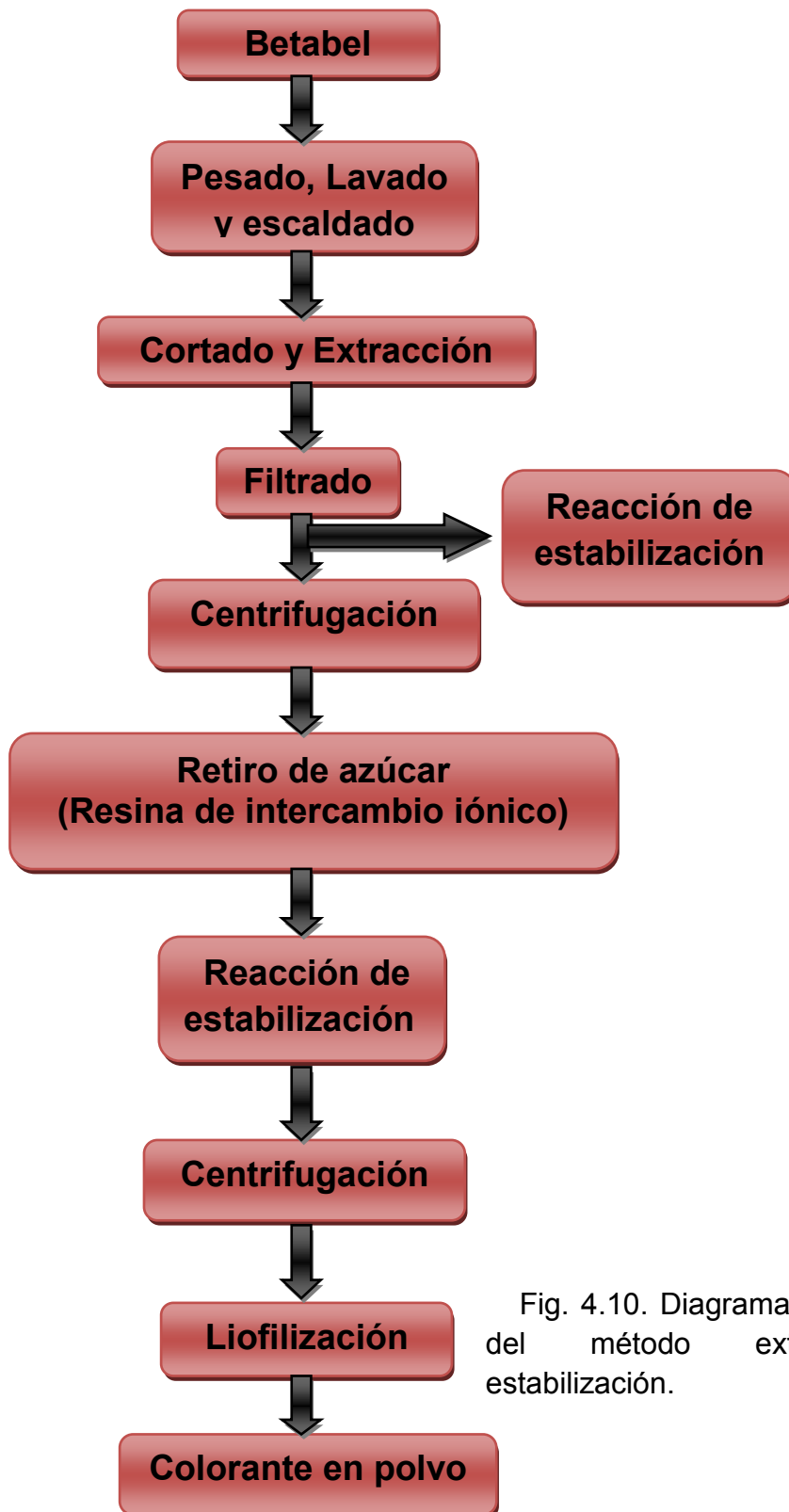


Fig. 4.10. Diagrama general del método extracción-estabilización.

4.2.3. Método de liofilización

Para llevar a cabo la liofilización de las muestras se realizó lo siguiente:

- Se agregaron las muestras en los frascos (especialmente para liofilización). Se congelaron en un congelador (Shell Frezer) el cual contenía acetona a -50°C .
- Se encendió el equipo y se esperó a que alcanzara la temperatura de -50°C .
- Posteriormente se colocó vaso por vaso para llevar a cabo el congelamiento de la muestra (Fig. 4.11). El tiempo para congelar las muestras fue de 20 min para el extracto natural y 1hr para la solución de reacción de estabilización.
- Congeladas las muestras, se conectaron los frascos a la Liofilizadora.
- Para la conexión de estos frascos se verifico en primer lugar que el colector del equipo se encontrara limpio. Que las válvulas de los conectores estuvieran cerradas y que la parte superior del colector y de los conectores estén tapados Fig. 4.12.
- Ya verificado los puntos anteriores, se presionó el switch a la posición ON y en modo automático.
- Se esperó a que iniciara el funcionamiento de la bomba de vacío hasta que llegara a los $133 \times 10^{-3} \text{mBar}$ y que la temperatura fuera de -49°C .
- Posteriormente se conectó un vaso con la muestra ya congelada y se verifico que estuviera bien conectada, se movió la perilla en sentido al vaso para poner iniciar el vacío. Se checo que la señal de vacío marcara nuevamente los $133 \times 10^{-3} \text{mBar}$, para poder colocar un nuevo vaso.
- Una vez estable la presión se procedió a colocar otro vaso en otra conexión y se realizó el mismo procedimiento que el anterior escrito.
- La liofilización de las muestras termino en 36 horas. Esto se verifico tocando los vasos, si estos estaban fríos era indicio de que aún tenían

humedad, si estaban a temperatura ambiente las muestras estaban listas para retirarlas del equipo.

- Ya completado el proceso de liofilización, se retiró cada uno de los vasos de los conectores girando la perilla hasta la dirección opuesta del vaso, esto permitió la entrada de aire al vaso y así poder retirarlo.
- Retirados los tres vasos se presionó el switch de vacío y después el de modo automático y por último se presionó la posición off del control principal.
- Apagada la liofilizadora se giró una de las perillas para que se perdiera todo el vacío del sistema contenido.
- Finalmente se raspó cada uno de los vasos para recolectar el colorante ya en forma de polvo.



Fig. 4.11. Congelamiento de muestras



Fig. 4.12. Liofilizadora

4.2.4. Pruebas de Estabilidad.

En las pruebas de estabilidad se realizó el estudio de resistencia a degradación (efectos de luz, temperatura, pH, agua) de cada uno de los colorantes obtenidos de los diferentes sistemas de estabilización así como del natural sin modificación.

Se realizaron dos monitoreos de estas pruebas, a excepción de la prueba para pH y estabilidad al agua. Se describen a continuación cada una de ellas:

- Pruebas de estabilidad a luz UV.

Según la norma ASTM D 4329, las muestras fueron sometidas a rayos UV a exposición directa (Fig. 4.13). Se pesaron 100 mg de los colorantes obtenidos (natural y modificado) y se diluyeron en 100 mL de agua acidulada para ser sometidas a la lámpara de radiación ultravioleta a una longitud de onda de 340 nm. El tiempo de exposición de las muestras fue de 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

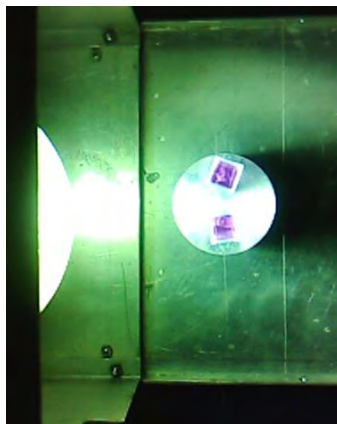


Fig. 4.13. Radiación UV

- Pruebas de estabilidad a temperatura.

Se estudió el comportamiento para dos temperaturas 45°C y 70°C. Estas temperaturas fueron elegidas debido que la mayoría de los alimentos son sometidos a algún tratamiento térmico y pueden alcanzar temperaturas elevadas como los 68°C. En el caso de pasteurización se presentan temperaturas de 63 y 89°C. Para llevar a cabo estos calentamientos se usó un horno (nivel laboratorio) de calentamiento de 120 volts. 100 mg de colorante natural y modificado se diluyeron cada uno en 100 mL de agua acidulada. De esta dilución se tomaron 5

mL para cada tubo de ensaye (Fig. 4.14). Se metieron al horno de calentamiento ajustado primero a 45°C y después a 70°C, esto se repitió para cada sistema de estabilización. El tiempo de calentamiento en cada temperatura y para cada sistema fue de 1 min hasta completar 5 min en el primer monitoreo y hasta 10 min para el segundo monitoreo.



Fig. 4.14. Muestras diluidas del colorante natural y modificado en tubos de ensaye para realizar calentamientos.

- Pruebas de estabilidad a pH alcalino.

Se evaluarán cuatro valores de pH en todos los sistemas de estabilización: pH 6,7, 8 y 9. Se usó una solución básica de hidróxido de amonio 0.1 M para aumentar el valor a pH alcalino. Cada sistema de estabilización fue diluido, 100 mg de colorante en 100 mL de agua acidulada. Posteriormente se fue agregando por goteo el hidróxido de amonio y se fue midiendo el pH en un potenciómetro para obtener los pH correspondientes.

- Prueba de estabilidad al agua.

Se realizó la prueba de estabilidad en agua de los colorantes obtenidos para observar su comportamiento. Se diluyó cada colorante de cada sistema de estabilización en agua acidulada (100 mg en 100 mL), estas muestras se colocaron en tubos de ensaye con tapas y se dejaron por un tiempo de 20 días a temperatura de -4°C.

4.2.5. Caracterización del colorante.

4.2.5.1. Caracterización por espectroscopía UV-VIS.

En espectroscopia UV-VIS se estudió el comportamiento del colorante obtenido de cada una de las reacciones de estabilización y el comportamiento del colorante natural sin reacción. Se midieron absorbancias de cada uno de ellos haciendo la comparación con el blanco (colorante natural), se usó un espectrofotómetro Genesys 2PC (Fig. 4.15). Estas medidas de absorbancia se hicieron después de cada prueba de estabilidad realizada a los colorantes.



Fig. 4.15. Espectrofotómetro Genesys 2PC.

Para estas lecturas se usaron celdas de plástico (Fig. 4.16) rectangular (1cm). Se usó el software winspec el cual está integrado al equipo para obtener las gráficas correspondientes. Antes de efectuar las lecturas de absorbancia se realizó la línea base con agua acidulada. El intervalo de barrido fue de 350-800 nm para todas las pruebas.



Fig. 4.16. Celdas ópticas rectangulares.

4.2.5.2. Cuantificación de color rojo, betanina.

Se llevó a cabo la cuantificación en porcentaje de peso en color rojo de cada colorante modificado y natural. Este porcentaje representa la cantidad presente de color rojo de betanina en la betalaína. Para obtener el porcentaje de color rojo se tomó en cuenta la absorbancia dada por el pico máximo de absorción correspondiente a la betanina (A), el volumen en mL en el cual se diluyó la muestra (V), el coeficiente de extinción molar ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) para betanina; 1120 L/gr-cm [Castellar, R. et al., 2003; Yi-Zhong, C. et al., 2005], la longitud de la celda medida en cm (L) y el peso de la muestra en gramos (W). Estos parámetros se utilizaron en la ecuación que se describe enseguida:

$$\% \text{ Color Rojo} = \frac{A \times V}{1120 \times L \times W} \dots\dots\dots \text{Ecuación (1)}$$

Nilson, 1970

Esta cuantificación se realizó para cada prueba de estabilidad mencionada anteriormente tomando en cuanto los valores de absorbancia dados por la betanina en cada una de las pruebas. Los valores de absorbancia están directamente relacionados con la cantidad en porcentaje de color rojo (betanina) dentro de la betalaína. Aun cuando se conoce la estructura química de las betaxantinas del betabel por lo general no se cuantifican aisladamente ya que forman parte del pigmento rojo o betalaínas que se utiliza integro en la pigmentación de alimentos [40].

4.2.5.3. Evaluación de estabilidad del color en bebidas simuladas.

- Evaluación de L* a* b*
- Evaluación visual
- Aplicación en bebida

Los parámetros L*a*b* son llamados espacios color (también referido como CIELAB) es presentado como uno de los espacios de color más popular para medir el color de un objeto y es ampliamente usado en casi todo el terreno del

color. Definido por CIE (comisión internacional de iluminación) en 1976. El espacio de color L^*C^*h usa el mismo diagrama como con el espacio color $L^*a^*b^*$, pero este usa coordenadas cilíndricas en lugar de coordenadas rectangulares [122]. A continuación se presenta la descripción de cada uno de los parámetros usados para esta evaluación:

- L^* indica luminosidad. Valor más alto $L=100$, claro y más bajo $L=0$, negro.
- a^* y b^* son las coordenadas de cromaticidad. a^* y b^* indican direcciones de color: $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección al amarillo, y $-b^*$ es la dirección al azul. El centro es acromático; cuando los valores de a^* y b^* incrementan y el punto se mueve fuera del centro, la saturación del color incrementa.
- C^* es cromaticidad. El valor de C^* es 0 en el centro e incrementa de acuerdo a la distancia desde el centro. Mientras más alto sea el valor de C^* más puro será el color.
- h es el ángulo de matiz. El ángulo de matiz h se define como punto de partida a partir del eje a^* y es expresado en grados; 0° sería $+a^*$ (rojo), 90° sería $+b^*$ (amarillo), 180° sería $-a^*$ (verde), y 270° sería $-b^*$ (azul).
- Da^* , relación entre el estándar (inicial) y prueba (Amb. o Sol).
- Db^* , relación entre el estándar (inicial) y prueba (Amb y Sol).
- DC^* , relación entre el estándar (inicial) y prueba (Amb. y Sol).
- DE^*ab , cambio de color total.
- % App. Str, Fuerza aparente de la muestra con referencia del estándar.

El modelo que se usó como referencia para describir el color de los valores $L^*a^*b^*$ obtenidos en el espectrofotómetro, fue el modelo CIELAB (espacio color $L^*a^*b^*$), dicho modelo o diagrama de color se encuentra en la referencia [122]. El espectrofotómetro utilizado fue Minolta Mod. CM-3600D (Fig. 4.17).



Fig. 4.17. Espectrofotómetro Minolta.

Metodología usada para la elaboración de bebidas:

- Peso exacto de la cantidad de muestra (ver Tabla. 4.2) en un vaso de precipitado de 25 mL.
- Adicionar aprox. 20 mL de solución buffer 4, agitar vigorosamente y transferir cuantitativamente al matraz aforado de 100 mL.
- Aforar con buffer 4, tapar y agitar hasta completa disolución del polvo del colorante.
- Medir la absorbancia a una longitud de máxima absorbancia de 530 – 540 nm.
- Usar agua destilada como blanco de calibración.
- Es importante que las mediciones sean efectuadas en los primeros 3 minutos después de la preparación.

Tabla 4.2. Pesos de las muestras (según el tipo) para llevar a cabo la dilución de las bebidas.

Muestra	Peso de la muestra g/mL de agua destilada	Dilución 2 mL alícuota / mL buffer 4	Factor de dilución
Betabel en polvo	0.2/100	10/100	100
Betabel modificado	0.1/100	10/100	100
Betabel líquido	0.1/100	10/100	100

- Preparadas las bebidas, fueron expuestas al ambiente y sol durante tres días sin ningún calentamiento.
- Otras se calentaron a 80°C por 1 minuto y posteriormente fueron expuestas al sol y al ambiente por tres días.
- Se realizó la evaluación de color.

4.2.5.4. Resonancia Magnética Nuclear.

Se analizaron sistemas de estabilización por NMR de ^1H y NMR de ^{13}C , en un equipo de RMN (Eclipse 270-JEOL). La determinación se llevó a cabo utilizando como disolvente agua deuterada (D_2O) y como sistema de referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos se informan en partes por millón (ppm) tomando como referencia la señal del TMS.

CAPÍTULO 5

5. Resultados: Análisis y discusión

5.1. Evaluación de resinas de intercambio iónico.

En la Tabla 5.1. se muestra el volumen de jugo de betabel usado para cada resina de intercambio iónico. Estos volúmenes fueron de acuerdo a la capacidad de carga de cada resina.

Tabla 5.1. Volumen cargado de jugo de betabel.

TIPO DE RESINA IONICA	VOLUMEN (mL)
IMAC HP 555	780 mL
AMBERLITE IRA 958 CI	900 mL
AMBERLITE IRA 96	250 mL
AMBERLITE XAD-16	550 mL

Se muestran diferencias en cuanto al volumen de betabel para las 4 resinas de intercambio iónico. Observamos que la resina que uso mayor volumen de jugo fue la resina Amberlite IRA 958 CI con 900 mL, mientras que la resina con menor volumen de jugo usado fue Amberlite IRA 96. A continuación, la figura 5.1. muestra el comportamiento de las resinas en cuanto retención de color presente en el jugo.

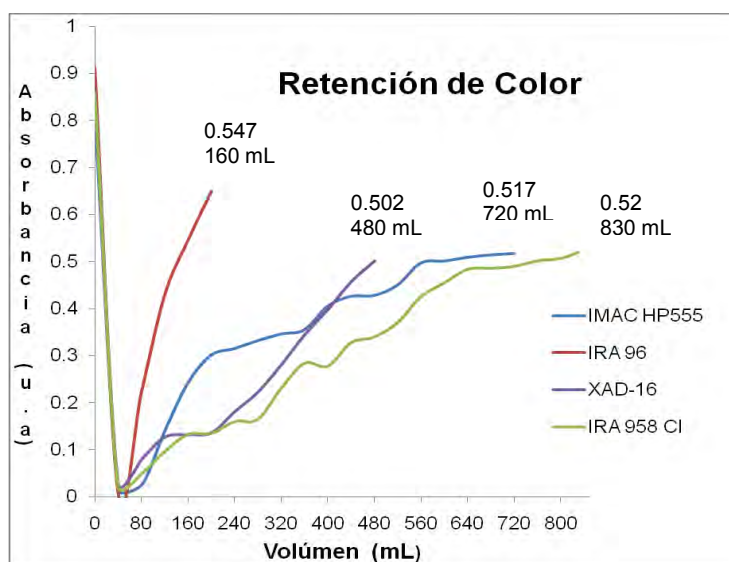


Fig. 5.1. Retención de color.

En la Fig. 5.1 se observan los valores de absorbancia finales alcanzados por cada resina a su volumen correspondiente. El valor inicial del jugo de betabel antes de hacerlo pasar por la resina de intercambio iónico, se observa en esta grafica entre valores de 0.8 y 0.9 en absorbancia (la absorbancia inicial no es la misma para cada caso porque son diferentes betabeles en cada extracción). En el eje X se muestra el volumen de jugo betabel tomado cada 40 mL después de pasar por la resina. En el eje Y se encuentran los valores de absorbancia con unidades arbitrarias (u.a). El valor tomado como punto de referencia para indicar que las resinas llegaban a un punto de saturación fue de 0.5 en absorbancia, este valor mostraba que la resina se saturaba por lo tanto, ya no tenía la capacidad de retener más volumen de jugo por lo que dejaba pasar moléculas cromóforas que proporcionan el color, y la solución tomaba un color rojo muy intenso a diferencia del color que se obtuvo en los primeros 40 u 80 mL de jugo de betabel que paso por columna. Por tanto, notamos que las resinas que retuvieron mayor cantidad de jugo y por ende más moléculas cromóforas, fueron la Amberlite IRA 958 CI e IMAC HP 555. La primera retuvo un volumen de 830 mL de extracto con una absorbancia de 0.52 usando 900 mL totales de jugo de betabel, por lo que retuvo un 92% color en la resina, mientras que la IMAC HP 555 soporto un volumen de 720 mL con un valor de absorbancia de 0.517 reteniendo igualmente 92% al usarse 780 mL. Las resinas IRA 96 y XAD-16, su punto de saturación correspondió a un volumen de 160 y 480 mL respectivamente, alcanzando valores de 0.547 u.a y 0.502 u.a como se indica en la Fig. 5.1. Estas dos últimas resinas obtuvieron poca retención en color a diferencia de las dos primeras. En la Tabla 5.2. se muestra el volumen retenido por cada resina y la absorbancia correspondientes para cada volumen.

Tabla. 5.2. Volumen retenido por cada resina de intercambio iónico.

RESINAS	VOLUMEN RETENIDO (mL)	ABSORBANCIA (u.a)
IMAC HP 555	720	0.502
AMBERLITE IRA 958 CI	830	0.52
AMBERLITE IRA 96	160	0.547
AMBERLITE XAD-16	480	0.502

La siguiente figura 5.2, muestra ahora el comportamiento de desorción de color por cada una de las resinas, usando acetato de amonio 1M como eluyente a un pH ligeramente ácido (5.5).

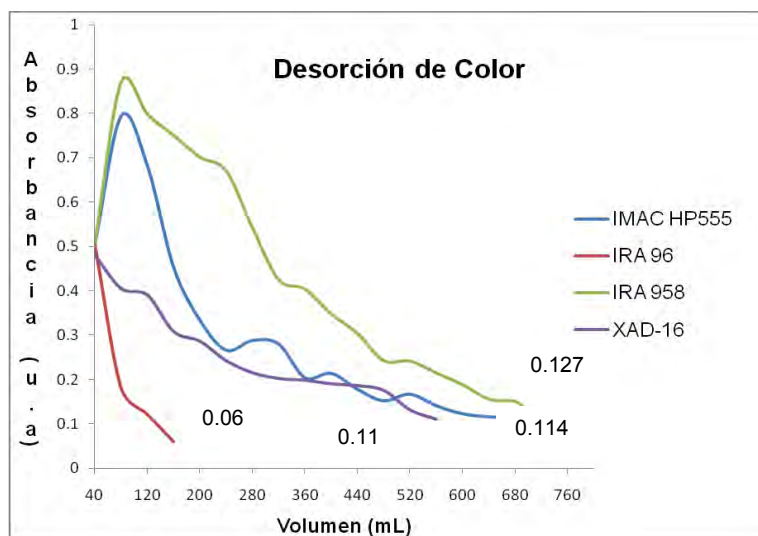


Fig. 5.2. Desorción de color.

En esta figura se observa que a 40 mL la absorbancia del jugo de betabel desorbido por el acetato de amonio es de 0.5 aproximadamente ya que el acetato de amonio comienza a desorber el color capturado por la resina. A 120 mL se observa que en dos casos (IMAC HP555 e IRA 958 CI) la absorbancia se elevó a 0.794 u.a en el primero y 0.87 u.a. en el segundo, esto indica que la desorción se está llevando a cabo por lo que se está desprendiendo el color retenido por estas dos resinas. En el caso de resina IRA 96 y XAD-16, no mostraron un incremento en absorbancia a los 120 mL como paso en el caso anterior, si no que disminuyó a

valores por debajo de 0.5 u.a. Con esto podemos decir que ambas resinas no retuvieron color al momento de hacer pasar el extracto de betabel, por lo que al desorber con acetato de amonio el color fue desorbido muy rápido y por lo tanto, poco el que se logró obtener. Esto se puede concretar en la Tabla 5.3. en donde se muestra que la resina IRA 96 al usar 120 mL de acetato para desorber, la absorbancia alcanzada fue de 0.06 u.a. valor muy inferior a 0.1u.a. (Tomado como referencia debido a que en 0.1 aún se mantenía una tonalidad roja aunque menos intensa). En la XAD-16 se obtuvo 0.39 u.a. cuando llegó a los 120 mL, llegando a 0.11 u.a. a un volumen de 560 mL. Sin embargo, en esta misma figura (Fig. 5.2) se observa que en las resinas IMAC HP 555 e IRA 958 CI la desorción de color se llevó a cabo a un volumen de 680 mL de acetato de amonio para IMAC y 700 mL para IRA 958.

Tabla 5.3. Volumen usado de acetato de amonio para la desorción de color por cada resina.

RESINA	VOLUMEN USADO DE ACETATO PARA LA DESORCION (mL)	MINIMA CONCENTRACIÓN DE COLOR (Absorbancia u.a)
IMAC HP 555	680	0.114
AMBERLITE IRA 958 CI	700	0.127
AMBERLITE IRA 96	160	0.06
AMBERLITE XAD-16	560	0.11

Podemos ver que el mayor volumen de acetato de amonio usado para desorber el color lo usaron las resinas IRA 958 CI e IMAC HP 555, mostrando con esto una mayor retención de color por parte de estas dos. Sin embargo, tomando en cuenta que la IRA 958 CI requirió mayor cantidad de jugo de betabel para llevar a cabo la

retención de color así como también requirió más volumen de acetato de amonio para su desorción de color, podemos decir que esta logro tener mayor eficiencia en cuanto retención de color y soporte de carga a diferencia de las otras 3.

5.2. Extracción-Estabilización.

Los sistemas de estabilización realizados se denotan a continuación. Cada sistema de estabilización se hizo por duplicado. A continuación se describen las claves dadas en cada sistema.

- N.- Colorante natural
- RT.- Una reacción de estabilización con TEOS.
- RTA.- Una reacción de estabilización con TEOS y EDTA como agente quelante.
- 2RT.- Dos reacciones de estabilización con TEOS
- 2RTA.- Dos reacciones de estabilización con TEOS y EDTA como agente quelante
- 2RTI.- Dos reacciones de estabilización con TEOS e Isopropoxido de Titania.
- 2RTIA.- Dos reacciones de estabilización con TEOS e Isopropoxido de Titania y EDTA como agente quelante

Por cada sistema de estabilización se realizó un blanco, de cada blanco se tomó solo uno como sistema de referencia para observar la diferencia de este con los colorantes modificados. Se eligió aquel blanco que presentara un comportamiento promedio similar al de los demás.

Los sistemas fueron cambiando ciertas condiciones tales como:

N, es el extracto obtenido de betabel sin ninguna modificación. Aquellos sistemas que tienen EDTA son sistemas a los cuales se les adiciono 1ppm de ácido Etilendiaminotetraacetico antes de llevar a cabo la liofilización, ya que reportes [85, 40] mencionan que la adición de este agente quelante en dicha cantidad

puede mejorar la estabilidad del colorante en polvo ya en su forma comercial. También se realizaron sistemas de estabilización usando Isopropoxido de Titania junto con TEOS para observar el comportamiento de este en la reacción de estabilización. De ahí, todos los sistemas e incluso el colorante natural se le adiciono ácido ascórbico en 0.1%.

En la Tabla 5.4 se presentan los pesos obtenidos del colorante en polvo de cada uno de los sistemas de estabilización de acuerdo al volumen liofilizado.

Tabla 5.4. Pesos de colorante en gramos obtenido en cada sistema

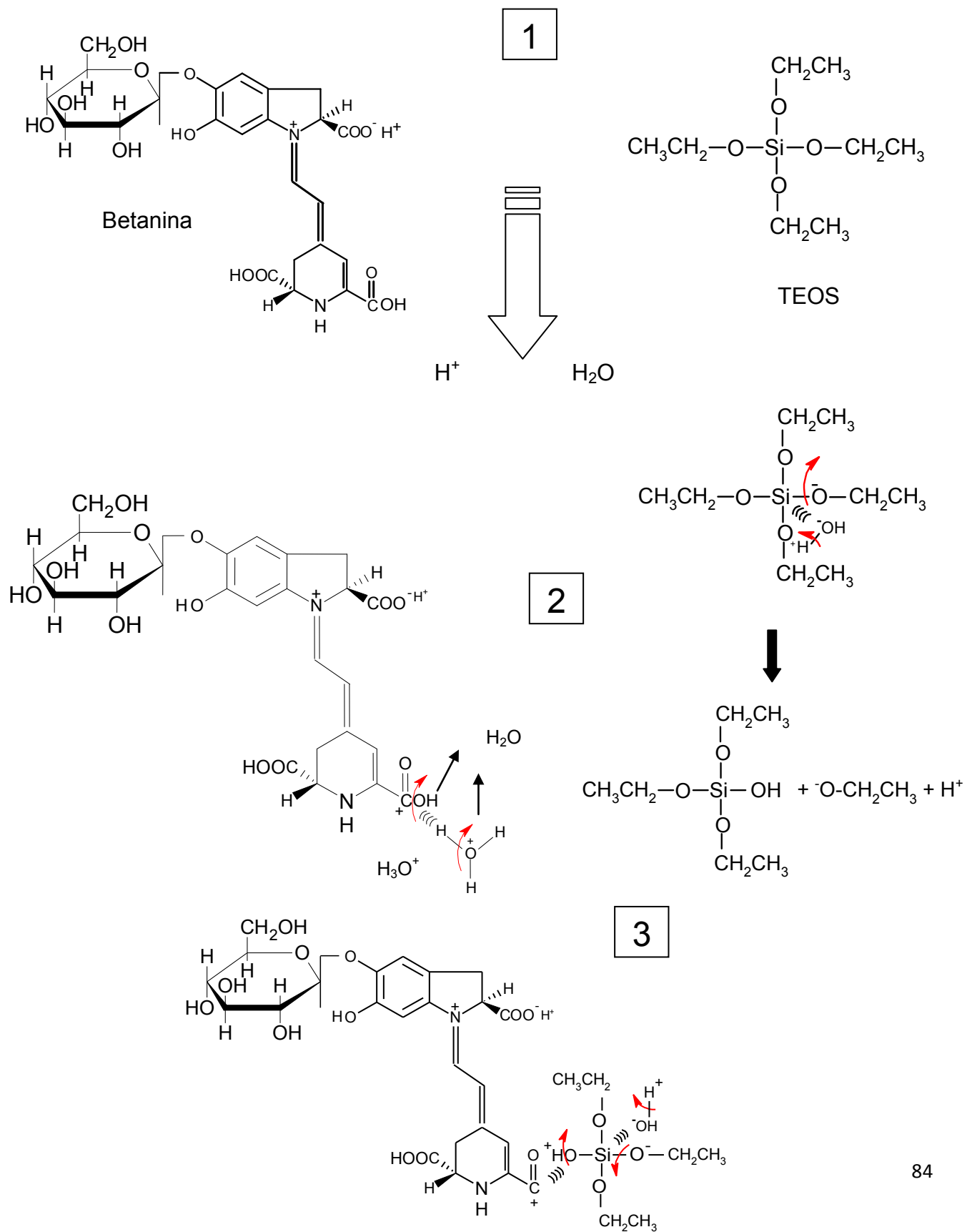
Sistema	Volumen liofilizado (mL)	Peso del colorante obtenido (g)
N	100 mL	12g
RT	420 mL	6.3553g
RTA	270 mL	3.0g
2RT	250 mL	3.2g
2RTA	250 mL	3.0g
2RTI	270 mL	3.1g
2RTIA	250 mL	3.2g

En la Fig. 5.3 se muestran los colorantes en polvo obtenidos de estos sistemas de estabilización después del proceso de liofilización:



Fig. 5.3. Colorantes en polvo.

5.2.1. Mecanismo de reacción propuesto para estabilización.



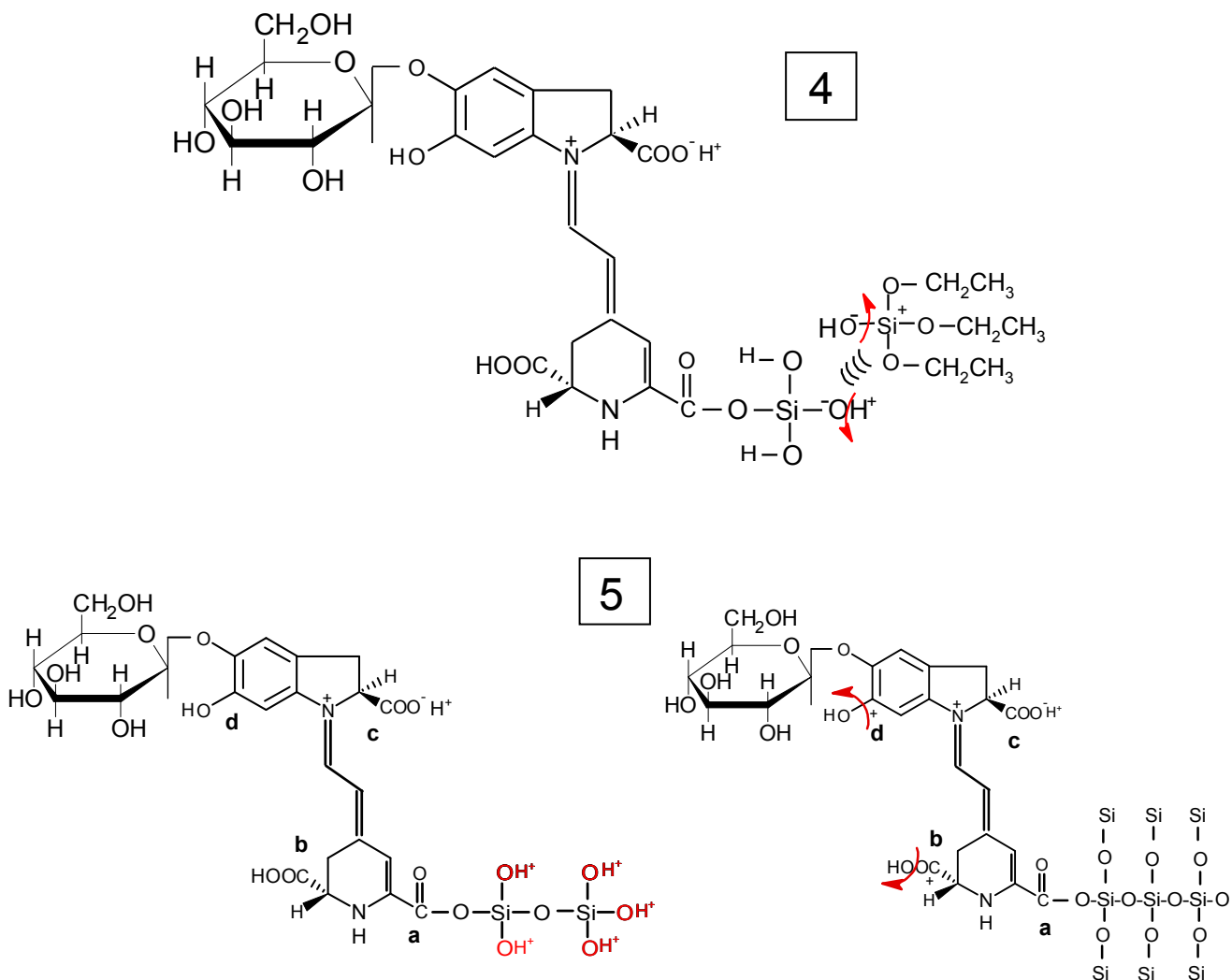


Fig. 5.4. Mecanismo propuesto de la reacción de estabilización.

En la Fig. 5.4 se muestra el mecanismo de reacción propuesto para llevar a cabo la estabilización del colorante. Este mecanismo se describe en 5 pasos como se indica en la figura 5.4. En **1** se presenta la molécula de betanina (responsable del color rojo) y el alcoxido de sílice (TEOS) usado para la reacción de estabilización. Hay protones libres (H^+) en el medio y existen moléculas de agua (H_2O) por lo que probablemente exista agua protonada (H_3O^+) o hidronio. En **2** se lleva a cabo la hidrólisis del grupo OH del $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ formando 2 moléculas de agua, quedando el carbonilo con carga parcial positiva. Así mismo, el TEOS sufre ataque nucleofílico

por un OH^- proveniente de una molécula de agua, sustituyendo el grupo etoxi por el hidroxilo el cual sale en forma de alcohol etílico quedando la molécula parcialmente hidrolizada. En **3** se lleva a cabo el enlace entre el carbonilo de carga parcial positiva y el oxígeno del grupo OH que reemplazo al grupo etoxi de la molécula de TEOS en el paso 2. Posteriormente, de acuerdo a la presencia de moléculas de agua en el medio, mas grupos OH llevaran a cabo ataques nucleofilicos para ir retirando los otros grupos etoxi del TEOS para así quedar el átomo de silicio rodeado de grupos hidroxilos como se observa en el paso 4. Por lo tanto en **4**, otra molécula de TEOS parcialmente hidrolizada puede llevar a cabo una condensación con un oxigeno de un grupo OH que se encuentra unido al átomo de silicio el cual ya ha sido enlazado mediante un oxígeno al carbonilo presente en la molécula de betanina. Para liberar los otros grupos etoxi de esta nueva molécula enlazada, sucede lo mismo que en el paso 3 (ataques nucleofilicos al átomo de silicio). Ya en 5, podemos observar cómo van quedando estas uniones de Si-O-Si unidas ya a nuestra molécula. Estas partículas se pueden entrecruzar para ir formando una red tridimensional a través de uniones del átomo de silicio (moléculas hidrolizadas de TEOS) con oxígenos de grupos OH (marcados con rojo) que rodean a los átomos de silicio ya enlazados. Este entrecruzamiento se llevara a cabo siempre y cuando la hidrolizacion del TEOS sea completa [115, 110]. Este mecanismo propuesto y mostrado en 5 pasos, fue ejemplificado en el carbonilo indicado con la letra a (mostrado en la figura del paso 5), pero también llega a ocurrir lo mismo en el ácido carboxílico indicado con la letra b. Mientras que en c solo ocurre una protonación debido al medio en que se encuentra, el cual se observó desde el paso 1. En el carbón indicado con la letra d, puede existir afinidad de un protón hacia el oxígeno perteneciente al grupo OH que está unido a este carbón, por lo que habrá salida de una molécula de agua quedando el carbón con carga parcial positiva y posteriormente ocurrirá lo que se indicó en el carbonilo a la unión de una molécula de TEOS parcialmente hidrolizada. De esta forma pretendemos que la molécula betanina se encuentre rodeada por partículas de óxido de silicio.

5.3. Caracterización de colorante.

5.3.1. Pruebas de estabilidad - Cuantificación de color rojo (betanina).

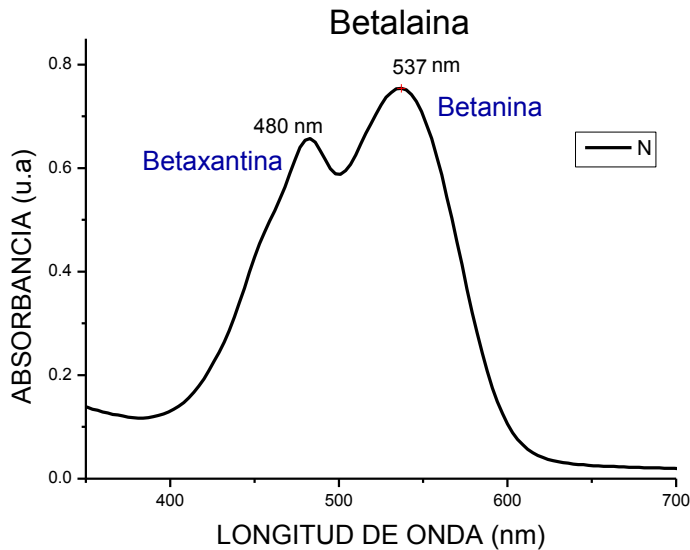


Fig. 5.5. Espectro de absorción del colorante (betalaína) extraída del betabel.

Se observan dos picos de absorción máxima, estos picos corresponden a la betalaína [3, 54]. El pico marcado a una longitud de onda de 537 nm pertenece al cromóforo de betanina, molécula principal del betabel. Mientras que a los 480 nm se encuentra el correspondiente a betaxantina.

Los resultados de un primer monitoreo de cada sistema de estabilización ante las pruebas de estabilidad se muestran a continuación:

Estabilidad a la Temperatura

La Fig.5.6. muestra los espectros de absorción a dos temperaturas. Se presentan los 6 sistemas de estabilización y el natural, su comportamiento inicial y su comportamiento después del tratamiento térmico a 45°C y 70°C en un tiempo de 5 Min de calentamiento. 100 mg de colorante se diluyeron en 100 mL de agua acidulada para realizar todas las lecturas en el equipo de UV-vis.

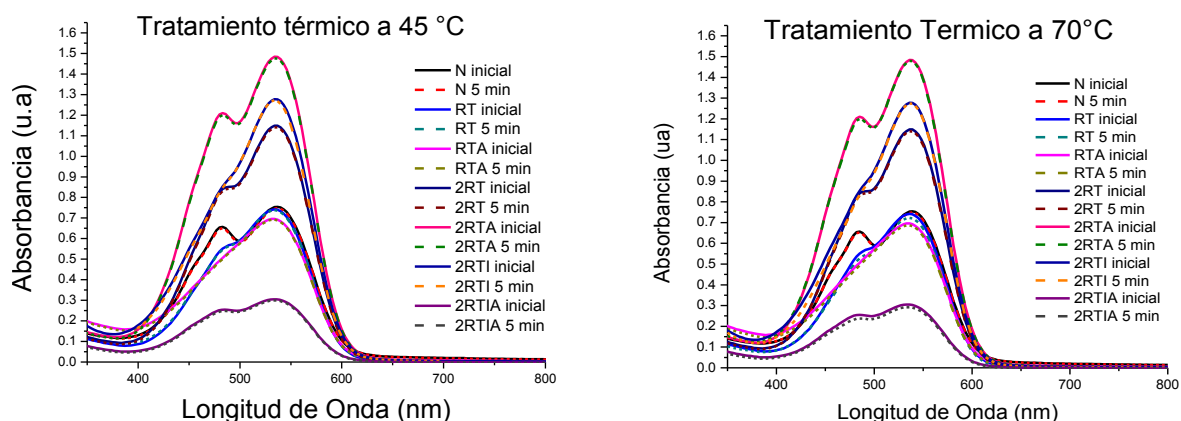


Fig. 5.6. Tratamiento térmico a 45°C y 70°C durante 5 min.

Tabla 5.5. Valores de absorbancia inicial y final a 45°C y 70°C de temperatura durante 5 min, para betanina y betaxantina.

Sistema de Estabilización	Absorbancia (u.a) Inicial		Absorbancia (u.a) Final a 45°C		Absorbancia (u.a) Final a 70°C	
	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina
N	0.754 537 nm	0.654 480 nm	0.748 537 nm	0.646 480 nm	0.747 537 nm	0.649 480 nm
RT	0.742 534 nm	0.551 480 nm	0.738 534 nm	0.546 483 nm	0.722 534 nm	0.527 485 nm
RTA	0.696 534 nm	0.506 484 nm	0.692 534 nm	0.5 484 nm	0.687 534 nm	0.493 485 nm
2RT	1.149 537 nm	0.825 480 nm	1.140 537 nm	0.815 480 nm	1.140 534 nm	0.813 482 nm
2RTA	1.484 534 nm	1.203 480 nm	1.476 534 nm	1.192 480 nm	1.479 534 nm	1.192 480 nm
2RTI	1.278 534 nm	0.83 482 nm	1.272 535 nm	0.824 482 nm	1.274 534 nm	0.809 482 nm
2RTIA	0.305 536 nm	0.254 482 nm	0.299 536 nm	0.247 482 nm	0.292 536 nm	0.236 482 nm

Tabla 5.6. Porcentaje en color rojo (betanina) y pérdida del color durante el tratamiento térmico a 45°C y 70°C.

Sistema de estabilización	% Color rojo (Inicial)	% Color rojo (Final-5min) 45°C	% Color rojo (Final-5min) 70°C	% Color perdido 45°C	% Color perdido 70°C
	Betanina	Betanina	Betanina	Betanina	Betanina
N	0.067	0.066	0.066	0.79	0.92
RT	0.066	0.065	0.064	0.53	2.69
RTA	0.062	0.061	0.061	0.57	1.29
2RT	0.102	0.101	0.101	0.78	0.78
2RTA	0.132	0.131	0.132	0.53	0.33
2RTI	0.114	0.113	0.113	0.46	0.31
2RTIA	0.027	0.026	0.026	1.96	4.26

En los 2 espectros de la Fig.5.6 se observan las líneas espectrales de cada sistema de estabilización y el colorante natural (N). Se muestran 2 líneas de mayor absorbancia, siendo estas las correspondientes al sistema 2RTA, este incremento en absorbancia se puede deber a la concentración de óxido de silicio presente en el colorante, ya que este sistema posee 2 reacciones de estabilización usando estas partículas de óxido de silicio. Se observa que para los sistemas 2RT y 2RTI también existe un incremento en absorbancia aunque siendo en menor proporción que el caso anterior, esto debido a que también son sistemas con doble reacción de estabilización. El colorante natural presenta una absorbancia menor pero mayor que otros sistemas tales como RT, RTA, 2RTIA. Podemos ver que en este caso se presenta un sistema de doble reacción (2RTIA) y su absorbancia es menor, e incluso es el valor más bajo en absorbancia a diferencia de los otros sistemas, este comportamiento puede deberse a que el óxido de Titania, puede mejorar o en su defecto disminuir la estabilidad del colorante debido a su función de fotocatalizador [123]. Observamos la presencia de dos picos a 536 y 480 nm corroborándonos la presencia de betalaína, el pico más sobresaliente corresponde

a la betanina, esta se encuentra entre 534-537 nm como se reporta en la literatura y el pico en menor absorbancia representa a la betaxantina (480nm). Para este trabajo nos enfocamos más a la parte de betanina ya que es la que se encuentra en mayor proporción en el betabel y cómo podemos ver en la Tabla 5.5, los valores de betaxantina siempre están por debajo de los valores en absorbancia de betanina. Sin embargo, se determinaron estas dos sin necesidad de separarlas, debido a que las betacianinas y las betaxantinas disminuyen su estabilidad cuando son separadas.

En la Tabla 5.6 se encuentra reportado el porcentaje de color rojo (betanina) presente en cada sistema de estabilización ya en su forma de colorante en polvo. Este porcentaje se obtuvo mediante la ecuación (4.1) tomando en cuenta las absorbancias máximas de cada colorante. Se muestra el porcentaje de color rojo inicial de cada sistema, posteriormente se presenta el % de color después de llevado a cabo el tratamiento térmico por 5 minutos a 45 y 70°C. También se reporta el porcentaje de color rojo perdido por cada uno de ellos, en base al contenido de color rojo inicial. A la temperatura de 45°C el sistema con menor pérdida en % de color rojo fue el descrito como 2RTI, con un 0.46%. Los sistemas que le siguen son los RT y 2RTA, con un 0.53%. Mientras que a la temperatura de 70°C, se muestra nuevamente que el sistema 2RTI obtuvo menor pérdida con un 0.31% e incluso tuvo menor pérdida que el indicado a 45°C. El sistema 2RTA le sigue con un 0.33%, y también observamos que este porcentaje de color perdido fue menor que en el caso de 45°C, por lo que estos dos sistemas presentaron el mismo comportamiento, de que a mayor temperatura obtuvieron un ligero incremento en absorbancia y por lo tanto en su color. El sistema RT fue más sensible a la temperatura de 70°C ya que su pérdida de color fue mayor (2.6%) a diferencia de la que obtuvo a 45°C. Vemos que en el colorante natural (N), tuvo pérdidas de 0.79% y 0.92% a 45°C y 70°C respectivamente valores mayores que el de los sistemas 2RTA y 2RTI, pero menor que en el caso del sistema 2RTIA el cual obtuvo la mayor pérdida en color rojo tanto a 45 y 70°C.

- Estabilidad a la luz UV

El espectro de absorción UV que se observa en la Fig. 5.7. presenta el comportamiento de los sistemas de estabilización ante la radiación de una lámpara ultravioleta. Las absorbancias iniciales de los colorantes (diluidos) y finales después de 30 min de radiación son mostradas en la Tabla 5.7.

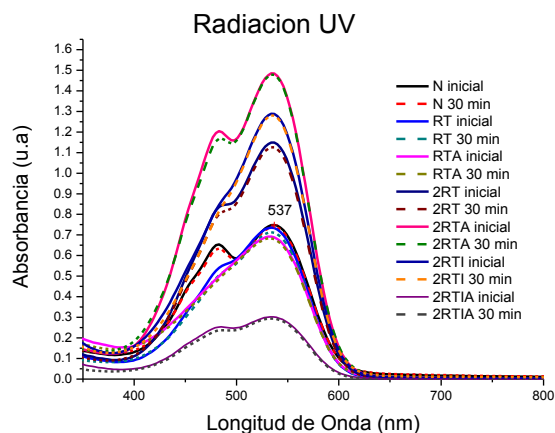


Fig. 5.7. Espectro de absorción de Radiación UV.

Tabla 5.7. Valores de absorbancia inicial y final de betanina y betaxantina frente la radiación UV.

Sistema de estabilización	Absorbancia (u.a) Inicial		Absorbancia (u.a) Final (30 min)	
	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina
N	0.749 537 nm	0.65 480 nm	0.74 537 nm	0.629 480 nm
RT	0.736 534 nm	0.526 480 nm	0.713 534 nm	0.489 480 nm
RTA	0.692 534 nm	0.477 483 nm	0.684 531 nm	0.458 483 nm
2RT	1.149 537 nm	0.82 480 nm	1.126 534 nm	0.782 480 nm
2RTA	1.485 534 nm	1.195 480 nm	1.479 534 nm	1.155 480 nm
2RTI	1.289 534 nm	0.794 483 nm	1.28 534 nm	0.758 477 nm
2RTIA	0.302 536 nm	0.252 482 nm	0.294 536 nm	0.236 482 nm

En el espectro de absorbancia de la Fig. 5.7 se muestra nuevamente con mayor absorbancia el sistema 2RTA, a diferencia del colorante natural. Se observa que el sistema con menor absorbancia fue el 2RTIA como lo fue en el caso anterior (tratamiento térmico), esto se puede ver en la Tabla 5.7 donde se muestran los valores de absorbancia máxima para cada sistema así como la longitud de onda a la cual fue absorbida la molécula de betanina y betaxantina. Los valores de absorbancia referentes a la betaxantina fueron nuevamente menores que los valores de betanina en cada sistema. El colorante natural se encontró en mayor absorbancia que los sistemas RT, RTA y 2RTIA. Y los sistemas 2RTA, 2RTI y 2RT siguen siendo mayores que el natural.

En la Tabla 5.8 se reportó el porcentaje de color rojo (ecuación 1) inicial y final (radiación por 30 min) de cada sistema de estabilización. También se reporta el porcentaje de color rojo perdido después de esta prueba de radiación UV. Notamos que el sistema con menor pérdida en color (0.40%) fue el sistema 2RTA a diferencia del colorante natural el cual tuvo mayor pérdida (1.20%). Sin embargo el colorante natural fue mejor ante los sistemas RT, 2RT y 2RTIA. Y fue menos eficiente que los sistemas RTA, 2RTI y 2RTA.

Tabla. 5.8. Porcentaje inicial y final de color rojo (betanina) frente la radiación UV y perdida del color después de 30 min de radiación.

Sistema de estabilización	% Color rojo (inicial)	% Color rojo (Final- 30 min)	% en perdida de color rojo
	Betanina	Betanina	Betanina
N	0.066	0.066	1.20
RT	0.065	0.063	3.12
RTA	0.061	0.061	1.15
2RT	0.102	0.100	2.00
2RTA	0.132	0.132	0.40
2RTI	0.115	0.114	0.69
2RTIA	0.026	0.026	2.6

- Estabilidad al cambio de pH.

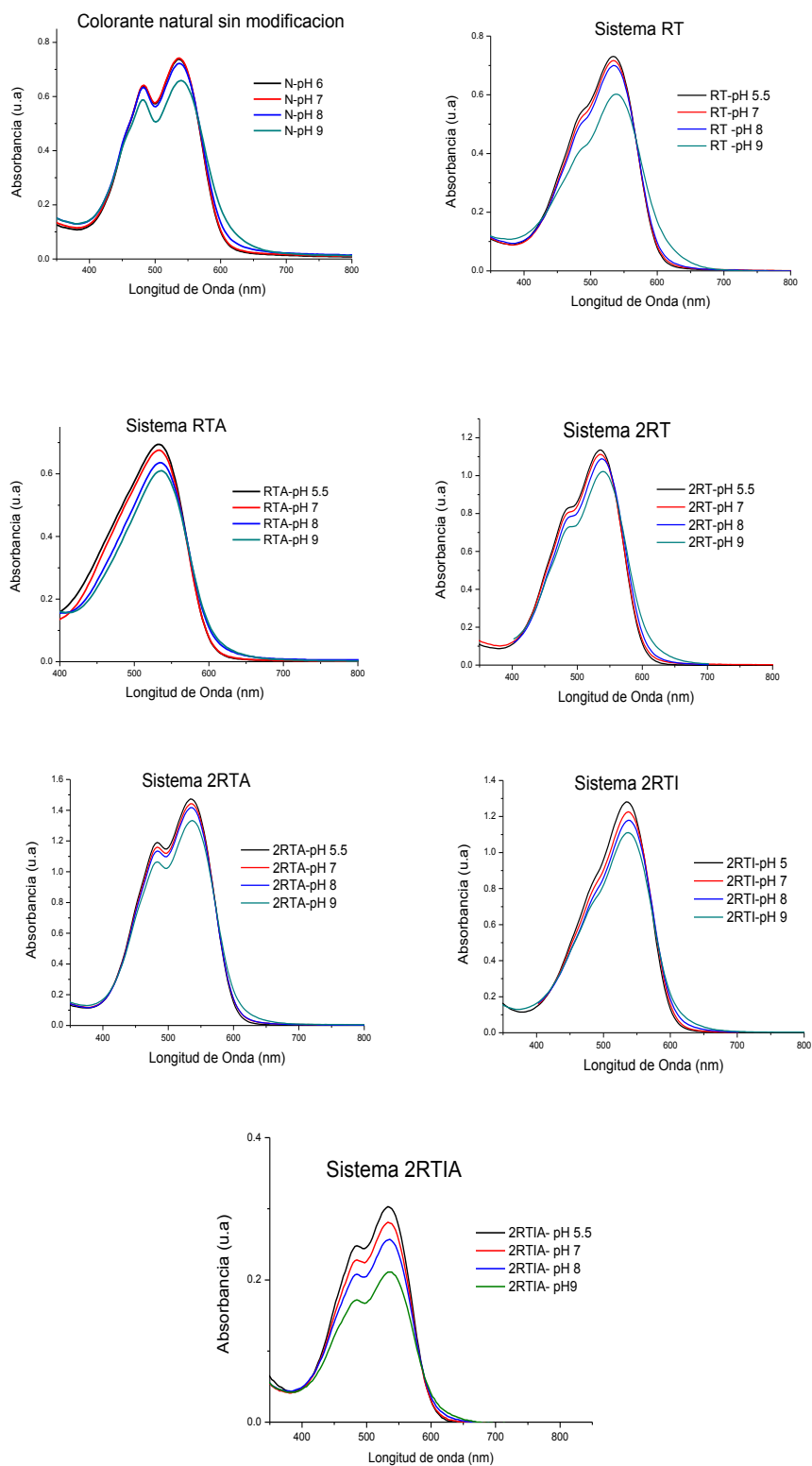


Fig. 5.8. Sistemas de Estabilización ante el cambio de pH.

Tabla. 5.9. Valores de absorbancia para betanina y betaxantina en la prueba de estabilidad a pH.

Sistema de estabilización	pH 6 Absorbancia (u.a)		pH7 Absorbancia (u.a)		pH8 Absorbancia (u.a)v		pH9 Absorbancia (u.a)	
	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina
N	0.740 537 nm	0.636 480 nm	0.739 537 nm	0.638 480 nm	0.722 537 nm	0.631 480 nm	0.659 540 nm	0.587 480 nm
RT	0.731 534 nm	0.531 483 nm	0.717 534 nm	0.511 483 nm	0.700 534 nm	0.492 483 nm	0.602 540 nm	0.407 480 nm
RTA	0.694 534 nm	0.51 486 nm	0.676 534 nm	0.492 486 nm	0.636 534 nm	0.43 486 nm	0.610 537 nm	0.399 486 nm
2RT	1.135 537 nm	0.804 480 nm	1.112 537 nm	0.779 480 nm	1.089 535 nm	0.744 480 nm	1.022 540 nm	0.699 480 nm
2RTA	1.473 534 nm	1.181 480 nm	1.442 537 nm	1.151 480 nm	1.417 537 nm	1.126 480 nm	1.333 534 nm	1.058 480 nm
2RTI	1.281 534 nm	0.849 480 nm	1.226 535 nm	0.806 480 nm	1.179 535 nm	0.764 480 nm	1.111 537 nm	0.732 480 nm
2RTIA	0.303 533 nm	0.247 482 nm	0.281 533 nm	0.227 482 nm	0.257 536 nm	0.207 482 nm	0.211 539 nm	0.171 482 nm

En la Tabla 5.9 se muestran los valores en absorbancia de los espectros mostrados en la Fig. 5.8, para cada uno de los sistemas de estabilización. Se observa que para cada sistema de estabilización y el natural, la absorbancia dada por las betaxantinas es menor que en betanina, por lo que nuevamente corroboramos la presencia de betanina en mayor cantidad en el colorante. Notamos que para todos estos sistemas e incluso para el natural la absorbancia siempre va disminuyendo conforme el pH del colorante (ya diluido -100 mg en 100 mL de agua acidulada) va aumentando, es decir, se vuelve más alcalino. En condiciones alcalinas (pH9) se observó un desplazamiento batocrómico (el pico de absorción se desplaza hacia la derecha) y disminución en absorbancia para los sistemas de estabilización e incluso el natural. Esto también se vio reflejado en el cambio de color de la solución debido a que se vio de un color violáceo. Sin embargo para el sistema 2RTA no hubo desplazamiento a pH 9 pero si disminuyo su absorbancia como en los demás sistemas.

La Tabla. 5.10. muestra nuevamente un porcentaje en color rojo como en los demás casos referente a la betanina. Se presenta el porcentaje por cada pH en cada sistema y posteriormente se obtuvo la pérdida de color rojo (%) de pasar de pH 6 a 7,8 y 9.

Tabla. 5.10. Porcentaje en color rojo de acuerdo al cambio de pH.

Sistema de estabilización	% Color rojo Betanina				pH 6 a pH7 Pérdida en color (%)	pH6 a pH8 Pérdida en color (%)	pH6 a pH9 Pérdida en color (%)
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	Betanina	Betanina	Betanina
N	0.065	0.066	0.064	0.058	0.13	2.43	10.94
RT	0.065	0.064	0.062	0.053	1.91	4.24	17.64
RTA	0.061	0.060	0.056	0.054	2.59	8.35	12.10
2RT	0.101	0.099	0.097	0.091	2.02	4.05	9.95
2RTA	0.131	0.128	0.126	0.119	2.1	3.8	9.5
2RTI	0.114	0.109	0.105	0.099	4.29	7.96	13.27
2RTIA	0.0270	0.025	0.022	0.018	7.26	15.18	30.36

Se encontró que para la betanina el pH al cual se obtuvo una mayor estabilidad fue el pH 6 (o 5.5) seguidos por el pH 7 donde se observa que las pérdidas en color no son tan significativas como en los casos de pH 8 y sobre todo en pH 9. Notamos que de pH 6 a 7 el colorante natural fue el que menos color perdió de acuerdo a la absorbancia inicial del colorante, siguiéndole en esta ocasión tres sistemas de estabilización RT, 2RT y 2RTA. Para el pH de 6 a 8 el porcentaje en color perdido incremento en todos los casos, pero el colorante natural sigue siendo el que menor color perdió siguiéndole en este caso es el sistema 2RTA. Por último para el cambio a pH alcalino (6 a 9) se observó que el colorante natural no

mantuvo su estabilidad, ya que hubo pérdida del 11% con respecto al pH inicial (6). Mientras tanto, el sistema que tuvo menor pérdida en este pH considerablemente alcalino fue el sistema 2RTA con una pérdida en porcentaje respecto al inicial de 9.5%. La razón por la cual al pasar de pH 6 a pH 7 hubo menor cantidad de color perdido en todos los sistemas, se puede explicar a que en este pH existe una menor cantidad de oxígeno lo que disminuyó su degradación oxidativa. Sin embargo, fuera de este valor el número de moles de oxígeno posiblemente excede el número de moles de betanina en solución, por lo que, más de una molécula de oxígeno pudo interactuar con cada molécula de betanina siendo está más factible a la degradación.

- Prueba de estabilidad al agua.

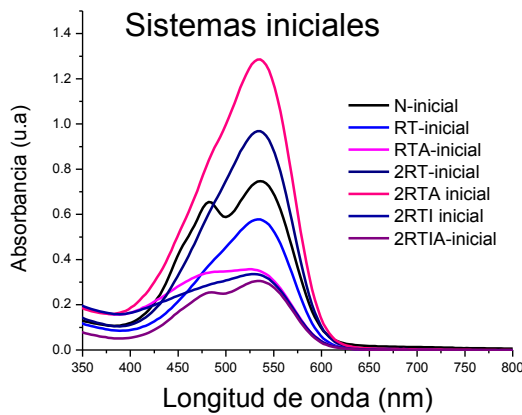


Fig. 5.9. Espectros de estabilidad al agua, absorbancias iniciales y después de 20 días.

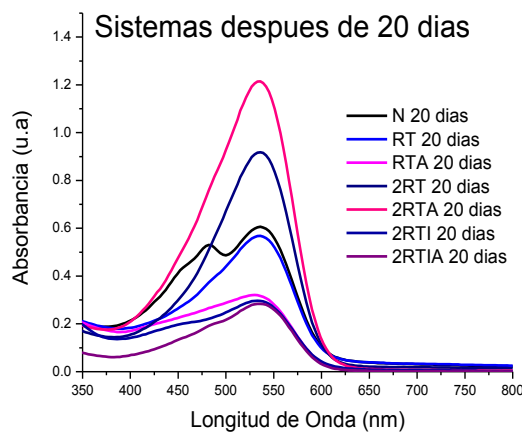


Tabla 5.11. Absorbancias y porcentaje de color rojo de betanina inicial y después de 20 días. Pérdida de color rojo (%).

Sistema de estabilización	Absorbancia inicial	% Color rojo Betanina	Absorbancia final (20 días después)	% Color rojo Betanina	Porcentaje en pérdida de absorbancia (%)
N	0.747 536 nm	0.066	0.606 536 nm	0.054	18.87
RT	0.578 536 nm	0.051	0.538 536 nm	0.048	6.92
RTA	0.357 527 nm	0.031	0.321 530 nm	0.028	10.08
2RT	0.958 536 nm	0.085	0.918 536 nm	0.081	4.17
2RTA	1.286 536 nm	0.114	1.215 536 nm	0.108	5.52
2RTI	0.336 530 nm	0.03	0.297 533 nm	0.026	11.60
2RTIA	0.305 536 nm	0.027	0.284 536 nm	0.025	6.88

En los espectros mostrados en la Fig. 5.9 se observa el comportamiento de los sistemas de estabilización ante la presencia de agua durante 20 días en refrigeración. Estos permanecieron diluidos en agua y tapados para que no les diera la luz. Se pueden notar diferencias en cuanto al espectro inicial y el espectro de 20 días después, observamos que las líneas espectrales disminuyeron en absorbancia entre estos dos. Otra observación en estos espectros es la ausencia del pico de betaxantina para todos los sistemas de reacción a excepción del sistema 2RTIA que presenta un leve pico a 480 nm, pero solo para el colorante sin modificación (natural) se puede ver claramente el pico de betaxantina. Esto puede deberse al tiempo transcurrido para la realización de esta prueba una vez obtenido los colorantes en polvo, considerando también como se mencionó anteriormente en la literatura que las betaxantinas suelen ser más lábiles que la betanina y más para los colorantes que fueron modificados como se pudo ver en estos espectros (Fig.5.9). En la Tabla. 5.11 se presentan las absorbancias iniciales y finales de

todos los sistemas, en donde la absorbancia descendió en todos los casos. En esta misma tabla podemos ver el porcentaje en color rojo inicial y final, así como también el porcentaje perdido para cada uno de los colorantes. El sistema 2RT, fue el que mejor comportamiento tuvo ante la presencia de agua ya que su porcentaje de color rojo perdido fue el menor (4.17%) al pasar 20 días a diferencia de los demás, incluyendo también al natural. A este le siguió el 2RTA con un 5.52% en color perdido, notamos que entre el 2RT y 2RTA no hay una gran diferencia y fueron los que mostraron tener más resistencia al contacto con agua ya que su color no disminuyó mucho en cuanto a su tonalidad roja. Por el contrario, vemos que el colorante natural fue el que mayor pérdida en color mostro, con un 18.8% respecto al color inicial. A este le sigue el RTA y el 2RTI que también mostraron pérdidas significativas.

Después de llevar a cabo estas pruebas de estabilidad y haber obtenido estos primeros resultados, se procedió a realizar una segunda evaluación al cabo de 45 días (mes y medio) a todos estos sistemas de estabilización para observar el comportamiento de estos con respecto al tiempo. A continuación en la Fig. 5.10, se observan las imágenes de estos colorantes y se observa el cambio de color en la mayoría de ellos.

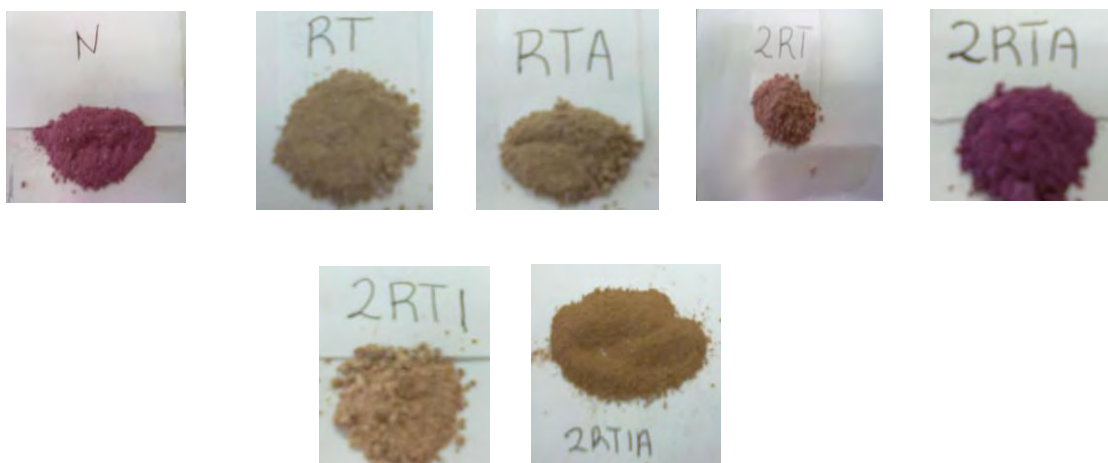


Fig. 5.10. Colorantes de cada sistema de estabilización después de 45 días de almacenamiento en frascos ámbar y a temperatura ambiente

Se puede ver (Fig. 5.10) que en la mayoría de estos colorantes hubo cambio en coloración comparándolos con el color inicial (Fig. 5.3). El colorante natural (N), el sistema de estabilización 2RT y 2RTA mantuvieron un color rojo, aunque en el caso de N y 2RT en menor intensidad. Mientras que para los sistemas RT, RTA, 2RTI y 2RTIA, el color que mostraron en un principio disminuyó y tomaron un color marrón, color el cual se reporta en la literatura como el color que adquieren las betalainas al degradarse. Consecuente con esto, se realizó una segunda evaluación de estos sistemas de estabilización ante la presencia nuevamente de temperatura y radiación UV.

- Estabilidad a la temperatura, segunda evaluación.

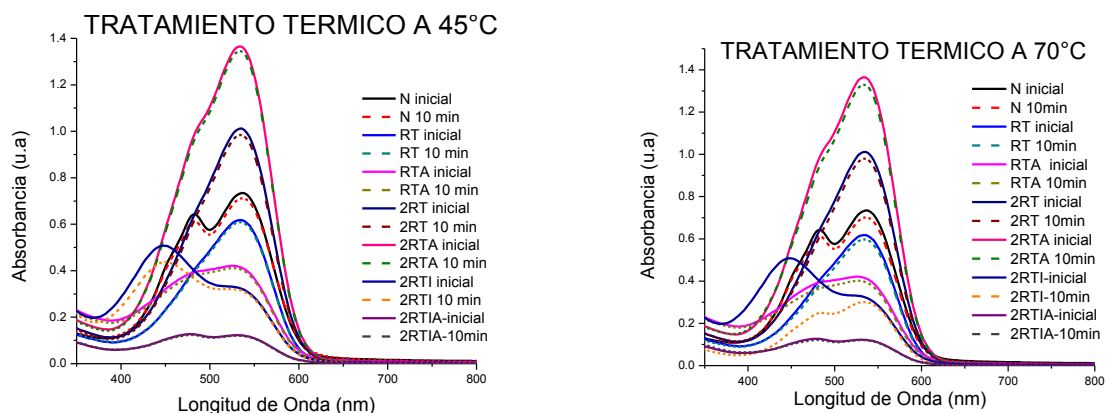


Fig. 5.11. Espectros de absorción de estabilidad a la temperatura al cabo de 45 días. Tratamiento térmico a 45°C y 70°C durante 10 minutos.

Se muestran los espectros de cada colorante (sistemas de estabilización) después de 45 días y llevado a cabo el tratamiento térmico nuevamente. Notamos ahora más diferencia entre las líneas espectrales que en la primera evaluación. Las líneas punteadas muestran las absorbancias iniciales y las líneas continuas las absorbancias después de 10 minutos de calentamiento.

En la Tabla 5.12 se observan los valores de absorbancia tanto para betanina y betaxantinas, así como su valor de longitud de onda máximo. Notamos que en

este caso nuevamente las betaxantinas se encuentran muy por debajo de los valores de betanina tanto a 45°C y 70°C y pasado 45 días.

Tabla. 5.12. Valores en absorbancia para la segunda evaluación de los sistemas de estabilización a 45°C y 70°C durante 10 min.

Sistema de estabilización	Absorbancia (u.a) Inicial		Absorbancia (u.a) Final, 45°C		Absorbancia (u.a) Final, 70°C	
	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina
N	0.735 536 nm	0.636 480 nm	0.712 537 nm	0.611 480 nm	0.702 536 nm	0.606 480 nm
RT	0.618 536 nm	0.417 485 nm	0.609 536 nm	0.408 485 nm	0.597 533 nm	0.395 482 nm
RTA	0.421 527 nm	0.393 482 nm	0.411 527 nm	0.382 485 nm	0.402 527 nm	0.364 482 nm
2RT	1.012 536 nm	0.662 485 nm	0.984 536 nm	0.639 485 nm	0.980 533 nm	0.655 488 nm
2RTA	1.365 533 nm	1.007 485 nm	1.346 534 nm	0.992 486 nm	1.330 533 nm	0.967 485 nm
2RTI	0.322 536 nm	0.508 449 nm	0.314 536 nm	0.437 452 nm	0.301 533 nm	0.38 488 nm
2RTIA	0.122 533 nm	0.125 485 nm	0.119 539	0.122 485 nm	0.117 540 nm	0.118 486 nm

En la Tabla 5.13, se encuentran los valores en porcentaje de color rojo de betanina así mismo el color perdido una vez llevado a cabo los tratamientos térmicos a 45°C y 70°C para todos los sistemas de estabilización después de 10 minutos. El sistema 2RTA fue el que menor pérdida en porcentaje obtuvo (1.4%) a 45°C a diferencia del colorante natural (N) el cual perdió un 3.1% referente a su color inicial. A 70°C, se muestra que el sistema 2RTA nuevamente obtuvo menor pérdida en porcentaje con un 2.56%, mientras que el colorante natural obtuvo un 4.48%, en ambos la absorbancia perdida incremento al subir la temperatura. Esto se notó tanto en la primera evaluación como en esta segunda.

Tabla 5.13. Porcentaje de color rojo inicial y después del tratamiento térmico a 45°C y 70°C, así como pérdida de color rojo después del calentamiento para la segunda evaluación.

Sistema de estabilización	% Color rojo (inicial)	% Color rojo 45°C	% Color rojo 70°C	% en color rojo perdido a 45°C	% en color rojo perdido a 70°C
	Betanina	Betanina	Betanina	Betanina	Betanina
N	0.065	0.063	0.062	3.12	4.48
RT	0.055	0.054	0.053	1.45	3.39
RTA	0.037	0.036	0.035	2.37	4.51
2RT	0.090	0.087	0.087	2.76	3.16
2RTA	0.121	0.120	0.118	1.39	2.56
2RTI	0.028	0.028	0.026	2.48	6.52
2RTIA	0.010	0.010	0.010	2.45	4.09

- Estabilidad a radiación UV, segunda evaluación.

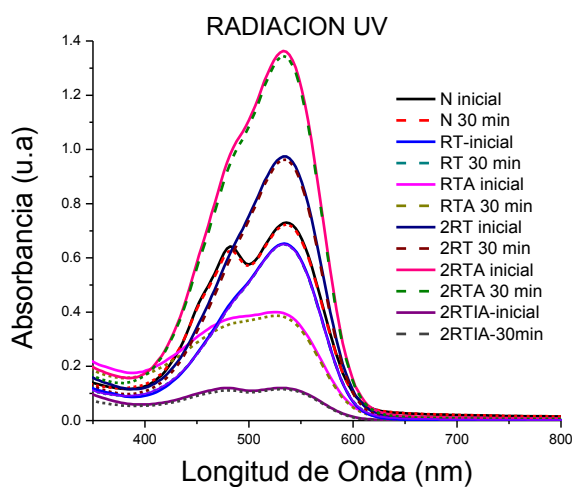


Fig. 5.12. Estabilidad a radiación UV. Segunda evaluación de los sistemas de estabilización.

La Fig.5.12, muestra el comportamiento de los colorantes ante la radiación UV después de 45 días. Notamos que a diferencia del primer estudio de evaluación a los colorantes, en esta segunda evaluación hay sistemas de estabilización que

disminuyeron en gran medida su absorbancia. Esto lo podemos ver en datos numéricos en la Tabla 5.14.

Tabla. 5.14. Absorbancias de radiación UV, segunda evaluación.

Sistema de estabilización	Absorbancia (u.a) Inicial		Absorbancia (u.a) Final, 30 min después.	
	Betanina	Betaxantina	Betanina	Betaxantina
N	0.730 536 nm	0.635 480 nm	0.72 536 nm	0.62 480 nm
RT	0.653 534 nm	0.428 483 nm	0.63 534 nm	0.376 482 nm
RTA	0.400 527 nm	0.379 485 nm	0.387 527 nm	0.359 485 nm
2RT	0.974 536 nm	0.641 485 nm	0.962 536 nm	0.622 485 nm
2RTA	1.363 533 nm	1.007 485 nm	1.35 533 nm	0.975 485 nm
2RTIA	0.120 536 nm	0.119 485 nm	0.116 533 nm	0.111 485 nm

Observamos que la absorbancia disminuyó en todos los sistemas con respecto a la absorbancia inicial. Solo que en algunos casos esta disminución fue mayor que en otros. Esto se relaciona nuevamente con el porcentaje de color rojo. Observamos que el sistema 2RTA obtuvo mayor absorbancia inicial por lo que presenta mayor porcentaje de color rojo (betanina) como se observa en la Tabla 5.15. haciendo la relación de color rojo inicial y final después de 30 minutos de radiación, el sistema 2RTA fue el que menor pérdida en color tuvo con un 0.95% respecto a su color inicial. Le sigue el sistema 2RT y N (natural). Mientras que el sistema 2RTIA fue el que mayor pérdida en color obtuvo siguiéndole el colorante con el sistema RTA y RT. También se puede percatar que el color rojo perdido fue mayor en esta evaluación para la radiación UV en comparación con la primera evaluación de estos colorantes. Con esto podemos decir, que con el paso del tiempo el colorante en polvo aun estando en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente, suele reducir su color.

Tabla. 5.15. Porcentaje en color rojo de betanina inicial y después de 30 minutos de radiación. Perdida de color rojo.

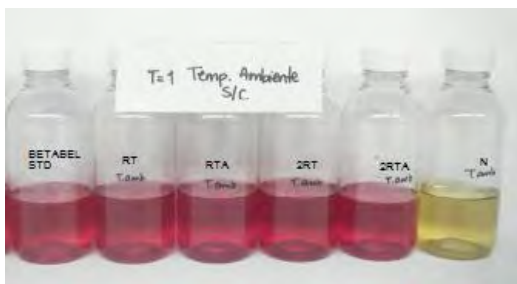
Sistema de Estabilización	% Color rojo Inicial	% Color rojo Final, 30 min después.	% Color perdido
N	Betanina	Betanina	Betanina
	0.065	0.064	1.36
RT	0.058	0.056	3.52
RTA	0.035	0.034	3.25
2RT	0.086	0.085	1.23
2RTA	0.121	0.120	0.95
2RTIA	0.010	0.010	3.33

5.3.2. Evaluación de estabilidad del color en bebidas simuladas.

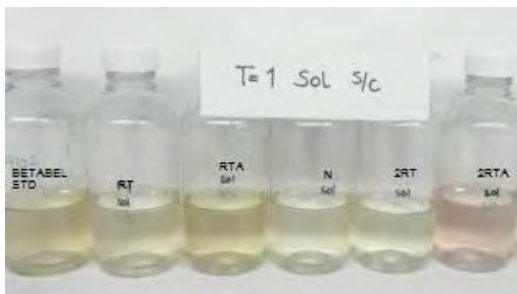
Se analizó la estabilidad del color rojo de betalaínas en pruebas implementadas en bebidas simuladas. Se hicieron estudios sin calentamiento y con calentamiento inicial a temperatura ambiente y a la luz del sol. Se analizaron aquellos colorantes con reacción de estabilización usando el alcoxido de silicio, así como el natural. Los colorantes que usaron el alcoxido de titania (2RTI, 2RTIA) no se analizaron debido a que en pruebas anteriores mostraron resultados poco convincentes. En la Fig. 5.13 se muestran los sistemas de estabilización y el patrón de betabel STD sin calentamiento inicial al ambiente y luz del sol.



a) Sin calentamiento. Inicial.



b) Sin calentamiento. Temperatura ambiente (3días).



c) Sin calentamiento. Al sol (3 días).

Fig. 5.13. Muestras de colorantes diluidos en agua destilada. a) Color inicial, sin calentamiento. b) Colorantes analizados a temperatura ambiente sin calentamiento. c) Colorantes sin calentamiento y expuestas al sol por 3 días.

En la Fig. 5.13 se observa que el color después de estar tres días a temperatura ambiente no cambio demasiado a excepción del colorante natural el cual se observa cambio a un color amarillo. Sin embargo, cuando fueron expuestas al sol por tres días, el color cambio en todos los sistemas, notando que tanto el patrón de betabel STD y el colorante natural obtenido por nosotros se degrado el color, volviéndose este una solución casi transparente, al igual que en los sistemas RT y 2RT. En el caso del sistema 2RTA el color rojo inicial que tenía la solución de volvió un rosa tenue. Y el sistema RTA cambio a un color amarillo claro.

Esto se puede analizar a continuación claramente en la Tabla 5.16, en donde se reportan los datos obtenidos del colorímetro el cual analizo el espacio color y nos reporta datos numéricos de color.

Tabla 5.16. Análisis de los parámetros de espacio color L*a*b* para las bebidas sin calentamiento inicial a temperatura ambiente y al sol.

SISTEMA	CONDICION	TIEMPO	Análisis de color en bebidas sin calentamiento								
			L*	a*	b*	C*	Da*	Db*	DC*	DE*ab	%App. Str.
Bebida Patrón. Betabel 4102-WSP		0	71.11	50.19	-10.00	51.17	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 DIAS	81.14	30.09	-4.71	30.46	-20.10	5.29	-20.72	23.07	59.96
	SOL	3DIAS	97.82	-1.10	7.76	7.84	-51.29	17.76	-43.34	60.49	11.52
N		0	67.73	50.47	-0.96	50.48	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 DIAS	96.54	-1.47	13.91	13.99	-51.94	14.88	-36.49	61.23	15.87
	SOL	3DIAS	98.79	-1.19	4.96	5.10	-51.66	5.92	-45.38	60.57	5.55
RT		0	69.37	50.00	-2.95	50.09	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 DIAS	76.83	39.17	-7.12	39.82	-10.83	-4.17	-10.28	13.80	65.96
	SOL	3 DIAS	98.83	-0.21	4.47	4.48	-50.21	7.42	-45.62	58.69	5.51
RTA		0	70.73	48.54	-4.51	48.75	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 DIAS	74.55	43.66	-10.51	44.91	-4.88	-6.00	-3.84	8.63	78.87
	SOL	3 DIAS	98.23	-1.16	7.28	7.37	-49.70	11.79	-41.38	58.02	9.34
2RT		0	67.83	53.86	-9.58	54.71	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 DIAS	75.87	41.52	-12.06	43.24	-12.34	-2.48	-11.47	14.94	65.05
	SOL	3 DIAS	99.40	-0.95	4.15	4.26	-54.81	13.74	-50.45	64.73	3.56
2RTA		0	68.47	54.42	-7.53	54.94	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 DIAS	73.44	47.24	-15.43	49.70	-7.18	-7.90	-5.24	11.78	73.83
	SOL	3 DIAS	97.87	1.82	2.58	3.16	-52.61	10.11	-51.78	61.11	6.87

Las bebidas que no fueron calentadas inicialmente y fueron expuestas al sol y al ambiente presentan cambios sobre todo las que estuvieron expuestas al sol.

De las bebidas que estuvieron al ambiente la que presenta un menor cambio en la tonalidad roja es la RTA ($Da^* = -4.88$). Todas las pruebas tienen un aumento en la tonalidad azul (valores negativos de b^*) pero en mayor medida la prueba 2RTA ($b^* = -15.43$), la que pierde menor cantidad de cromaticidad es la bebida con el sistema RTA con un DC^* de -3.84 . La bebida con el blanco (N) es la única que pierde todo su color.

Las bebidas que fueron expuestas al sol sin calentamiento, la que mantiene más color es el sistema 2RTA ($a^* = 1.82$), mientras que en la bebida estándar lo que incremento fue la tonalidad amarilla ($b^* = 7.76$). Todas las bebidas pierden la tonalidad roja a excepción de la bebida de la prueba 2RTA, la cual mantiene solo

un poco de tonalidad roja, pero no de azul ya que todos los valores de b^* son positivos.

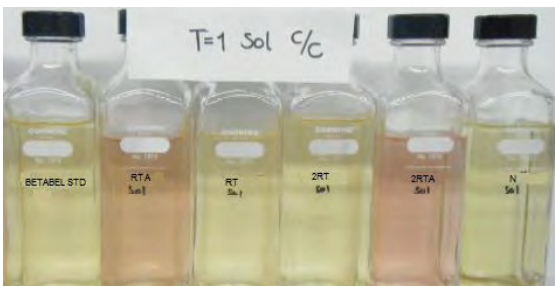
La Fig. 5.14 muestra el comportamiento de los colorantes con calentamiento inicial.



a) Sin calentamiento. Inicial.



b) Con calentamiento. Temperatura ambiente (3 días).



c) Con calentamiento. Al sol (3 días).

Fig. 5.14. Muestras de colorantes diluidos en agua destilada. a) Color inicial, con calentamiento. b) Colorantes con calentamiento a temperatura ambiente (3 días). c) Colorantes con calentamiento y expuestas al sol por 3 días.

En esta ocasión los colorantes fueron calentados (80°C) y se expusieron nuevamente durante 3 días a temperatura ambiente y sol. Se observa en la imagen a) el color inicial de cada uno de los sistemas y del patrón STD de betabel,

todos estos muestran un color rojo muy similares. En la imagen b) observamos estos mismos sistemas previamente calentados y expuestos a temperatura ambiente y notamos que el color de las soluciones siguen siendo rojos aunque con menor intensidad aparentemente. Mientras que en la imagen c) notamos ya un cambio considerable en color en todos los sistemas y patrón, Vemos que los sistemas RT, 2RT, N e incluso el patrón STD cambiaron por completo la tonalidad de su color inicial, adquiriendo un color amarillo claro después de tres días al sol. Mientras, para los sistemas RTA y 2RTA el color rojo cambio a un color rosa muy claro. La Tabla 5.17, nos muestra también el comportamiento en datos numéricos de color de cada uno de estos sistemas mediante los parámetros $L^*a^*b^*$.

Tabla 5.17. Análisis de los parámetros de espacio color $L^*a^*b^*$ para las bebidas con calentamiento inicial a temperatura ambiente y al sol.

SISTEMA	CONDICION	TIEMPO	Análisis de color en bebidas con calentamiento								
			L*	a*	b*	C*	Da*	Db*	DC*	DE*ab	%App. Str.
Bebida Patrón. Betabel 4102-WSP		inicial	76.04	37.90	-0.48	37.90	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 días	84.23	23.07	1.14	23.10	-14.83	1.61	-14.80	17.02	62.89
	SOL	3 días	96.51	1.03	9.23	9.28	-36.87	9.70	-28.62	43.27	19.77
N		Inicial	76.45	35.48	8.51	36.49	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 días	83.50	26.02	-1.74	26.08	-9.46	-10.25	-10.41	15.63	59.75
	SOL	3 días	98.74	-0.55	7.00	7.02	-36.03	-1.51	-29.47	42.40	8.91
RT		Inicial	72.94	44.56	0.11	44.56	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 días	77.06	38.87	-6.19	39.36	-5.69	-6.30	-5.20	9.44	76.56
	SOL	3 días	98.46	-0.30	7.91	7.92	-44.86	7.80	-36.65	52.20	9.37
RTA		inicial	76.60	36.79	-0.88	36.80	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 días	78.19	36.42	-3.69	36.60	-0.38	-2.81	-0.20	3.25	89.27
	SOL	3 días	96.17	2.48	7.34	7.74	-34.32	8.22	-29.06	40.35	20.15
2RT		Inicial	73.69	43.56	-3.78	43.72	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 días	78.79	36.53	-9.70	37.79	-7.03	-5.92	-5.93	10.51	71.84
	SOL	3 días	98.54	-0.14	7.25	7.25	-43.70	11.03	-36.47	51.46	9.34
2RTA		Inicial	72.99	45.25	-4.93	45.52	0.00	0.00	0.00	0.00	100
	AMB	3 días	72.83	48.42	-14.38	50.51	3.16	-9.45	4.98	9.96	94.73
	SOL	3 días	95.72	3.79	5.38	6.58	-41.46	10.31	-38.94	48.40	17.28

Al igual que en las bebidas sin calentamiento al ambiente estas también tuvieron un desarrollo de color en el tono azul, solo la bebida que contienen el colorante del sistema N no aumenta en b^* (-1.74), pero a diferencia de la prueba sin calentamiento, este no perdió toda la tonalidad.

La bebida con el sistema 2RTA se mantiene más estable, ya que además de aumentar su tonalidad azul ($b^* = -14.38$) también aumenta la tonalidad roja ($a^* = 48.42$) y es la única que se hace más cromática ($C^* = 50.51$). El ser más cromática presenta una pureza de color más alto. Las bebidas con exposición al sol tuvieron totalmente pérdida de tonalidad azul, solo las bebidas con el sistema RTA ($a = 2.48$) y 2RTA ($a^* = 3.79$) mantienen tonalidad roja ya que son los únicos valores de $+a^*$ a diferencia de los demás que tienen valores de $-a^*$. A pesar de que la intensidad aparente la bebida del sistema RTA es la que pierde menos intensidad la bebida con 2RTA es la que mantiene más color.

Las Figuras 5.15 y 5.16. muestran en forma gráfica el comportamiento del sistema 2RTA en las pruebas de estabilidad aplicada en bebidas. Solo se tomó este sistema debido a que fue el mejor en cuanto al análisis de color. Se compara con el patrón de betabel STD y con el colorante natural obtenido por nosotros N. En el eje X se mide la longitud de onda (nm) y en el eje Y se muestra las absorbancias.

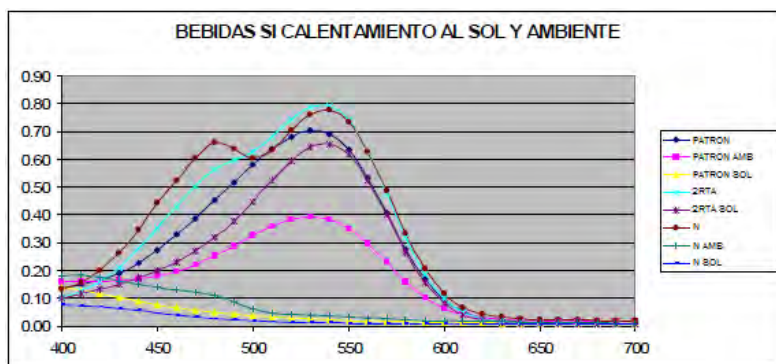


Fig. 5.15. Espectro de absorbancia en bebidas sin calentamiento. Patrón, N y 2RTA.

En este espectro observamos que el sistema 2RTA presenta mayor absorbancia tanto a temperatura ambiente como al sol, a diferencia del patrón y el colorante natural (N). El colorante natural N, muestra sus líneas espectrales muy por debajo de 0.10 en el intervalo de la betanina (537 nm, aprox) tanto a temperatura ambiente como al sol. El patrón betabel presenta una absorbancia de aproximadamente 0.40 al estar a temperatura ambiente, pero al sol esta baja

notablemente a valores muy por debajo de 0.10 como en el caso del colorante natural. Mientras que el 2RTA, a temperatura ambiente se encuentra en un valor aproximado de absorbancia de 0.80 y al sol su absorbancia bajo a 0.65 aprox. Valores muy por encima de los otros dos sistemas. Todo esto en el intervalo de absorbancia de la betanina (537- 538 nm).

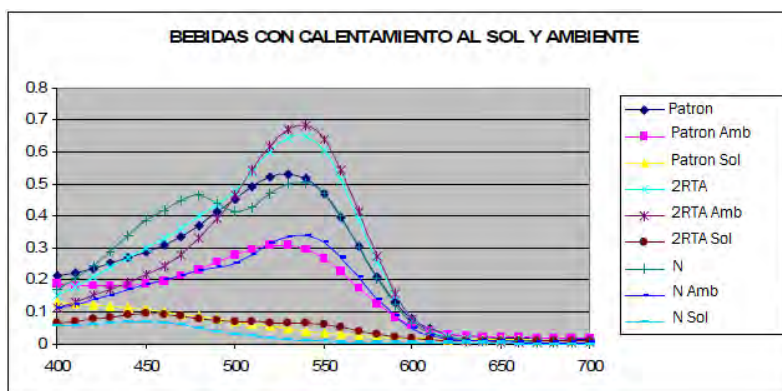
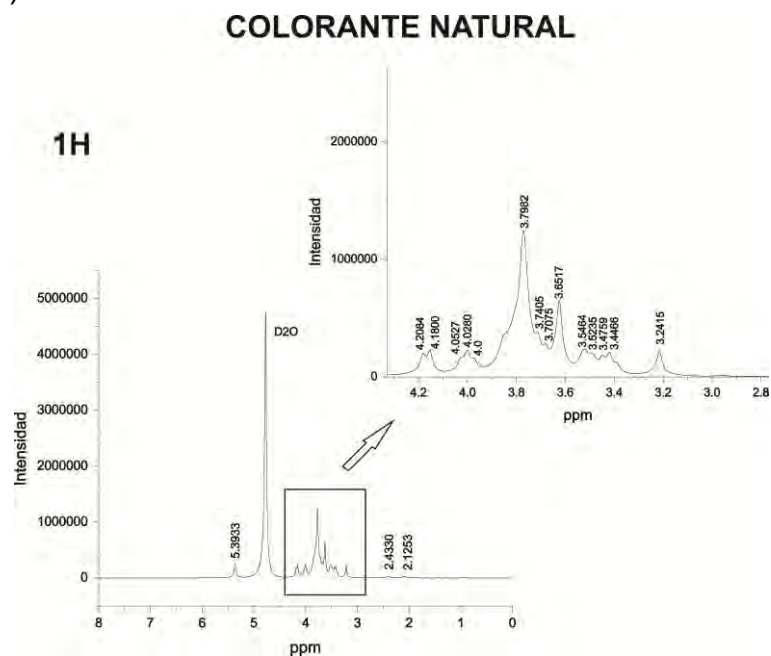


Fig. 5.16. Espectro de absorbancia en bebidas con calentamiento. Patrón, N y 2RTA.

La Fig. 5.16 muestra ahora el comportamiento del sistema 2RTA en bebidas con calentamiento. Vemos que nuevamente el sistema 2RTA presenta mejores resultados en cuanto a valores de absorbancia. Solo en el caso en que fueron expuestos al sol estos tres sistemas disminuyeron en absorbancia, nuevamente a valores por debajo de 0.10 como en el caso sin calentamiento. Pero se muestra que la línea correspondiente a 2RTA se encuentra un poco por encima de las líneas de N y el patrón de betabel. Inicialmente la línea 2RTA se encuentra en un valor de absorbancia máximo (538 nm, aprox) de 0.65, la línea correspondiente al patrón de betabel en un 0.50 al igual que el sistema N. pero cuando estas se dejaron por tres días a temperatura ambiente, el sistema 2RTA incremento un poco su absorbancia alcanzando los 0.70, a diferencia de la bebida patrón el cual se encuentra en 0.3 y N en un 0.35 de absorbancia aproximada.

5.3.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).

a)



b)

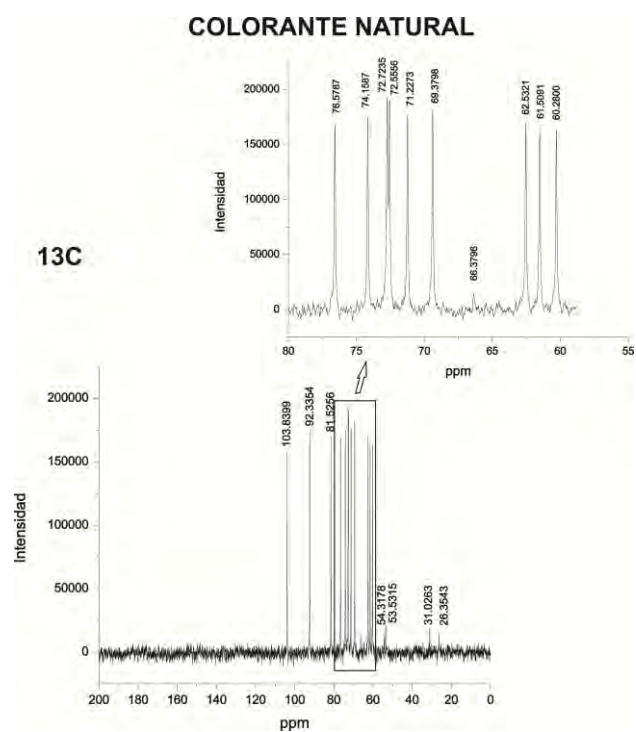
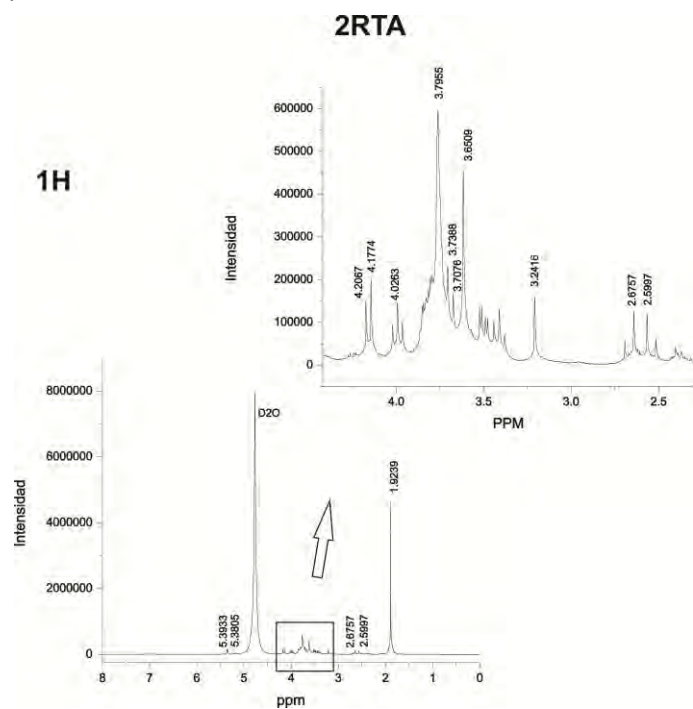


Fig. 5.17. Espectros de RMN, a) ^1H -colorante natural, b) ^{13}C -colorante natural.

a)



b)

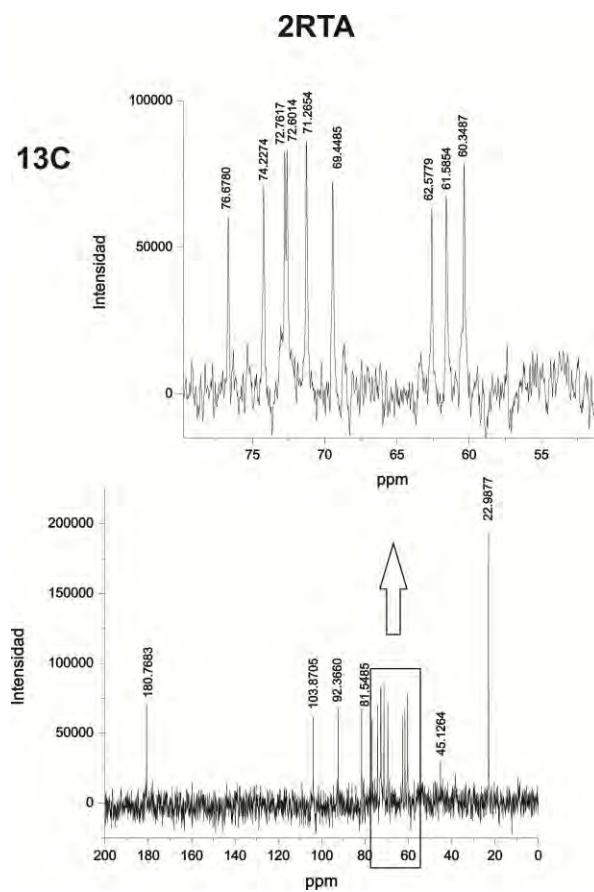


Fig. 5.18. Espectros de RMN, a) ^1H -sistema 2RTA, b) ^{13}C -sistema 2RTA.

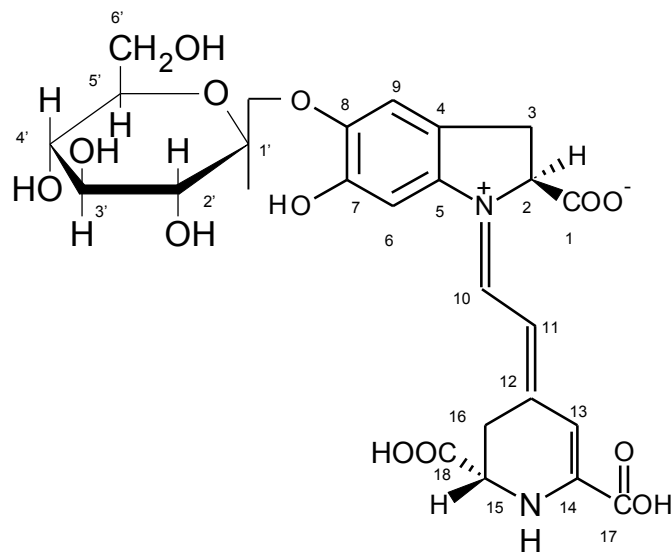


Fig. 5.19. Numeración de los carbonos e hidrógenos en betanina para la identificación de los espectros RMN.

Tabla. 5.18. Valores teóricos encontrados para las señales de Resonancia Magnética Nuclear de protones ^1H y carbón ^{13}C para la molécula de betanina.

No.	^1H RMN δ (ppm) [Slawomir, W. et al., 2007]	^1H RMN δ (ppm) [Lock, Olga, 1997]	^1H RMN δ (ppm) [Stintzing, Florian, C. et al., 2004]	^{13}C RMN δ (ppm) [Slawomir, W. et al., 2007]	^{13}C RMN δ (ppm) [Loera, S. 2005]	^{13}C RMN δ (ppm) [Stintzing, Florian, C. et al., 2004]
1	-----	-----	-----	-----	175	175.8
2	4.87	4.40	4.92	65.3	55	65.0
3	(a/b) 3.62 3.14	(a/b) 3.33	(a/b) 3.53 3.10	33.4	29	32.7
4	-----	-----	-----	-----	135	-----
5	-----	-----	-----	-----	135	-----
6	7.28	7.36	6.98	101.6	135	100.00
7	-----	-----	-----	146.5	73	-----
8	-----	-----	-----	144.8	73	-----
9	7.15	7.30	7.06	115.9	135	113.9
10	8.18	8.67	8.19	143.7	-----	144.4
11	5.82	6.39	5.84	105.9	-----	106.9
12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
13	6.24	6.49	6.22	105.1	-----	-----
14	-----	-----	-----	-----	-----	-----
15	4.29	4.59	4.40	53.9	-----	53.1
16	(a/b) 3.18	(a/b) 3.29 3.33	(a/b) 3.14 3.12	27.2	29	-----

17	-----	-----	-----	-----	175	-----
18	-----	-----	-----	-----	175	-----
1'	5.13	-----	4.98	101.4	-----	101.4
2'	3.65	-----	3.55	-----	-----	-----
3'	3.65	-----	3.55	-----	-----	-----
4'	3.65	-----	3.41	-----	-----	-----
5'	3.65	-----	3.52	-----	-----	-----
6'	(a/b) 3.93 3.67	-----	(a/b) 3.85 3.70	60.7	-----	-----

La Tabla 5.18 nos muestra valores para los protones y carbono 13 pertenecientes a la Betanina. La primera columna nos muestra la numeración (No.) del carbono unido al protón a identificar basándose en la Fig.19., la segunda, tercer y cuarta columna muestra valores de protones. En la quinta, sexta y séptima columna se encuentran los valores de carbono 13 según Slawomir, Lock Olga, Stintzing y Loera S.

Al consultar la literatura (Tabla.5.18) sobre espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protones (^1H RMN) y de carbón 13 (^{13}C RMN) para la betanina, se encontró mayor presencia de picos en el intervalo de 3 a 4 ppm (δ), (Fig. 5.17a, Fig. 5.18a) para el espectro de protones de betanina; estos picos están citados en la tabla 5.18 y se puede observar que los valores dados para los protones son similares en cada autor y próximos a los espectros del Colorante natural y el sistema 2RTA dados por nuestro análisis. Al comparar los valores experimentales obtenidos con los de referencias se puede observar que los valores correspondientes a los protones en los carbonos 2', 3', 4', 5', 6', (Fig. 5.19) que se muestran por la tabla 5.18 son muy similares a los valores mostrados en los espectros ^1H del colorante natural y del sistema 2RTA. Sin embargo, existen otros picos en estos dos espectros de protones que se diferencian en cierto grado a los de referencias como son los siguientes:

No.	Tabla, 5.18.	Valores experimentales	
		Natural Fig. 5.17a	Sistema 2RTA Fig.5.18a
2	4.87,4.40,4.92	5.39	5.39
3	3.62, 3.33, 3.53	3.47	---
15	4.29, 4.59, 4.40	4.18, 4.20	4.17, 4.20
16	3.18, 3.29, 3.14	3.24	3.24

Se observa que los valores son muy similares entre los dos sistemas pero diferentes a los de la tabla 5.18. Una posible explicación a esta diferencia de corrimientos en picos puede ser debido al entorno que rodea tanto al colorante natural como al del sistema 2RTA ya que el primero no se encuentra en su total pureza por lo cual cierto grado de impureza puede interferir mientras que el segundo recordaremos que se encuentra con partículas cerámicas lo cual puede generar dichos corrimientos en cuanto a los valores correspondientes a las energías de absorción de los protones 2, 3, 15, 16. También podemos atribuir esto a la ausencia de picos característicos de la betanina como lo son los protones identificados como 6, 9, 10, 11, 13. O la presencia de otra señal a 1.92 ppm el cual solo se encontró en el sistema 2RTA. Por otro lado en la tabla 5.18 no se encontraron datos teóricos para protones ubicados en los carbonos 17 y 18, ni se pudieron observar experimentalmente en este trabajo. Se debe mencionar también que el pico más alto observado en los dos espectros de ^1H (Fig. 5.17a, 5.18a) alrededor de 4.8 ppm (δ) es referente al medio empleado para la realización del análisis.

Los resultados del espectro de carbono ^{13}C mostrados en las Fig. 5.17b y 5.18b corresponden al colorante natural y el sistema 2RTA respectivamente. Nuevamente se observan señales similares entre estos dos espectros, lo cual se puede ver claramente en las figuras ampliadas de cada uno. Estas señales poseen 8 picos los cuales se encuentran en el intervalo de 60 a 80 ppm (δ) dichos picos se acercaron a datos establecidos en la tabla 5.18. por lo que se asociaron a las energías de desdoblamiento de los carbonos con enumeración 1', 6', 2, 6, 7,

8, 11,13, mostrados en la Fig. 5.19. Existen otros picos tales como los correspondientes a los carbonos 3, 16, 15, que se identifican solo para el colorante natural, mientras que para el sistema 2RTA estos picos característicos de estos carbonos no se observaron. Así mismo en el colorante natural y en la tabla 5.18, no se detectaron señales a 22.98 ppm y 45.12 ppm que se presentaron en el espectro RMN del sistema 2RTA (Fig. 5.18b). Se observó la ausencia de datos experimentales y teóricos para los carbonos con numeración 12, 14, 17, 18, solo en el caso de los carbonos 17 y 18 una cita reporto la señal encontrada para estos, pero no fue observada en nuestros valores experimentales, por lo que esta técnica solo nos ayudó a constatar un cambio químico en la molécula de betanina después de la reacción, pero nos proporciona poca información para elucidar su arreglo molecular con las partículas de óxido de silicio.

CONCLUSIONES

- ❖ El método de extracción que se empleó para la obtención del jugo de betabel, fue un método sencillo y relativamente económico. La innovación de este método fue el uso de una resina de intercambio iónico (amberlite IRA 958 CI) la cual se utilizó para retirar el azúcar libre contenida en el jugo, para que se de esta forma obtuviéramos un colorante libre de azúcar, olor y sabor lo cual lo hace más eficiente para colorear el alimento debido a que no alteraríamos el sabor del producto original.
- ❖ El método de estabilización propuesto fue un método diferente a los que encontramos en la literatura debido al implemento de partículas cerámicas. Las formulaciones realizadas fueron 7 (tomando en cuenta al colorante natural), a dichas formulaciones les denominamos sistemas de estabilización.
- ❖ En la evaluación de resinas de intercambio iónico la amberlita IRA 958 CI fue la más apropiada para implementarla en el método de estabilización (retiro de azúcar, retención de color), ya que obtuvo un 92% en cuanto a capacidad de retención de color.
- ❖ Ante las pruebas de estabilidad, ciertos sistemas de estabilización mostraron ser mejores que el colorante natural (colorante similar al comercial). En la prueba de estabilidad a la temperatura el sistema 2RTI obtuvo menor pérdida de color rojo a 45°C a diferencia del colorante natural, mejorando un 42%. El otro sistema que se vio menos afectado a esta temperatura fue el sistema 2RTA con un 33% de mejora en base a N. A la temperatura de 70°C nuevamente se observaron mejoras en estabilidad con el sistema 2RTI y 2RTA, mostrando un 66% en mejora para el primero y 64% para el segundo con base a la pérdida de color rojo en el colorante natural. Para la segunda evaluación de estabilidad a la temperatura, el sistema 2RTA fue el que presento mejor comportamiento tanto a 45°C y 70°C en comparación con el natural, mejorándolo un 56% y

43% respectivamente. El sistema 2RTI no mostro mejoría para esta segunda evaluación por lo que el tiempo de almacén de 45 días afecto su resistencia a calentamiento.

- ❖ En la prueba de exposición a radiación UV, el sistema que mostro mejor comportamiento en retención de color rojo tanto en la primera como en la segunda evaluación, fue el sistema 2RTA con una mejoría del 67% en la primera y 30.1% en la segunda en base a el colorante natural. Todos los demás sistemas fueron menores. Notamos que para la segunda evaluación el sistema 2RTA disminuyo su porcentaje pero siguió siendo el que mantuvo mayor coloración roja.
- ❖ El pH fue el factor que más afecto al colorante teniendo cambios considerables de color a pH alcalinos (pH 9). El sistema 2RTA mostro menor perdida de color rojo por lo que al comparársele con el natural, este sistema lo mejoró un 13%, siguiéndole el sistema 2RT con un 9%, todos los demás estuvieron muy por debajo de estos porcentajes.
- ❖ En la estabilidad al agua, el sistema de modificación que tuvo mejor resistencia fue el sistema 2RT con un 78% de mejoría, nuevamente respecto al natural, seguido del 2RTA con un 71%.
- ❖ En la evaluación de color rojo en bebidas sin calentamiento al ambiente por 3 días, se mostró más estable el sistema RTA presentando un menor cambio en color rojo ($D_{a^*} = -4.88$) a diferencia del patrón STD (betabel) y nuestro colorante natural (N), el cual este último perdió toda su coloración roja. Para las bebidas sin calentamiento expuestas al sol, la que retuvo mayor color fue el sistema 2RTA ($a^* = .82$). La bebida estándar (betabel) incremento su tonalidad en amarillo. El colorante natural perdió su coloración.
- ❖ Para las bebidas con calentamiento al ambiente (3 días) hubo un comportamiento similar al de las bebidas sin calentamiento pero en esta

ocasión el colorante natural no perdió toda su coloración roja como lo fue en el caso anterior. El sistema 2RTA se mantuvo más estable ya que fue la única que se hizo más cromática ($C^* = 50.51$). Para las bebidas con calentamiento expuestas al sol las bebidas con el sistema RTA ($a^* = 2.48$) y 2RTA ($a^* = 3.79$) mantuvieron la tonalidad roja, pero la bebida que mantuvo más color rojo fue el sistema 2RTA.

- ❖ Como conclusión final ante las pruebas de estabilidad y de acuerdo a los porcentajes en mejora a menor pérdida de color, el sistema presento mejores resultados en cuanto a ser el sistema para mejorar el colorante natural fue el sistema 2RTA.
- ❖ En el análisis RMN de betanina, los espectros de 1H y ^{13}C del colorante natural y el sistema 2RTA no mostraron todos los picos que se especifican en la tabla 5.18. mismos que se indican en la literatura. Estos espectros mostraron principalmente picos que podemos señalar a carbonos e hidrógenos presentes en el glucósido de la molécula (Fig. 5.19) correspondientes a 2', 3', 4', 5', 6'. También se identificaron hidrógenos del tipo H₂. Sin embargo los carbonos pertenecientes al grupo carbonilo y los hidrógenos de los grupos OH no se lograron ver mediante esta técnica, tampoco se encontrar en la literatura, por lo que nos fue imposible hacer un análisis detallado de la molécula de betanina y observar de manera certera la unión de partículas de óxido de silicio a los carbonilos o carbono en su caso. Por lo tanto, la unión de óxido de silicio a los grupos carbonilo de la betanina, lo justificamos principalmente por la química de este tipo de reacciones y la funcionalidad que tienen estos grupos para poder llevar a cabo el mecanismo de reacción antes mencionado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zollinger, H. 1978. Color chemistry, synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments. VCH Alemania Federal, p. 367.
2. Newsome, R.L. 1986. "Food Colors". Food Technology, 40 (7), pp. 49-56.
3. Mandujano, R.R. 2006. Estudio preliminar de los pigmentos presentes en cascara de pitaya (*stenocereus stellatus*) de la región mixteca. Trabajo recepcional. Huajapan de León, Oaxaca. pp. 12-30.
4. Lugo Cervantes Eugenia Del Carmen, 1998. "Aprovechamiento Integral del Chile (*Capsicum annum*) y Pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) para la Producción de colorantes Naturales Rojos Sustituyentes de los Sintéticos. Cooperativa productores de pitaya de Techaluta Jal. Y CIATEJ.
5. Moreno Álvarez, M.J., Vibria Matos, A., Douglas, Bélen C. 2005. Degradación de betalaínas en remolacha (*beta vulgaris L*) estudio cinético. Universidad Simón Rodríguez. Carabobo Venezuela. pp 1-7.
6. Strack, D., Steglich, W., Wray, V., 1993. Betalains. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds), Methods in Plant Biochemistry, Vol. 8, Alkaloids and Sulphur Compounds (Waterman, P.G., Ed). Academic Press, London, pp.421-450.
7. Clement, J.S and Mabry, T.J. 1996. Pigment evolution in the Caryophyllales: a systematic overview. Bot. Acta 109, pp. 360-367.
8. Steglich, W. and Strack, D. 1990. Betalains. In Brossi, A. (Ed.), The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology. Academic Press, London, pp.1-62.
9. Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. 2003. Recent advances in betalain research. Phytochemistry 62 (2003) 247-269.
10. Downham, A. and Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. International Journal of Food Science and Technology 2000, 35, pp. 5-22.
11. Kirsten, M., Florian, C., Stintzing, and Reinhold, C., 2006. Betalain stability and degradation structural and chromatic aspects. Journal of food science, Vol. 71, Nr. 4. pp. 41-50.

12. Lock Sing de Ugaz Olga, 1997. Colorantes Naturales. De la Pontificia Universidad Católica Del Perú (Edit.), 1er Ed. pp. 1-4.
13. Irtta, D.G.V. Colorantes de origen vegetal. En:
[www.itagra.com/.../colorantes%20naturales%20de%20origen%20vegeal\[1\].pdf](http://www.itagra.com/.../colorantes%20naturales%20de%20origen%20vegeal[1].pdf).
14. Meggos, H. 1995. Food colours: an international perspective. The Manufacturing Confectioner, 1995, pp. 59-65.
15. López Briones, María Guadalupe 1985. Obtención de colorantes rojos de origen natural a partir de betabel, Estudio agroquímico. Trabajo recepcional. Facultad de Química, UNAM.
16. Weissler, A. 1975. FDA regulation of Food colors, Food Technology. pp. 34-86.
17. Ramos, B.V. 1983. Utilización de pigmentos rojos de Escontria Chiotilla como colorantes en alimentos. Trabajo recepcional. Facultad de Química, UNAM.
18. Coultate, T.P. 1984. Alimentos química de sus componentes. Acribia S.A. pp. 115-127.
19. Badui Dergal Salvador, 1993. Química de los Alimentos. Pearson Educación (Edit.), 3^{era} Ed. México. pp. 377-405.
20. García, M., Quintero, R., López-Munguía, A. 1993. Biotecnología Alimentaria. Limusa (Edit), 1era Ed. pp. 483-484.
21. Cenzano, I. 1994. Color y Colorantes. Nuevo Manual de Industrias Alimentarias, Madrid. pp. 47-52.
22. Santos, F.E. 1988. "colorantes naturales en la industria alimentaria", Avances en aditivos para la industria en alimentos, PUAL, UNAM, México. pp. 3-140.
23. Clydesdale, M. and Fergus. 2000. Natural Pigments. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40. pp. 173-281.
24. Dominic, W.S. 1989. Química de los alimentos. Mecanismos y teoría. Acribia, S.A. pp. 186-191.
25. Marmi3n, D.A. Wiley. 1991. Handbook of U.S. colorants, Foods, drugs, cosmetics and medical device. 3^{er} Ed. Interscience publication. pp. 14,23,24,44,130,173.

26. Hernández Paz, J.F. 1999. Estudio de pigmentos por medio de microscopia electrónica. Trabajo recepcional. UANL.
27. Francis, F.J. 1999. Colorants: Betalains. Practical Guides for the Food Industry. Eagan Press Handbook Series. American Association of color Chemist, St. Paul, Minnesota. pp. 61-65.
28. Guzmán Sepúlveda, José Benjamín 2007. Colorantes sintéticos empleados en la industria farmacéutica. Trabajo recepcional. Facultad de estudios superiores Cuautitlán.
29. Franco Zavaleta, Elizabeth 2004. Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (*Escontria chiotilla*); una cactácea subexplotada. Trabajo recepcional. Universidad Autónoma Metropolitana.
30. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 8^a edición (FEUM), Vol.1, 2004, pp. 632-640.
31. García, M., Quintero, R., López-Munguía, A. 1993. Biotecnología Alimentaria. Limusa (Edit.), 1era Ed. pp. 483-484.
32. Walford, J. 1980. "Historical development in food coloration", Development in food colours-1, Walford, J. (comp), J. Applied Science Publishers, Londres, pp. 1-23.
33. Hansen, C. 1999. The advantages of natural colours in food products. Food Marketing and Technology February, 99. pp. 12-15.
34. Wittcoff, A.H. 1980. "Industrial Organic Chemicals in Perspective", John Wiley & Sons, EUA, p. 502.
35. Reinfriede, I. 1987. "In vitro pigment production: an alternative to color synthesis", Food Technology, 41 (5), pp. 323-331.
36. Wissgott, U. and Bortlik, K. 1996. Prospects for new natural food colourants. Trends in Food Science and Technology, 7, pp. 298-302.
37. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Survey of color usage in Food. 1987 The working party on food colours. Food surveillance. Paper no. 19, Londres, p. 86.
38. Rodríguez, M.M. 2002. El color en los alimentos. Diario de la Seguridad Alimentaria, En:

http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2002/10/09/3639_print.php

39. Pazmiño Duran, E.A., Giusti, M., Wrolstad, R., Gloria, B. 2001. Anthocyanins from banana bracts (*Musa X paradisiaca*) as potential Food Colorants. *Food Chemistry*, 73. pp. 327-332.
40. Soriano Santos, J., Zavaleta, M., Pelayo Zaldivar, C., Yañez López, L., y Amella Villalpando, M. 2004. Estudio de la composición del pigmento rojo de la jiotilla (*Escontria chiotilla*) y su potencial como fuente de colorantes. Departamento de Biología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
41. Fernández García, A., Butz, P., Tauscher, B. 2001. Effects of High-pressure Processing on Carotenoid Extractability, Antioxidant Activity, Glucose Diffusion, and Water Binding of Tomato Puree (*Licopersicon esculentum Mill*). *Journal Food Science*. 66. pp. 1033-1038.
42. Espín Juan Carlos, 2000. Anthocyanin-Based Natural Colorants: A new source of Antiradical Activity for Foodstuff. *J. Agric. Food Chem.* 48. pp. 1588-1592.
43. Camire, M.E.A., Chaovanalikit, M., Dougherty, J., Briggs. 2002. Blueberry and Grape Anthocyanins as Breakfast Cereal Colorants. *Journal Food Science*, 67. pp. 438-441.
44. Hernández Pérez H. 1996. Identificación de pigmentos en cultivos en suspensión de pitaya (*Stenocereus queretaroensis*). Webwer Buxbaum, 92. F.Q. (UADY) Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.
45. Sánchez González Noé, 2006. Extracción y caracterización de los principales pigmentos del *Opuntia joconostle* c.v. (xoconostle). Trabajo recepcional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, IPN, México, D.F.
46. Ribéreau Gayon, P. 1982. The anthocyanins of grapes and wines. En *Anthocyanins as Food Colors* (Markakis, P., ed.) Academic Press, N.Y., pp. 209-244.

47. Jackman, R.L. and Smith, J.L. 1992. Anthocyanins and Betalains. In Natural Food Colorants (Hendry, G.A.F., Houghton, J.D., eds) Blackie, Glasgow, pp. 182-215.
48. Hendry, G.A.F and Houghton, J.D. 1996. Natural Food Colorants. 2^{da}.Ed. Blackie Academic & Professional. New York. pp. 64-69.
49. Gómez Acosta, L.M., 2000. Fermentación Microbiana de la pulpa de pitaya (*Stenocereus queretaroensis*) para la liberación del Pigmento Hidrosoluble, Universidad Autónoma Chapingo.
50. Piatelli, M. 1981. The Betalains: Structure, Biosynthesis and Chemical Taxonomy. In: Conn, E. E., Ed., and the Biochemistry of plants: A Comprehensive Treatise. Vol. 17. Secondary Plant Products, Academic Press, New York, pp. 557-575.
51. Böhm, H. and Rink, E. 1988. Betalains. In: Cell culture and Somatic Cell Genetics of plants. Academic Press, New York, pp. 449-463.
52. Zryd, J-P. and Christinet, L. 2004. Betalains. In Davies KM, editor. Plant pigments and their manipulation. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 185-247.
53. Hong Han X., Jian Gao Z., Guo Xiao X., 2009. Enzymes and genes involved in the betalain biosynthesis in higher plants. State Key Laboratory of plant physiology and Biochemistry, college of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing, 100094. Vol. 8 (24), pp. 6735-6744.
54. Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. 2002. Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 50: 2302-7.
55. Fennema Owen R. and Dekker, M. 1996. Química de los alimentos. N.Y. pp. 826-833.
56. Yi-Zhong Cai., Mei Sun and Harold Corke, 2005. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology* 16, pp. 370-376.

57. Rivera Aléman C. 1994. Estudio preliminar sobre extracción de un colorante obtenido a partir de células en suspensión de *Stenocereus queretaroensis* (pitaya). Universidad de Guadalajara.
58. Delgado Vargas, F., A. R. Jiménez, and O. Paredes-López. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40. pp. 173-289.
59. Piatelli, M. and Minale, L. 1964. Pigments of *Centrosperma*. I. Betacyanins from *phyllocactus hybridus* Hort and *Opuntia ficus-indica*, *Phytochemistry*, 3. pp. 307-311.
60. Bokern, M. and Strack, D., 1988. Synthesis of Hydroxycinnamic Acid Esters of Betacyanins via 1-O-acylglucosides of Hydroxycinnamic Acids by Protein Preparations from Cell Suspension Cultures of *Chenopodium rubrum* and Petals of *Lampranthus sociorum*, *Planta*, 174. pp. 101-105.
61. Piatelli, M. Impellizzeri, G., 1970. 2-Descarboxybetanidin, a minor Betacyanin from *Carpobrotus acinaciformis*. *Phytochemistry*, 9. pp. 2553-2556.
62. Minale, L., Piatelli, M., De Stefano, S., and Nicolaus, R.A., 1966. Pigments of *Centrosperma* VI. Acylated Betacyanins, *Phytochemistry*, 5. pp. 1037-1052.
63. Piatelli, M. 1976b. Betalains. In: Goodwin, T.W., Ed. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Vol. 1. Academic Press, New York. pp. 560-596.
64. Trezzini, G. F. and Zrýd, J.P. 1991. Characterization of some natural and semi-synthetic betaxanthins. *Phytochemistry*, 30(6). pp. 1901-1903.
65. Reynoso, R. García, F.A. Morales, D., and González de Mejía, E. 1997. Stability of Betalain Pigments from a Cactacea Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 45. pp. 2884-2889.
66. Vereltzis, K. Buck, E. 1984. Color stability and sensory attributes of chicken frankfurters made with betalains and potassium sorbate versus sodium nitrite. *Journal of Food Protection*. (Ames, Iowa: International Association of Milk, Food, and Environmental Sanitarians), 47 (1) pp. 41-45.

67. Stintzing, F.C. and Carle, R. 2006. Cactus fruits-more than color. *Fruit Processing*, 16. pp. 166-171.
68. Stintzing, F.C. and Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15. pp. 19-38.
69. Fennema Owen R. 1993. *Química de los alimentos*. Acribia S.A. Cap. 8. pp. 222, 640, 641, 648, 650, 653, 655.
70. Santos, S.E. 1983. Estudio de los colorantes de betabel (*Beta vulgaris* L.). *Rev.Soc. Química. México*. 27, (4), Agosto. pp. 175-183.
71. Cai, Y. Z., Sun, M., Schliemann, W., Corke, H. 2001. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigment from *Celosia argentea*. *J. Agric. Food Chem.* 49. pp. 4429-4435.
72. Pedreño, M.A., Escribano, J. 2001. Correlation between antiradical activity and stability of betanin from *Beta Vulgaris* L. roots under different pH, temperature and light condition. *J. Sci. Food Agric.* 81. pp. 627-231.
73. Castellar, R., Obón, J.M., Alacid, M. and Fernandez, J.A., 2003. Color Properties and Stability of Betacyanins from *Opuntia* Fruits. *J. Agric. Food chem.* 51. pp. 2772-2776.
74. Herbach, K. M., Stintzing, F.C. and Carle R. 2004. Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J. Food Sci.* 69. pp. 491-498.
75. Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M., and Livrea, M.A. 2005. Distribution of Betalains Pigments in Red Blood Cells After Consumption of Cactus Pear Fruits and Increased Resistance of the Cells to ex vivo Induced Oxidative Hemolysis Humans. *J. Agric. Food Chem.*, 53. pp. 1266-1270.
76. Von Elbe, J.H. 1975. Stability of Betalains as Food Colors. *Food Technol.* 29. Pag. 42-46.
77. Jackman, R.L. and Smith, J.L. 1996. Anthocyanins and betalains. In G.F. Hendry, and J.D. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants*. pp. 244-309. London: Blackie Academic and Professional.

78. Rayner, P.B. 1993. Food and drink colors from natural sources, *Food Marketing Technol.* 7(1). pp. 9-10.
79. Von Elbe, J.H. 1977. In *Current Aspects of Food Colorants*, Furia. T., Ed, CRC Press, Cleveland, OH. pp. 29-39.
80. Schwartz, S. J., and Von Elbe, J.H. 1983. Identification of betanin degradation products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 176. pp. 448-453.
81. Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Elss, S., Preston, C., Schreier, P., & Carle, R. 2006. Isotope ratio mass spectrometrical analysis of betanin and isobetanin isolates for authenticity evaluation of purple pitaya-based products. *Food Chemistry*, 99. pp. 204-209.
82. Florian, C. Stintzing., Reinhold C. 2007. Betalains-emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology* 18. pp. 514-525.
83. Huang, A.S. and Von Elbe, J. H. 1987. Effect of pH on the Degradation and Regeneration of Betanin. *J. Food Sci*, 52. pp. 1689-1693.
84. Havlíková, L. Míková, K. Kyzlink, V. 1983. Heat stability of betacyanins. *Z Lebensm Unters Forsch* 177: 247-50.
85. Drdák, M. and Vallová, M. 1990. Kinetics of the thermal degradation of betanin, *die Nahrung*, 34. pp. 307-310.
86. Von Elbe, JH., Maing, IY., Amundson, CH. 1974. Colour Stability of betanin. *J Food Sci* 39: 334-7.
87. Saguy, I., Kopelman, IJ., Mizrahi, S., 1978. Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. *J Agric Food Chem* 26: 360-2.
88. Bilyk, A., Kolodij, M.A., Sapers G.M. 1981. Stabilization of red beet pigments with isoascorbic acid. *J Food Sci* 46: 1616-7.
89. Cai, Y., Sun, M., Corke, H. 1998. Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. *J Agric Food Chem* 46: 4491-5.
90. Attoe EL. and von Elbe JH. 1981. Photochemical degradation of betanin and selected anthocyanins. *J Food Sci* 46: 1934-7.
91. Huang, AS. and Von Elbe, JH. 1986. Stability comparison of two betacyanin pigments – Amaranthine and betanin. *J Food Sci* 51:670-4.

92. Attoe, EL. and Von Elbe, JH. 1985. Oxygen Involvement in Betanine Degradation: Effect of antioxidants. *J. Food Sci.*, 50:106.
93. Attoe, EL. and Von Elbe, JH. 1982. Degradation Kinetics of betanine in solutions as influenced by oxygen. *J Food Sci* 46: 1934-7.
94. Máriássyová M. and Silhár S. 2000. Conversion of betalains in the presence of antioxidants. *Czech J Food Sci* 18: 220-1.
95. Pasch, JH. and Von Elbe, JH. 1979. Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. *J Food Sci* 44:72-4.
96. Savolainen, K. and Kuusi, T. 1978. The stability properties of golden beet and red beet pigments: influence of pH, temperature, and some stabilizers. *Z Lebensm Unters Forsch* 166:19-22.
97. Tecnología de alimentos, Tema 6: Escaldado y pelado al vapor. En:
<http://www.ual.es/~jfernand/TA/Tema6/Tema6-EscaldadoyPV.pdf>
98. Wasserman, BP. and Guilfooy, MP. 1984. Peroxidase properties of betanin decolorization by cell walls of red beet. *Phytochemistry* 22: 2653-6.
99. Parkin, KL and Im, JS. 1990. Chemical and physical changes in beet (*Beta vulgaris* L.) root tissue during simulated processing-Relevance of the "black ring" defect in canned beets. *J Food Sci* 55:1039-41.
100. García, A.M. 1971. *Patología vegetal practica*. Limusa-Wiley (Edit.). 1ª. Edición. pp. 9-12; 67-70.
101. En: http://es.wikipedia.org/wiki/Beta_vulgaris.
102. En:
http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/flora/beta_bel/betabel.htm.
103. Ibarz Albert and Barbosa-Cánovas Gustavo V. 2005. Operaciones unitarias en la Ingeniería de Alimentos. Colección, Tecnología de alimentos, ediciones Mundi-Prensa México, s.a. de C.V., pp. 815-816.
104. En: www.uam.es/personal_pdi/ciencias/.../Intercambioionico2006.pdf

105. Ing. Joseph A. Avilla, Lo Esencial Acerca del Intercambio Iónico, En:
www.agualatinoamerica.com/docs/pdf/5-6-02avilla.pdf
106. Pourrat, A., Lejeune, B., Grand, A., and Pourrat, H. 1988. Betalains assay of fermented red beet root extract by high performance liquid chromatography, *J. Food Sci.*, 53 (1), pp. 294-295.
107. Wiley, R. and Ya-Nien-Lee. 1977. Recovery of Betalaines from red beets by a diffusion-extraction procedure. Food Science Program, dept. of Horticulure, University of Maryland, College Park.
108. Alemán, H., Becerra, F.J., Contreras, J.L., Gonzales, J.M., Plata, O., Reyes, A., Trejo, M., 1996. Obtención del colorante rojo a partir de betabel. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. pp. 27-33.
109. Brinker, C.J. and Scherer, G.W. 1990. in *Sol-Gel Science, The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic, New York.
110. Bradley, D.C., Mehrotra, R.C., and Gaur, D.P. 1978. *Metal alkoxides*. Edit. Academic Press Inc. 1er edición. pp.175-183.
111. Zamora García, I.R. Los alcoxidos de Silicio. Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. En:

<http://quimica.ugto.mx/revista/6/alcoxidos.htm>
112. En:
http://timedomaincvd.com/CVD_Fundamentals/films/TEOS_O2_thermal.html
113. En: www.profelog.es/jose/wp-content/.../Emilio_Marin_SiO2.pdf
114. Callister, W. 1996. *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. Departamento de Ciencias e Ingeniería de Materiales, Universidad de Utah. Edit. Reverté, S.A. pp. 388-399.
115. Araujo-Andrade, G., Ortega-Zarzosa, S., Ponce-Castañeda y Martínez, J.R., 2000. Análisis de las reacciones de hidrólisis y condensación en muestras de sílica xerogeles usando espectroscopía infrarroja. Facultad de

- Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Revista Mexicana de Física 46(6), pp. 593-597.
116. Stermitz Weininger, 1988. Química Orgánica. Cap. 18, Reacciones de condensación aldólica: Enoles y enoloatos. Edit. Reverté, S.A. Barcelona. pp. 728-730.
117. Díaz Abril, N., Bárcena Ruiz, A., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Toribio Meléndez-Valdes, F., Túnez Fiñana, I. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. pp. 1-8. En:
www.uco.es/organiza/departamentos/.../08_ESPECTROFOTOMETRÍA.pdf
118. McMurry John, 2005. Química Orgánica. 5ta, Ed. International Thomson (Edit). pp. 522-547.
119. Douglas, A. Skoog., James, F. Holler., Timothy, A., Nieman. 2000. Principios de Analisis Instrumental. Quinta Edicion. Edit. Mc Graw Hill. pp.353-481.
120. En:
http://www.rohmhaas.com/assets/attachments/business/ier/ier_for_industrial_water_treatment/amberlite_ira958_cl/tds/amberlite_ira958_cl.pdf
121. Nilson T 1970. Studies into the pigments in beetroot (Beta vulgaris L. ssp. Vulgaris var. Rubra L.) Lantbrukshog, Ann. 36. Pag. 179-219.
122. En: www.lacie.com/download/.../wp_colormanagement_es.pdf
123. Llano, B., Marín, J.M., Restrepo, G., Rios, L.A. 2007. Síntesis, caracterización y evaluación fotocatalítica de óxidos mixtos Titanio-Silicio. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia, XIII, 036. Pp319-324.
124. Slawomir Wybraniec., Nowak-Wydra, Barbara., Katarzyna Mitka., Kowalski Piotr., Mizrahi Yosef. 2007. Minor betalains in fruits of Hylocereus species. Phytochemistry 68. Pp. 251-259.

Bibliografía

125. Stintzing, F.C., Conrad, J., Klaiber, I., Beifuss, U., Carle, Reinhold. 2004. Structural investigations on betacyanin pigments by LC NMR and 2D NMR spectroscopy. *Phytochemistry* 65. pp. 415-422.
126. Loera Serna Sandra. 2005. Captura de betalaínas por HDL y alúminas. Trabajo recepcional. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.