

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD QUERETARO

**Estudio comparativo del colorante natural betalaína
estabilizado, obtenido de productos naturales de la región**

Tesis que presenta

Ing. Karla Adriana Morales Vázquez

para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias

en la Especialidad de

Materiales



Directores de tesis: Dr. Juan Francisco Pérez Robles
Dra. Miriam Rocío Estévez González

Santiago de Querétaro, Qro.

Agosto de 2012

Case No. CQ 00186
Date Filed CQ-209-SS1
Date Filed 21-01-2013
Date Filed 02-01-2013
\$

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un procedimiento de extracción y estabilización del colorante betalaína utilizando partículas cerámicas para aumentar su resistencia a los distintos factores que le afectan, este colorante se extrajo de dos fuentes naturales de betalaína, una de ellas es el betabel, el cual es la principal fuente de obtención de betalaína en la industria alimenticia actual, es aplicado principalmente en gelatinas. También se trabajó con el fruto del garambullo, un producto que se obtiene de una planta llamada *Myrtillocactus geometrizans* que se produce principalmente en la región del Bajío considerando su mayor producción en los estados de Querétaro, San Luis Potosí y Guanajuato.

La metodología del proceso consistió en la extracción del colorante, estabilización, retiro de azúcares, centrifugación y liofilización para la obtención del colorante en polvo. Dentro de las pruebas que fueron realizadas incluyen la estabilidad a la luz UV, estabilidad a la temperatura, estabilidad al pH, azúcares reductores, cuantificación de polifenoles totales, cuantificación de antioxidantes, colorimetría $L^*a^*b^*$, potencial ζ , dispersión de luz dinámica y espectroscopia de impedancia electroquímica, todo esto para realizar un comparativo del sistema antes y después del procedimiento realizado y así observar las mejoras realizadas por la modificación química de la molécula de betalaína.

A todo esto se observó que el colorante estabilizado tenía importantes mejoras con respecto al colorante en su forma natural, aumentando la probabilidad de su aplicación en la industria alimenticia.

ABSTRACT

In the present work an extraction procedure and stabilization of the dye betalain was developed using ceramic particles to increase its resistance to the various factors that affect it. The dye was extracted from two natural sources of betalain, one of them is the sugar beet, which is the main source of betalain in the current food industry, and the pigment is mainly used in gelatin. Also worked with the fruit of the garambullo, a product that is obtained from a plant called *Myrtillocactus geometrizans* that occurs mainly in the region of Bajío considering their higher production from the states of Querétaro, San Luis Potosí and Guanajuato.

The methodology of the process consisted in the extraction of colorant, stabilization, removal of sugars, centrifugation and freeze drying for obtaining the colorant powder for testing. The tests that were carried out include the stability to UV light, temperature stability, stability to pH, sugars, quantification of total polyphenols, antioxidants quantification, Colorimetry the $L^*a^*b^*$, ζ potential, dynamic light scattering and electrochemical impedance spectroscopy, all those to make a comparison of the system before and after the procedure performed and thus observe the improvements made by the chemical modification of the betalain molecule.

All those, showed an stabilization of the dye that had significant improvements with respect to the dye in its natural form, the benefits of its application in the food industry.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES por ser apoyo y sustento, por darme amor y no dejarme caer ante todo, siempre han sido parte de mi vida y nunca dejará de ser así, cada logro que he tenido es gracias a ellos y porque todavía falta más seguiré eternamente agradecida por todo lo que me han dado.

A MI HERMANO por ser una inspiración para mí, que siempre me ha llenado de ganas de superarme y seguir adelante con mis planes.

A MI TÍA DOLORES por estar ahí cuando la necesito y por ser parte de mi familia y estar conmigo en todos mis logros a lo largo de mi vida.

A MIS ABUELOS que a pesar de ya no estar conmigo me cuidan desde el cielo y porque algún día nos volveremos a ver, esto también es por ellos.

A ALEJANDRO por su apoyo y aliento en los momentos difíciles, porque siempre me has apoyado a lo largo de esta parte de mi vida, gracias por ser parte de ello.

AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL UNIDAD QUERÉTARO por la oportunidad de realizar el posgrado y la facilidad para el uso de laboratorios y equipos.

AL CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA por las facilidades otorgadas para el análisis de muestras y desarrollo de tesis.

A MI ASESORA Dra. Miriam Rocío Estevez Gonzalez por todo su apoyo, conocimientos y amistad brindada durante el desarrollo de esta tesis

A MI ASESOR Dr. Juan Francisco Pérez Robles por su orientación, asesoría y apoyo durante estos dos años de maestría.

A MIS SINODALES Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas por sus consejos, revisión y aporte al contenido de esta tesis, así como al Dr. Gabriel Luna Bárcenas por el apoyo, revisión y consejos otorgados.

LUZ MA REYNA AVILÉS ARELLANO por el apoyo en el manejo de equipos y en el desarrollo de técnicas en el laboratorio.

AL CINVESTAV UNIDAD QUERÉTARO por la oportunidad de realizar el posgrado y la facilidad para el uso de laboratorios y equipos.

AL CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA por las facilidades otorgadas para el análisis de muestras y desarrollo de tesis.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA por la beca otorgada en el periodo conformado de 1 de septiembre de 2010 a 30 de agosto de 2012.

AL CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL ESTADO DE QUERÉTARO por el apoyo otorgado para la asistencia al congreso de AMIDIQ

A MIS AMIGOS Rodrigo, Arely, Lilia Irene, Irving César, Alejandra, Iker, Lupita, Rodrigo, Carlitos, Ildefonso, Andrés, Adriana y todos aquellos que en este momento no llego a mencionar pero que agradezco su apoyo y tantos momentos de tensión juntos.

ÍNDICE

RESUMEN.	i
ABSTRACT.	ii
AGRADECIMIENTOS.	iii
INDICE.	v
INDICE DE TABLAS.	vii
INDICE DE FIGURAS.	ix
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	3
2.1 Pigmentos.	3
2.1.1 Pigmentos sintéticos y naturales.	4
2.1.1.1 Pigmentos sintéticos.	5
2.1.1.2 Pigmentos naturales.	7
III. MARCO TEÓRICO.	10
3.1 Colorantes naturales.	10
3.1.1 Carotenoides.	11
3.1.2 Clorofilas.	12
3.1.3 Pigmentos Fenólicos.	13
3.1.4 Taninos.	16
3.1.5 Hemopigmentos.	17
3.1.6 Ácido Carmínico.	17
3.1.7 Betalainas.	19
3.2 Productos de extracción de betalainas.	25
3.2.1 Betabel.	26
3.2.2 Garambullo.	27
IV. GENERALIDADES.	29
4.1 Resinas de intercambio iónico.	29
4.2 Estabilización.	30
4.3 TEOS (óxido de silicio).	30



4.3.1	Reacción de hidrólisis.	32
4.4	Secado por congelación (Liofilización).	32
4.5	Técnicas de Caracterización.	33
4.5.1	Azúcares reductores.	33
4.5.2	Antioxidantes.	35
4.5.3	Compuestos Fenólicos.	36
4.5.4	Espectroscopía UV.	36
4.5.5	Color.	37
4.5.6	Teoría de doble capa.	38
4.5.7	Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.	41
4.5.8	Dispersión de Luz Dinámica.	43
V.	JUSTIFICACIÓN.	44
VI.	OBJETIVOS.	45
6.1	Objetivo General.	45
6.2	Objetivos Específicos.	45
VII.	METODOLOGÍA.	46
7.1	Proceso de estabilización del colorante.	46
7.1.1	Extracción.	47
7.1.2	Reacción de Estabilización.	47
7.1.3	Centrifugación.	48
7.1.4	Retención de azúcar.	48
7.1.5	Liofilización.	49
7.2	Colorimetría.	50
7.3	Pruebas de estabilidad a luz UV.	51
7.4	Pruebas de estabilidad a la temperatura.	52
7.5	Pruebas de estabilidad al pH.	52
7.6	Cuantificación de color rojo, Betanina.	52
7.7	Cuantificación de azúcares reductores.	53
7.8	Cuantificación de los polifenoles totales.	54
7.9	Medición de la actividad antioxidante (DPPH).	55

7.10 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.	56
7.11 Dispersión de Luz Dinámica.	57
7.12 Potencial ζ	57
7.13 Análisis Estadístico.	57
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	58
8.1 Colorimetría.	58
8.2 Prueba de estabilidad a la luz UV.	60
8.3 Prueba de estabilidad al pH.	62
8.4 Prueba de estabilidad a la temperatura.	64
8.4.1 Prueba de estabilidad a la temperatura a 50°C. .	64
8.4.2 Prueba de estabilidad a la temperatura a 80°C. .	66
8.5 Cuantificación de color rojo, Betanina.	69
8.6 Cuantificación de azúcares reductores.	69
8.7 Cuantificación de polifenoles totales.	71
8.8 Medición de la actividad antioxidante.	72
8.9 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica.	74
8.10 Dispersión de Luz Dinámica.	75
8.11 Potencial ζ	76
IX. CONCLUSIONES.	78
X. BIBLIOGRAFÍA.	81



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Especificaciones para el uso de pigmentos sintéticos en México. ...	6
Tabla 2.2 Algunos pigmentos exentos de certificación por la FDA.	8
Tabla 2.3 Pigmentos autorizados por la Unión Europea para su uso en alimentos.	9
Tabla 3.1 Principales sustituyentes identificados en betalaínas naturales.	22
Tabla 7.1 Concentraciones para la curva estándar de compuestos fenólicos. ..	55
Tabla 7.2 Concentraciones para curva estándar de Actividad antioxidante.	56
Tabla 8.1 Promedio de datos obtenidos de color.	58
Tabla 8.2 Promedio de datos obtenidos de color.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Diferencias químicas de los carotenoides.	12
Figura 3.2 Estructura de clorofilas a y b.	13
Figura 3.3 Estructura del grupo flavilo.	14
Figura 3.4 Estructura general de las antocianinas.	16
Figura 3.5 Estructura de los ácidos gálico y elágico.	17
Figura 3.6 Ácido carmínico.	18
Figura 3.7 Estructura básica de las betacianinas (a) y betaxantinas (c) y el ácido betalámico, (b) como estructura básica de construcción de las moléculas.	21
Figura 3.8 Patrones de degradación de la betanina.	24
Figura 4.1 Representación esquemática de la sílice.	31
Figura 4.2 Reducción del DPPH por el antioxidante [35].	36
Figura 4.3 Parámetros utilizados para la descripción del color, en 1: rojo-verde (a^*), amarillo-azul (b^*), ángulo de color (h°) ; 2: brillantes (L^*) y saturación (C^*) [38].	39
Figura 4.4 Modelo de la doble capa eléctrica de Helmholtz y Gouy-Chapman.	41
Figura 4.5 Estimación de los parámetros de circuito de un espectro de Nyquist.	43
Figura 7.1 Diagrama de flujo de estabilización del colorante.	46
Figura 7.2 Reacción de estabilización del colorante.	48
Figura 7.3 Sistema de extracción de azúcar.	49
Figura 7.4 Equipo de Liofilización.	50
Figura 7.5 Equipo Hunter $L^*a^*b^*$	51
Figura 7.6 Radiación de la muestra.	51
Figura 7.7 Adición y registro de pH de la muestra.	52
Figura 7.8 Prueba de análisis de azúcares reductores.	54
Figura 8.1. a) Gráfico de color a^* , b^* y b) Gráfico de Luminosidad.	59
Figura 8.2 Gráfico de color Tono – Cromaticidad.	60
Figura 8.3 Efecto de la radiación UV a) betabel natural b) betabel	



estabilizado.	61
Figura 8.4 Efecto de la radiación UV a) garambullo natural, b) garambullo estabilizado.	61
Figura 8.5. Cambio de pH a lo largo de la prueba.	62
Figura 8.6. Cambio de espectro de absorbancia con respecto al pH de a) betabel natural, b) betabel estabilizado.	63
Figura 8.7. Cambio de espectro de absorbancia con respecto al pH de a) garambullo natural, b) garambullo estabilizado.	63
Figura 8.8. Efecto de una temperatura a 50°C sobre el colorante natural del betabel a) recién calentado, b) temperatura ambiente y betabel estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.	65
Figura 8.9. Efecto de una temperatura a 50°C el colorante natural del garambullo a) recién calentado, b) temperatura ambiente y garambullo estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.	66
Figura 8.10. Efecto de una temperatura a 80°C sobre el betabel natural a) recién calentado, b) temperatura ambiente y betabel estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.	67
Figura 8.11. Efecto de una temperatura a 80°C sobre el garambullo natural a) recién calentado, b) temperatura ambiente y garambullo estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.	68
Figura 8.12. Gráfico comparativo de la cantidad de color rojo (betanina) en las muestras.	69
Figura 8.13. Gráfico comparativo de la cantidad de azúcar en las muestras.	70
Figura 8.14. Color obtenido del licor de fehling de las muestras después del análisis de azúcares reductores a) betabel natural, b) betabel estabilizado, c) garambullo natural, d) garambullo estabilizado.	71
Figura 8.15. Curva de calibración de ácido gálico.	71
Figura 8.16. Cantidad de polifenoles por muestra.	72
Figura 8.17. Curva estándar de ácido ascórbico.	73
Figura 8.18. Cantidad de antioxidantes por muestra.	74



Figura 8.19. Espectro de nyquist de solución de betalaína.	75
Figura 8.20 Gráfico comparativo de tamaño de partícula.	76
Figura 8.21 Gráfico comparativo de potencial ζ	77

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los factores más importantes en un alimento son los colores que presentan y que les otorgan un atractivo especial para los consumidores. Este factor de aceptación se ve en la mayoría de las ocasiones modificado durante el procesado de los alimentos debido a los diferentes tratamientos a los que se ve sometido (tales como escaldado, esterilización, cocción, etc.). Debido a esto se hace necesario en ocasiones el reforzar el color de los alimentos adicionando colorantes que incrementen su atractivo perdido.

Desde hace mucho tiempo en la industria de los alimentos se han venido utilizando colorantes de diversos tipos y procedencias. En los primeros intentos por dar color a los alimentos se utilizaron colorantes de origen “natural” (minerales y vegetales), posteriormente con el avance de la tecnología se fueron desarrollando colorantes “sintéticos” que por sus características de estabilidad a los procesos, poco a poco fueron desplazando a los de origen natural.

En la actualidad, todas las tendencias indican que la preferencia de los consumidores, están dirigidas hacia aquellos productos que contengan en su formulación la menor cantidad de ingredientes y aditivos sintéticos, sin embargo la industria alimentaria requiere, entre muchos otros productos, de estos colorantes los cuales en la mayoría de los casos (para nuestro país) son de importación y algunos de ellos están prohibidos por la legalización alimentaria ya que pueden ser nocivos para la salud del consumidor.

Es por esto que surge la alternativa de utilizar una vez más fuentes naturales de colorantes. Una de estas alternativas es la utilización de frutos como el betabel y el garambullo que como fuente de colorantes puede sustituir alguno de los anteriormente mencionados, debido a sus atractivos colores rojo y púrpura-rojizo.



Para este trabajo se cuenta con diversos capítulos donde se podrá observar la importancia de la investigación y la mejora de los colorantes, empezando por el **Capítulo II** donde se habla del color y su importancia en la vida de las personas, así como de los colorantes que se utilizan actualmente y las normatividades que existen en Estados Unidos, México y Europa.

En el **Capítulo III** se encuentra todo lo relacionado a los colorantes tanto sintéticos como naturales, su clasificación y factores importantes de cada uno de los colorantes, también se explica el uso, factores que lo afectan y como se encuentran conformadas las betalaínas, así como la referencia a los productos utilizados para la extracción del colorante.

Una vez establecidos los conceptos para la fundamentación del proyecto en el **Capítulo IV** se manejan las generalidades técnicas de las distintas pruebas, así como de partes del proceso de estabilización del colorante, como el intercambio iónico y el método de estabilización empleado. Dentro de las técnicas que se manejan se habla de la espectroscopia UV-Vis, colorimetría $L^*a^*b^*$, antioxidantes, compuestos fenólicos, azúcares reductores, dispersión de luz dinámica, espectroscopia de impedancia electroquímica y potencial ζ .

En el **Capítulo V** se encuentra la justificación del trabajo así como en el **Capítulo VI** se tienen los objetivos general y específicos del proyecto, esto lleva al **Capítulo VII** donde se describe la parte experimental, en el que se describen los materiales y metodologías empleadas durante la investigación. Llegando al **Capítulo VIII** se presenta el análisis y discusión de los resultados obtenidos a lo largo de todo el proceso del proyecto para poder en el **Capítulo IX** realizar las conclusiones a las que se llegó durante todo el trabajo.

II. ANTECEDENTES

El color es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de la luz y que, por lo tanto, puede medirse físicamente en términos de energía radiante o intensidad, y por su longitud de onda. El ojo humano sólo puede percibirlo cuando su energía corresponde a una longitud de onda que oscila entre 380 y 780 nm; de ahí que una definición de color sea “La parte de la energía radiante que el humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo”

La calidad de un alimento, sin tomar en cuenta los aspectos sanitarios, toxicológicos y nutricionales, se basa en los siguientes parámetros: color, sabor, olor y textura. Sin embargo, el primer acercamiento del consumidor al alimento es por su color ya que se relaciona lo adecuado con la aceptación o el rechazo [3]. En algunos alimentos, el color es el resultado del conjunto de características físicas y de los compuestos pigmentantes.

Los colores de los alimentos se deben a diferentes compuestos, principalmente orgánicos, algunos de los cuales se producen durante su manejo y procesamiento, como es el caso del color que se desarrolla debido a las reacciones de Maillard, a la caramelización o a los pigmentos sintetizados o modificados por procesos de fermentación [3]. Sin embargo, la mayoría de los alimentos deben su color a las sustancias pigmentantes que contienen o se añaden [19].

2.1 Pigmentos

Los pigmentos además de proporcionar color en frutas y hortalizas, pueden brindar efectos positivos en la salud. Muchos carotenoides han mostrado actividad antioxidante y algunos de ellos poseen actividad de vitamina A como el licopeno [11]. Algunos flavonoides han sido asociados a la reducción y/o prevención de varias enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer [11]. Por otro lado, los pigmentos

de plantas y hortalizas, han estimulado el interés por estudiar su aplicación en alimentos y cosméticos, ya que se ha descubierto que el uso de colorantes sintéticos, provocan daño a la ecología y salud humana [5]. Desde 1979 más de 700 colorantes sintéticos han sido vetados por organizaciones como la Agencia de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), permitiendo hoy en día el uso de solo 36 colorantes, de los cuales, siete son sintéticos y 26 naturales [5].

2.1.1 Pigmentos sintéticos y naturales.

La industria de los pigmentos es una de las de mayor volumen de ventas a nivel mundial se producen 700 toneladas/año de pigmentos naturales y sintéticos. El mercado mundial de pigmentos sintéticos representa un volumen de ventas de 400 millones de dólares/año, de los cuales el 50% se dirige a la industria textil y 25% a la industria alimentaria.

Según la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos), un aditivo es un material que se añade de manera intencionada, por lo general en cantidades pequeñas, a otra sustancia para mejorar su apariencia, sabor, color o estabilidad. De acuerdo con la misma agencia, un pigmento es cualquier material que imparte color a otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar, extraída o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad, a partir de un vegetal, animal, mineral u otra fuente y que cuando es añadida o aplicada a alimentos, medicamentos o cosméticos, es capaz de impartir color por si misma [51].

Los pigmentos se pueden dividir en sintéticos y naturales. Los sintéticos requieren de una certificación; incluyen sustancias químicas sintetizadas con alto grado de pureza. Los principales son: [50]

- Azoicos: su estructura es de mono, di o triazo. Producen casi todos los colores, se caracterizan por tener un grupo cromóforo $-N=N-$. Los de más venta son los amarillos 5 y 6, los rojos 2, 4 y 40, y el naranja B.

- Antraquinonas: su estructura es uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados, tienen al menos tres anillos condensados.

2.1.1.1 Pigmentos sintéticos

Debido a la preocupación por la seguridad en el uso de pigmentos sintéticos, éstos se han estudiado exhaustivamente con respecto a su efecto sobre la salud. Aunque a la mayoría se les han atribuido daños en el comportamiento conductual de los niños, este hecho no se ha comprobado, pero aún queda duda sobre su posible participación en otras alteraciones en la salud. Por esto se ha reducido cada vez más su uso en alimentos, aunque los aspectos de legislación varían ampliamente entre bloques comerciales y países dentro de cada bloque. En Europa y Japón, la demanda de pigmentos sintéticos ha disminuido, aunque en el resto del mundo ha aumentado (2 a 3% al año). En general, en alimentos sólo se aceptan nueve pigmentos sintéticos, con severas restricciones en su uso. Estos son: [31]

- Tartracina: autorizado para utilizarlo en más de sesenta países, incluidos Estados Unidos y la Unión Europea. Es ampliamente utilizado en repostería, galletas, productos cárnicos, sopas instantáneas vegetales en conserva, helados, caramelos y bebidas no alcohólicas, y como adulterante en platillos como la paella, en lugar de azafrán. Puede producir alergia en el 10% de los consumidores.
- Amarillo anaranjado S: se utiliza para bebidas no alcohólicas, helados, caramelos, botanas y postres, entre otros. En Europa no se autoriza en conservas.
- Azorrubina: no autorizado por Estados Unidos, pero sí en Europa; se emplea principalmente en caramelos.
- Rojo Ponceau: se emplea para producir el color fresa de caramelos y productos de repostería, así como en productos cárnicos en lugar de pimientón.

- Negro brillante: no se autoriza su uso en Estados Unidos, Canadá ni Japón, pero sí en Europa, en donde se emplea para productos de imitación de caviar.
- Amarillo quinoleína: no se autoriza en Estados Unidos, Canadá y Japón, pero si en la Unión Europea para su uso en bebidas de naranja, bebidas alcohólicas, repostería, conservas vegetales, helados y productos cárnicos, entre otros.
- Eritrosina: muy usado en productos lácteos con sabor a fresa, en mermeladas, caramelos y productos cárnicos. Debido a su alto contenido e yodo, puede ser nocivo por su acción sobre la tiroides, por lo que en Europa no está autorizado para alimentos dirigidos a niños.
- Indigotina: autorizado en todo el mundo, se emplea en bebidas no alcohólicas, caramelos, confitería y helados.
- Azul V: se utiliza en conservas vegetales, mermeladas, repostería, caramelos y bebidas para lograr tonos verdes al combinarlo con colorantes amarillos.

Los pigmentos sintéticos tienen las siguientes ventajas: firmeza de color; amplio intervalo de tinte, bajo costo, alta efectividad, homogeneidad entre lotes y no presentan aromas o sabores. Según la Secretaría de Salud de México, las especificaciones para el uso de pigmentos sintéticos son las mostradas en la tabla 2.1:

Tabla 2.1 Especificaciones para el uso de pigmentos sintéticos en México [6]

Nombre Oficial	Clasificación Química	Color	Usos
Rojo 3 Eritrosina	Xantana	Rosa-azul	Salsas, bebidas carbonatadas, pan, cereales, emulsiones aceite/agua.
Rojo 40	Monoazo	Rojo-amarillo	Gelatinas, salsas, bebidas carbonatadas, bebidas en polvo, confitería, pan y cereales.

Continuación Tabla 2.1			
Amarillo 5 Tartrazina	Piroazolona	Verde-amarillo	Gelatinas, bebidas en polvo, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Azul 1	Trifenilmetano	Verde-azul	Bebidas carbonatadas, bebidas en polvo, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Azul5	Índigo	Azul intenso	Confitería, gelatinas, emulsiones aceite/agua.
Verde 3	Trifenilmetano	Verde-azul	Gelatinas, bebidas en polvo, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite/agua.
Naranja B	Pirazolona	Rojo-amarillo	Helados

2.1.1.2 Pigmentos naturales

Los pigmentos naturales son generados por microorganismos, vegetales, animales o minerales. El mercado mundial de pigmentos naturales representa 940 millones de dólares al año en ventas, debido a la preocupación del consumidor por el consumo de productos que no alteren o ayuden a su salud, crece alrededor de 4% al año [7]. Sin embargo, la palabra “natural” no tiene connotación legal, no significa que el color del que se trate sea propio del producto farmacéutico, alimentario o cosmético. Así, casi todos los colores en alimentos son añadidos y por tanto no son naturales. Los pigmentos naturales son aquellos obtenidos de fuentes presentes en la naturaleza, usados para impartir color a algunos productos. Son sujetos a las mismas pruebas de calidad y seguridad toxicológica que los sintéticos, pero la FDA y otras agencias gubernamentales no requieren que se certifique su pureza química, y por tanto se refiere a ellos como aditivos de color no certificados; sin embargo, algunos de estos

pigmentos sí están sujetos a restricciones en su uso, como el nivel máximo permitido o el uso en animales y/o humanos. En la tabla 2.2 se listan algunos pigmentos exentos de certificación por la FDA.

Tabla 2.2 Algunos pigmentos exentos de certificación por la FDA [6]

Aceite de endospermo de maíz (solo alimento para aves).	Extracto de color uva (enocianina) (sólo para alimentos, no bebidas)
Aceite de zanahoria	Glutamato de hierro
Ácido carmínico (extracto de cochinilla)	Harina de algas secas (sólo para alimento de aves)
Aceite de semilla de algodón desgrasado	Harina de semilla de algodón parcialmente tostada
Azafrán	Jugo de frutas
Azul ultramarino (sólo para alimento animal)	Jugo de vegetales
β -apo-8-carotenal	Oleoresina de paprika
β -caroteno	Oleoresina turmérica
Betabel deshidratado	Óxido ferroso (sólo para alimento animal)
Cantaxantina	Paprika y oleoresina de paprika
Color caramelo	Riboflavina
Dióxido de titanio	Tagetes erecta (cempasúchil) extracto y harina (sólo para alimento animal)
Extracto de anato (achiote)	
Extracto de cáscara de uva (sólo para bebidas)	

Por su parte, la Unión Europea autoriza el uso de los pigmentos listados en la tabla 2.3, entre los que se encuentran algunos sintéticos.

Aluminio (sólo en superficies)	Eritrosina
Amaranto	Éster etílico del ácido β -apo-8'-carotenal
Amarillo de quinoleína	Extracto de pimentón
Amarillo ocase FCF	Indigotina
Antocianinas	Licopeno
Azorrubina	Litorrubina
Azul V	Luteína
β -apo-8'-carotenal	Marrón FK
Bixina	Marrón HT
Cantaxantina	Negro brillante BN
Carbón vegetal	Oro (sólo en superficies)
Caramelo amónico	Óxidos e hidróxidos de hierro (sólo en superficies)
Caramelo natural	Plata (sólo en superficies)
Caramelo de sulfito cáustico	Riboflavinas
Caramelo de sulfito amoniaco	Rojo altura AC
Carbonato de calcio (sólo superficies)	Rojo de remolacha
Carotenos	Rojo Ponceau 4R
Clorofilas y sus complejo cúpricos	Rojo 2G
Curcumina	Tartracina
Dióxido de titanio (sólo en superficies)	Verde S

La Secretaría de Salud de México reporta que, aunque no requieren certificación, deben cumplir con las siguientes especificaciones químicas y toxicológicas:

- No deben tener más de 3 mg de arsénico/kg.
- No deben tener más de 10 mg de plomo/kg.
- Máximo contenido de mercurio: 1mg/kg.
- En su desecación debe de haber menos de 0.2% de pérdidas.
- Ser analizable por espectrofotometría de absorción y cromatografías.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Colorantes naturales

Los colorantes naturales difieren ampliamente en su estructura química y en su origen. Aunque hay colorantes poco comunes, como el ácido carmínico, los más distribuidos en los alimentos pueden agruparse en distintas categorías:

1. Carotenoides.
2. Clorofilas.
3. Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos.
4. Betalaínas.
5. Hemopigmentos.

Los cuatro primeros son de fuentes vegetales, aún cuando llegan a estar presentes en alimentos de origen animal, a los que ingresan a través de la dieta. La mayoría de los pigmentos vegetales se localiza en el protoplasma de las células, dentro de los organelos especializados llamados plástidos, que se observan al microscopio formando pequeñas placas o agujas de estructura cristalina, en algunos casos, cuando son solubles en agua, se encuentran disueltos en las vacuolas de las células.

El quinto grupo sólo se encuentra en productos de origen animal. En el sexto grupo se incluyen pigmentos que imparten color tanto a los tejidos vegetales como animales. Son poco abundantes en la naturaleza, pero no por eso menos importantes, debido a las características específicas de cada uno.

Es necesario indicar que la estructura química determina propiedades de los pigmentos que van más allá del color, aunque ésta sea su característica evidente. La estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento; su reactividad con otros compuestos químicos para determinar tanto el color como la durabilidad o cambio de éste; su posible toxicidad, por lo que es necesario en algunos casos certificarlos para

que cumplan las normas oficiales; y su posible capacidad como micronutrientes, son algunas de las características de los pigmentos.

3.1.1 Carotenoides

Son un grupo numeroso de pigmentos difundidos en los reinos vegetal y animal, producen colores que van desde el amarillo hasta el rojo intenso. Se han identificado por la naturaleza más de 600 de estos compuestos, y se estima que anualmente se sintetizan 100,000 toneladas de carotenoides de fuentes naturales. Son esenciales para que las plantas realicen la fotosíntesis, ya que actúan como atrapadores de la luz solar y, en forma muy especial, como escudo contra la fotooxidación destructiva. Su nombre genérico deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue esta hortaliza de donde se aislaron por primera vez. Se encuentran en frutas y verduras como jitomates, zanahorias, piñas y cítricos; flores como el cempasúchil y el girasol.

Todos los carotenoides pertenecen a la clase de los polienos, cadenas largas con dobles ligaduras conjugadas, cuya presencia explica el color intenso de los carotenoides ya que los sistemas conjugados presentan una resonancia posicional, lo que produce una deslocalización electrónica y, por lo tanto, absorben energía que se traduce en emisiones energéticas de determinadas longitudes de onda lo que da como resultado el color. El espectro de absorción tiene máximos cuyas longitudes de onda dependen del número de dobles enlaces conjugados [33].

Se dividen en dos grupos: los carotenos, que son hidrocarburos, y las xantofilas, sus derivados oxigenados. Los carotenos son muy solubles en éter de petróleo y poco en etanol; entre éstos destacan los α , β y γ -carotenos (ver figura 3.1) y el licopeno. Las xantofilas pueden presentarse como ácidos, aldehídos o alcoholes y son solubles en etanol, metanol y éter de petróleo. En ambos casos, carotenos y xantofilas, la estructura consiste en ocho unidades de isopreno unidas de tal forma que el arreglo de isoprenoides es reversible desde el centro de la molécula. Dado que un isopreno es una estructura repetitiva, se produce un gran número de isómeros geométricos de

configuraciones cis y trans. La gran mayoría de los carotenoides en la naturaleza son compuestos trans, si se crea una configuración cis se desplaza el máximo de absorbanza y aparece una banda secundaria de menor longitud de onda [12].

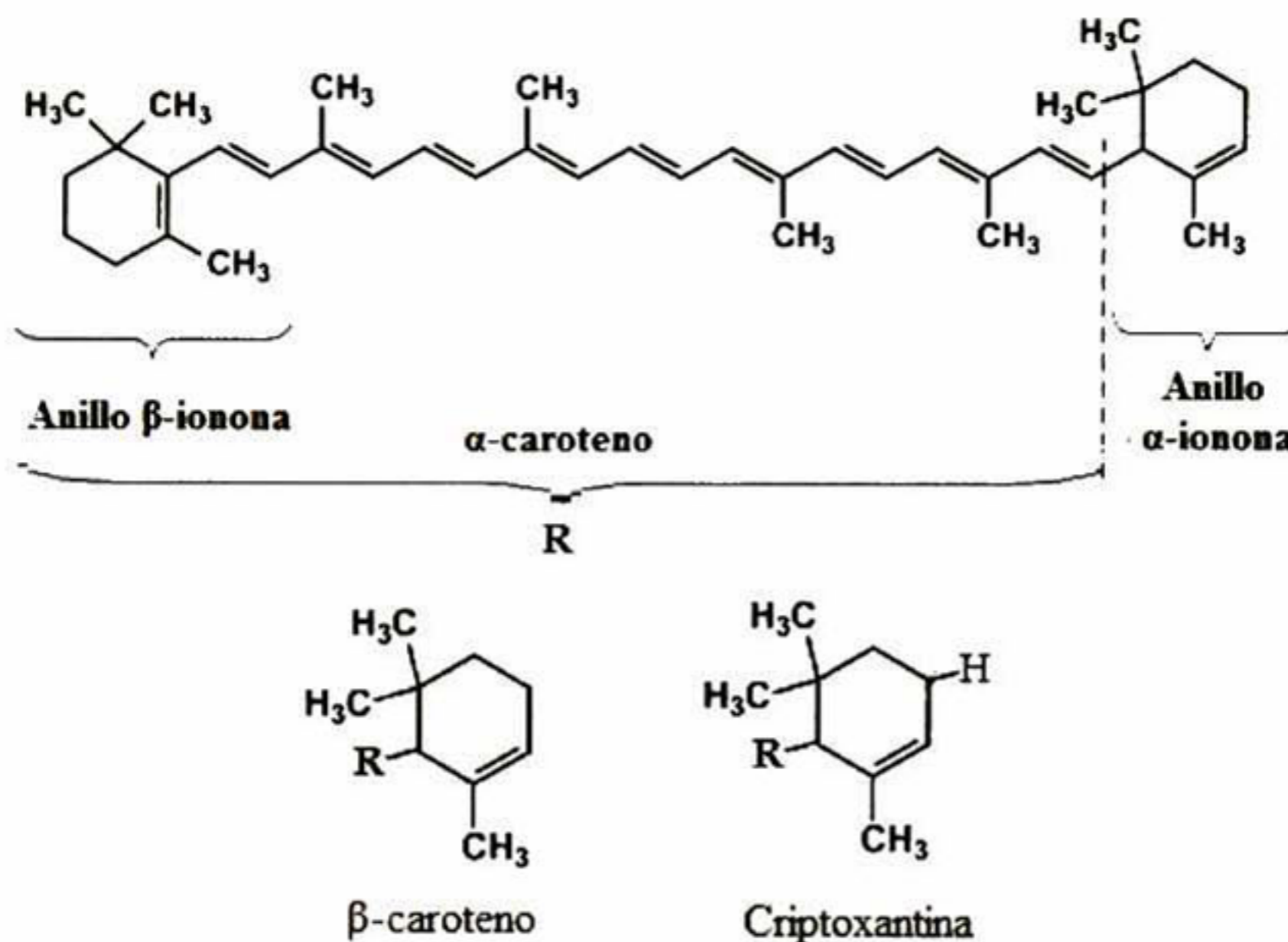


Figura 3.1 Diferencias químicas de los carotenoides [6]

3.1.2 Clorofilas

Las clorofilas se encuentran en todas las plantas que realizan fotosíntesis; la clorofila es el principal agente capaz de absorber la energía lumínica y transformarla en energía química para la síntesis de compuestos orgánicos que necesita la planta. Las hojas de la mayoría de las plantas deben su color verde a la clorofila, aunque ésta va desapareciendo al acercarse a la senescencia para dejar paso a otros pigmentos como los carotenoides. Este mismo proceso se presenta en los frutos inmaduros, que de color verde se tornan amarillos, rojos, etcétera, por la pérdida de la clorofila y la síntesis de otras sustancias coloridas en la etapa de maduración. En el caso del aceite de oliva, que se obtiene de refinación, su color se debe a la presencia de β -caroteno y de clorofila, el primero actúa como filtro de luz, y protege al aceite contra la

autooxidación, mientras que la clorofila propicia la generación de oxígenos en estado de singlete, lo que favorece esta transformación. Por esta razón, se ha comprobado que la fotooxidación del aceite de oliva está canalizada por la acción de la clorofila [20].

La estructura de las clorofilas es una dihidroporfirina, compuesta de cuatro pirroles y un anillo de ciclopentanona (figura 3.2). Este núcleo es el cromóforo responsable de absorber en la región visible. El compuesto metal-orgánico tiene una estructura planar resonante con 10 dobles ligaduras; este componente con magnesio también tiene una fuerte influencia en el espectro de absorción y el color de los derivados de clorofila. Por último, están presentes cadenas laterales de metilo, etilo, vinilo y ácido propiónico. La clorofila b difiere de la clorofila a debido a que tiene un grupo formilo que sustituye una de las cadenas de metilo lateral, mientras que la clorofila a tiene un metilo en esta posición. La cadena lateral de ácido propiónico está esterificada a un alcohol de 20 átomos de carbono, el fitol [28].

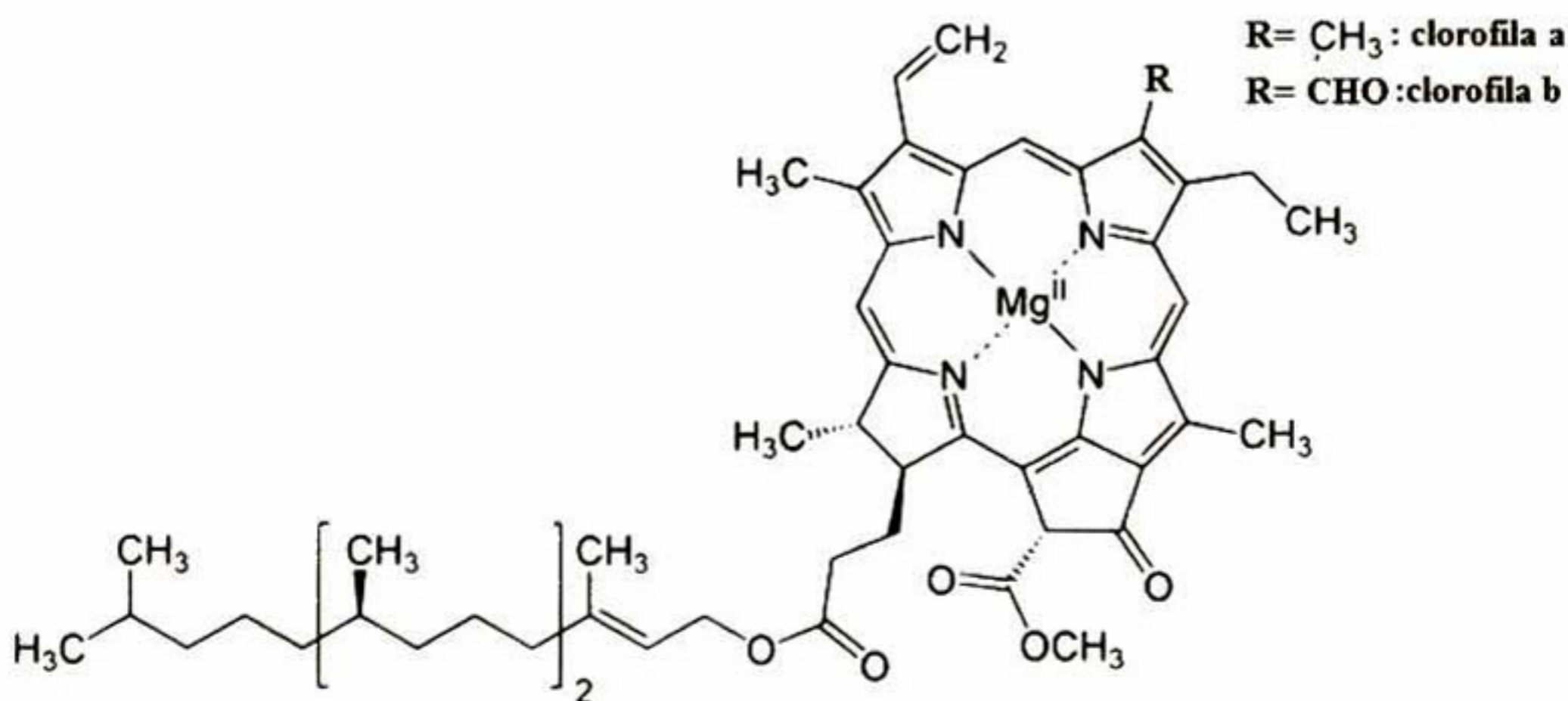


Figura 3.2 Estructura de clorofilas a y b

3.1.3 Pigmentos Fenólicos.

Son sustancias con uno o más anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo. Existen dos grandes grupos: los ácidos fenólicos (benzoico y cinámicos) y

los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos). Los ácidos fenólicos tienen un solo anillo, mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico. Los pigmentos fenólicos reaccionan fácilmente con un ácido orgánico o un azúcar, como los flavonoides y las antocianinas, o entre sí para formar polímeros, como los taninos.

Flavonoides

Los flavonoides y las antocianinas son compuestos fenólicos solubles en agua, metanol y etanol, con características de glucósidos; contienen como aglucón, un núcleo flavilo flavilo (ver figura 3.3) al cual se une una fracción azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. En realidad, algunos flavonoides son precursores en la biosíntesis de antocianinas. [27]

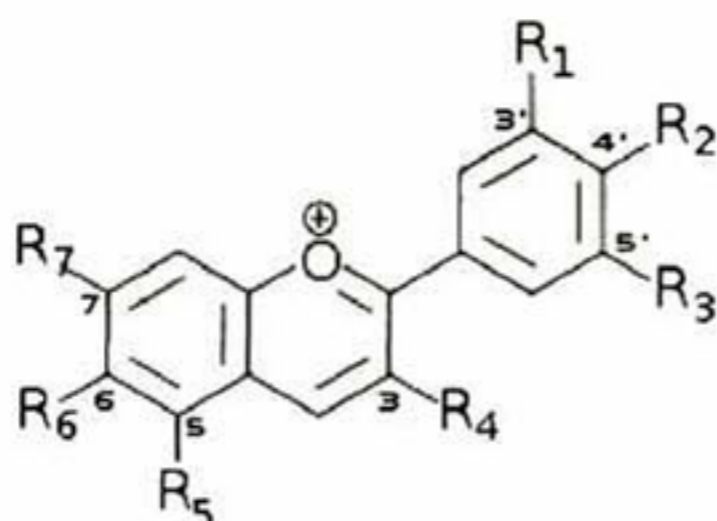


Figura 3.3 Estructura del grupo flavilo. [41]

Son pigmentos no nitrogenados, con un esqueleto de difenilpropano derivado del ácido shiquímico [41]. Los flavonoides pueden tener estructuras simples o muy complejas, debidas a la polimerización, como es el caso de los taninos condensados, que alcanzan pesos superiores a 30,000Da. Hay 13 subclases de flavonoides, lo que da un total de más de 5,000 compuestos que proporciona colores amarillos y naranjas a frutas como peras, fresas, manzanas, cerezas, duraznos, naranjas y limones [49], así como a hortalizas como cebollas y brócoli, y otros alimentos como el té verde, en donde son responsables en gran parte de su astringencia. Otros flavonoides proporcionan el color rojizo de las hojas de otoño.

El aglucón está formado por un esqueleto consistente en dos anillos bencénicos (A y B) y uno heterocíclico con oxígeno (C) formando un núcleo fenil-2-benzopirona [13]. Por la posición trivalente del oxígeno, al aumentar el grado de oxidación se producen más dobles ligaduras y, en consecuencia, mayor deslocalización de electrones, lo que hace que la estructura absorba a mayor longitud de onda [18]. Por tanto, el grado de deslocalización de electrones hace que existan pigmentos incoloros cuando el anillo C está saturado como en el caso de los flavonoles, o produciendo varias clases de coloraciones, desde los amarillos (como las flavonas, flavonoles y chalconas) hasta las antocianinas rojas y azules.

Estos glucones se unen a glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ácido glucurónico. Se sustituyen en posiciones 7, 5, 4', 7 y 4', 3'. La posición más común, a diferencia de las antocianinas, es la 7 por ser la más ácida; pueden estar acil-sustituidos como en el caso de las antocianinas [55].

Antocianinas

Se consideran una subclase de los flavonoides; también se conocen como flavonoides azules. Son compuestos vegetales no nitrogenados pertenecientes a la familia de los flavonoides, de amplia distribución en la naturaleza. A pesar de contener pocos grupos cromóforos, se han identificado 300 de estos compuestos, que son responsables de una gama muy amplia de colores, desde el incoloro hasta el púrpura. Producen colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas, rosas, fresas y otros productos de origen vegetal, principalmente frutas y flores. Generalmente se encuentran en la cáscara o piel, como en el caso de las peras y las manzanas, pero también se pueden localizar en la parte carnosa, como en las fresas y las ciruelas.

Al igual que los flavonoides, el aglucón está formado por un esqueleto consistente en dos anillos bencénicos y uno heterocíclico con oxígeno. El núcleo central flavilo (ver figura 3.4) constituye la antocianidina, que unida a la fracción azúcar, forma las antocianinas. Se conocen aproximadamente 20 antocianidinas, las más importantes

son pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares generan aproximadamente las 300 antocianinas que se mencionaron antes.

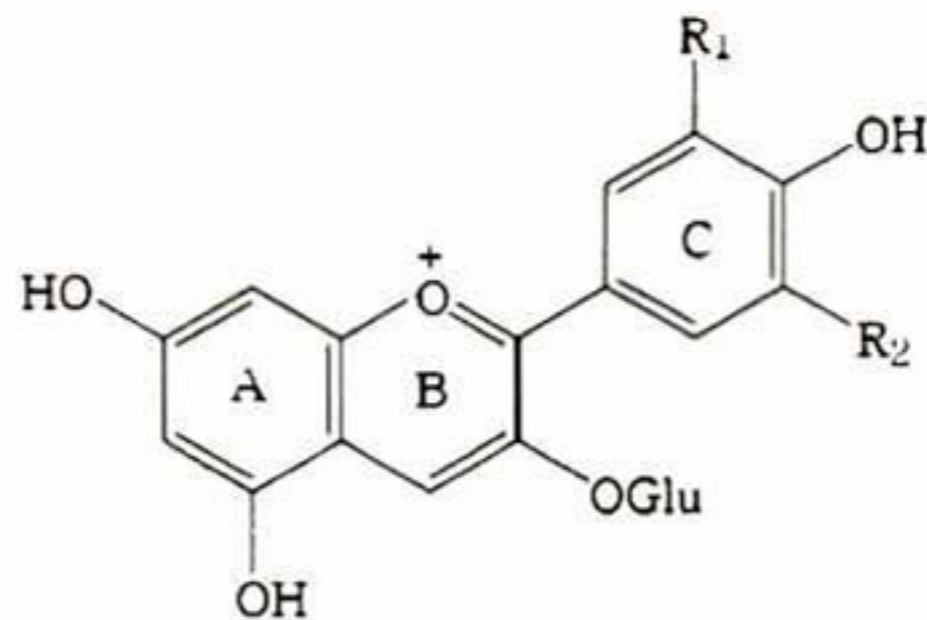


Figura 3.4 Estructura general de las antocianinas. [21]

3.1.4 Taninos

Son una clase de compuestos fenólicos incoloros o amarillo-café, y con sabor astringente y amargo, solubles en agua, alcohol y acetona. De acuerdo con su estructura y reactividad con agentes hidrolíticos, particularmente ácidos, se han dividido en dos grupos: taninos hidrolizables o pirogálicos y taninos no hidrolizables o condensados [39]. Su peso molecular varía normalmente de 500 a 3,000 Da; por su estructura presentan propiedades reductoras. Los taninos hidrolizables son sustancias poliméricas complejas que a su vez se clasifican en galotaninos cuando derivan del ácido gálico, y elagitaninos cuando provienen del ácido elágico, dímero del ácido gálico. El ácido gálico puede estar en forma de glucósido al unirse a una molécula de glucosa, o esterificarse consigo mismo produciendo ácidos di y trigálicos. Por su parte, los taninos no hidrolizables o condensados son dímeros de la catequina (flavan-3-ol) o de antocianidinas (flavan-3,4-diol); algunos de ellos producen una antocianidina coloreada cuando se tratan con ácidos calientes [13].

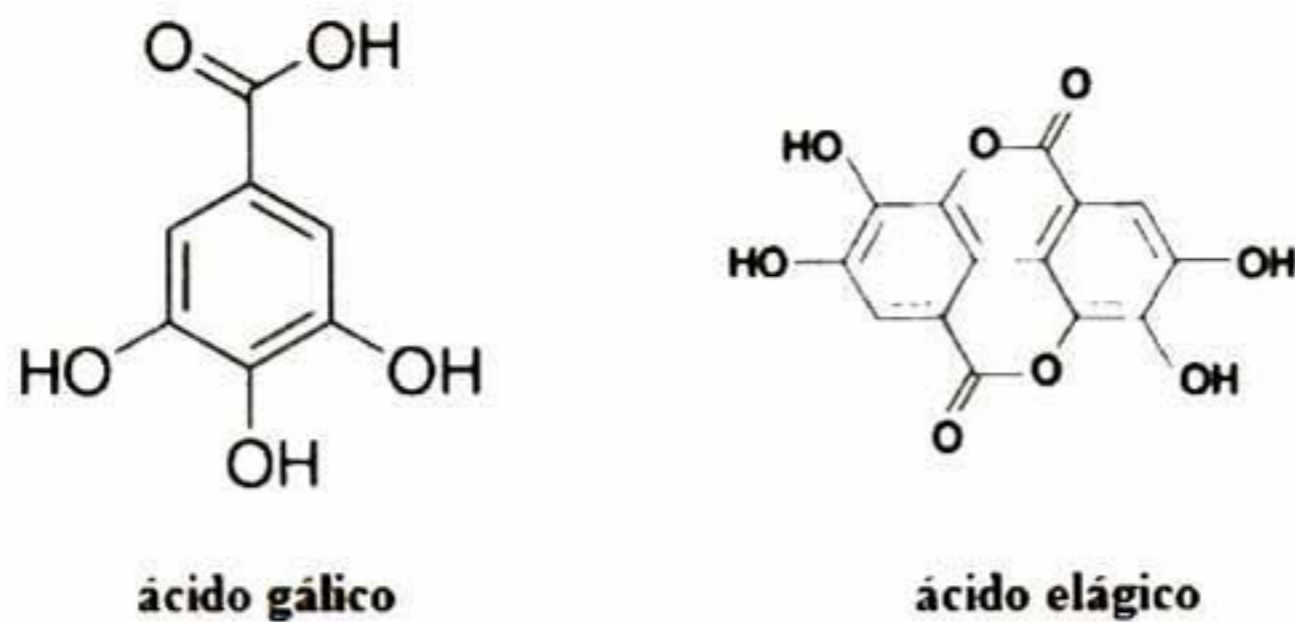


Figura 3.5 Estructura de los ácidos gálico y elágico.

3.1.5 Hemopigmentos

El color rojo de la carne se debe principalmente a los hemopigmentos: la hemoglobina y la mioglobina. Sin embargo también existen, aunque en pequeñas concentraciones, diferentes sistemas enzimáticos cuyas coenzimas o grupos prostéticos tienen propiedades cromóforas; entre éstos se cuentan las peroxidasas y las enzimas responsables del mecanismo del transporte de electrones, como los citocromos y las flavinas, que contienen riboflavina de color amarillo [4].

La hemoglobina y mioglobina, son proteínas sarcoplásmicas con una estructura globular, solubles en agua y en soluciones salinas diluidas. La hemoglobina es un tetrámero con un peso molecular de 67,000 Da, integrada por dos polipéptidos o cadenas α con 141 aminoácidos cada uno, y dos cadenas β con 146 aminoácidos; el interior de cada monómero, al igual que la mioglobina, es hidrófobo, mientras que el exterior es hidrófilo. La hemoglobina de las diferentes especies estudiadas presenta una estructura terciaria globular y una cuaternaria de tetrámero [22].

3.1.6 Ácido Carmínico

El ácido carmínico es el pigmento líder a nivel mundial, seguido por los carotenoides y el color caramelo; se obtiene de la hembra de la cochinilla *Dactylos coccus Ceosta*, originaria de Perú, México, Centroamérica y Chile; vive en varias especies de

cactáceas, en especial *Nopalea cochenillifera*. El colorante, una antraquinona, se obtiene al moler los insectos secos, y extraer el principio pigmentante con agua; se necesitan 700,000 insectos hembra para producir 500 gramos de colorante [6]. Aunque se usan alternativas al ácido carmínico a partir de antocianinas extraídas de plantas, ninguna es tan estable ni de colores tan variados. El pigmento es amarillo pálido a un pH 4, forma tonos rojo brillante con complejos con metales, como aluminio o calcio-aluminio; según el pH y los metales empleados, se logra la amplia gama de colores del ácido carmínico (ver figura 3.6).

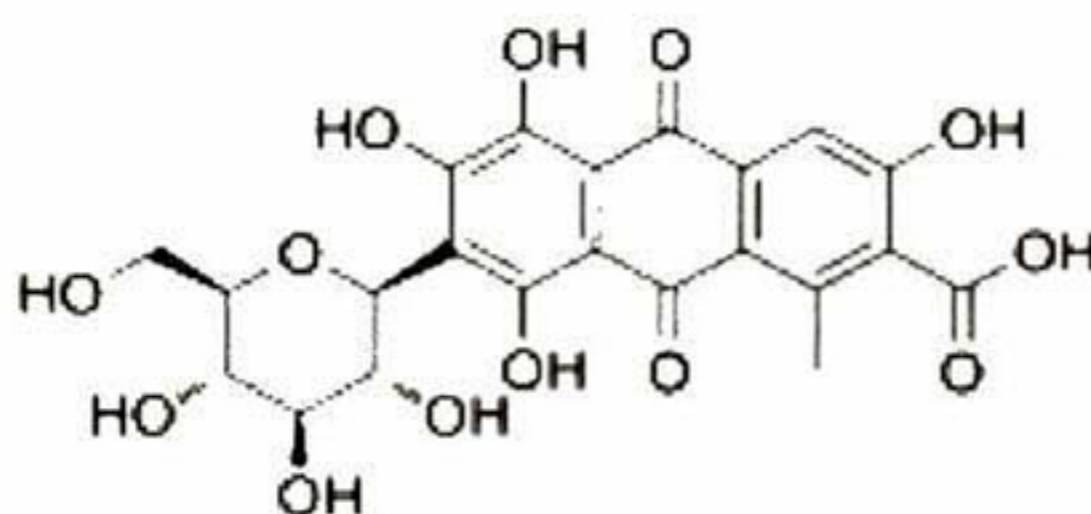


Figura 3.6 Ácido carmínico

Es una molécula que es alterada en su estructura dependiendo la aplicación que se le dé, sin embargo su estructura básica contiene una gran cantidad de nitruros lo que lo hace estructuralmente estable. Contiene una gran cantidad de anillos aromáticos, por lo cual en altas concentraciones, se considera altamente tóxico e incluso cancerígeno, aunque no se han reportado casos de cáncer por el mismo, si se tienen registros de trabajadores de la industria textil en Estados Unidos de enfermedades como Alveolitis alérgica extrínseca, la cual se define como enfermedad pulmonar de base inmunológica producida por una amplia gama de antígenos que llegan al pulmón por vía inhalatoria, vehiculizados por polvos orgánicos e inorgánicos de procedencias muy diversas, generalmente de origen ocupacional [15]. En menor cantidad pero aún así de gran importancia se han reportado casos de urticaria, angioedemas y anafilaxia, aumentando los riesgos en su consumo e inhalación.

3.1.7 Betalaínas

Este término se refiere a un grupo de aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles, con estructuras de glucósidos, derivados de la 1,7-diazoheptametina, y que se han dividido en dos grandes clases: los rojos o betacianinas, y los amarillos o betaxantinas [19].

Son parecidas a las antocianinas y flavonoides en apariencia visual. Anteriormente se les llamaba antocianinas nitrogenadas. Las betalaínas al igual que las antocianinas, se acumulan en las vacuolas celulares de las flores, frutas y hojas que las sintetizan, principalmente en la epidermis y subepidermis.

A la fecha se ha aislado una betacianina violeta, la muscapurpurina y siete betaxantinas amarillas, las muscaurinas, del hongo venenoso *Amanita muscaria*. De las fuentes de betalaínas, sólo el betabel, el amaranto y las frutas cactáceas (tunas rojas, pitaya, garambullo, jiotilla) son productos alimentarios. En el betabel, la betalaína corresponde a un 75-95% de los pigmentos, los otros son isobetanina, prebetanina e isoprebetanina; los dos últimos monoésteres sulfatados de la betanina e isobetanina, respectivamente. Los pigmentos amarillos más abundantes en el betabel son vulgaxantina I y II. La presencia de betalaínas en plantas es mutuamente excluyente de la de antocianinas. La del amaranto, amarantina, es una de las betacianinas que últimamente ha sido motivo de investigación, se ha usado en algunos países para colorear diversos alimentos [21].

Las betalaínas son uno de los pigmentos autorizados como aditivos por la FDA que no necesitan certificación; se comercializan como polvo de betabel, que incluye el pigmento y estabilizantes como azúcares, proteínas y antioxidantes [16]. Dado que existen restricciones de tipo legal en el uso de colorantes rojos sintéticos, se ha sugerido emplear a las betalaínas en diversos alimentos; sin embargo, por las limitaciones en su estabilidad su uso se restringe a alimentos como gelatinas, bebidas y postres en general, en los que el pigmento se conserva más fácilmente. Las

betalaínas se obtienen en forma de concentrado o de deshidratado a partir de una extracción acuosa a pH ácido; la purificación de los pigmentos se logra por medio de ultrafiltración y de ósmosis inversa. Incluso, debido a su potencial, se ha ensayado el cultivo de tejidos para producir betabeles con un mayor contenido de betaninas [56].

Las diferencias estructurales mencionadas se reflejan en la apariencia variante de dos subgrupos de betalaínas. Betacianinas, las cuales se observan con dos absorciones máximas, una en el rango UV entre 270 y 280 nm debido a la estructura ciclodopada y una segunda en el rango visible entre 535 y 538 nm dependiendo el solvente del sistema [16]. La acilación y los ácidos hidroxicinámicos producen una tercera absorción máxima entre 300 y 330 nm, donde el ácido alifático derivado no es distinguible de su correspondiente glucósido betanidina. La descarboxilación del C-2 es reportado en 2-descaboxibetanina de las raíces amarillas inducen un movimiento hipsocrómico de 5 nm. La neobetanina (4,15-dehidrobetanina) la cual es encontrada como componente natural en el betabel y la tuna roja muestra un máximo visible similar a las betaxantinas alrededor de 465 nm. De cualquier forma, la coabsorción distintiva en el rango uv es difiere de la estructura de la betacianina. [21]

Betacianinas

Son caracterizadas por una estructura Ciclo-dopada con substituciones adicionales donde varían los patrones de glicosilación y acilación en el carbono 5 y carbono 6 (Figura 2.6), estas conforman el 95% de la molécula de betalaína [21], su conjugación está extendida con un anillo aromático sustituido [30].

La betacianina más común es la betanidina-5- α - β -glicósido (betanina), pigmento mayoritario en remolachas rojas [16]. Se han identificado cerca de 50 betacianinas, la mayoría basada en los dos isómeros aglicones betanidinicos e isobetanidinicos. La fórmula de la betanidina tiene dos carbonos asimétricos (C2 y C15) por lo que es ópticamente activo. La isomerización ocurre bajo condiciones ácidas o la aplicación de calor. En la naturaleza, la forma más común de las betacianinas es el modo

glicosilado con glucosa, soforosa y ramnosa. Los modos acilados más comunes son los ácidos sulfúricos, malónicos, 3-hidroxi-3-metilglutarico, cítrico, *p*-coumárico, ferúlico, caféico y sinápico [21].

Betaxantinas

Se caracterizan por tener grupos R y R' que no extienden la conjugación del cromóforo 1, 7-diazaheptametino, el sustituyente R' es un grupo amino o aminoácido y R es usualmente un hidrógeno [30]. Estructuralmente son productos de condensación del ácido betalámico y varios componentes amino (Figura 3.7). Los grupos amino conjugados algunas veces muestran una menor absorción máxima que su respectivas contrapartes de los aminoácidos [21].

Las betaxantinas al igual que las betacianinas regularmente se encuentran como aglicones óptimamente activos. La absorción máxima de las betaxantinas es a 480 nm debido a que la conjugación de la estructura no es muy amplia.

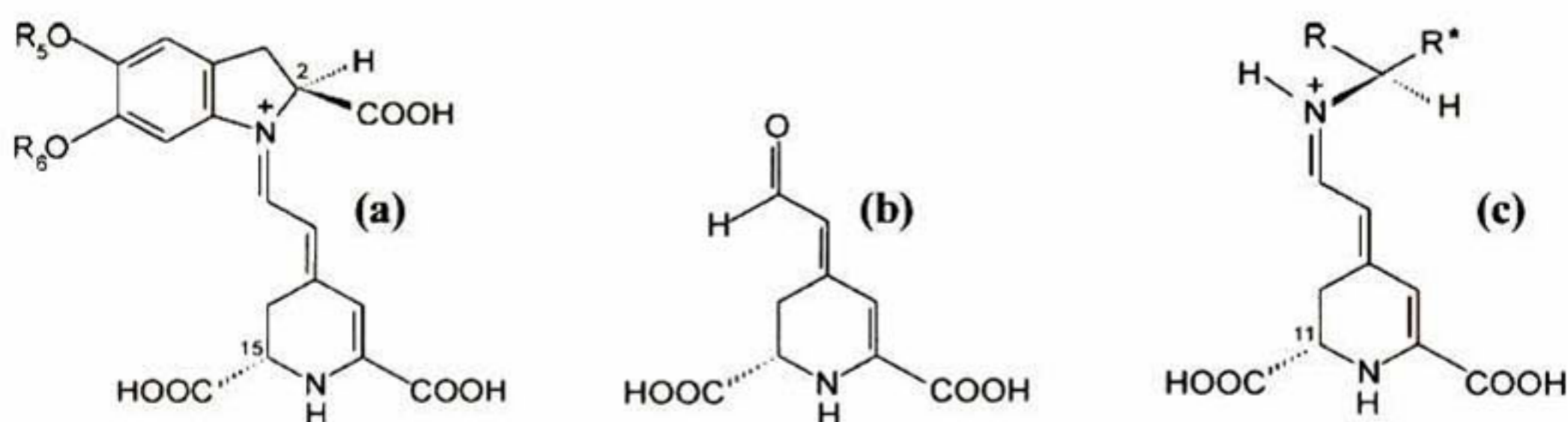


Figura 3.7 Estructura básica de las betacianinas (a) y betaxantinas (c) y el ácido betalámico, (b) como estructura básica de construcción de las moléculas [30].

Aplicaciones del colorante en alimentos

Las betalaínas, son menos usadas como pigmentos naturales que las antocianinas y carotenoides, hasta el momento, la fuente más importante de betalaínas es la remolacha roja o betabel (*Beta vulgaris*) con un rendimiento de 50 a 60 toneladas por hectárea y una concentración que varía según los cultivares. Fuentes potenciales de

betalaínas podrían ser especies como el género *Amaranthus*, *Opuntia*, *Hylocereus* y *Myrtillocactus*, así como, la acelga suiza y remolacha amarilla, las cuales, han estimulado estudios respecto a su posible empleo como colorantes de alimentos o conocer los beneficios a la salud humana [5][36]. En la mayoría de los casos, los pigmentos mayoritarios rojo-violeta son la betanina, isobetanina, betanidina e isobetanidina, y los pigmentos amarillos mayoritarios son la vulgaxantina I y vulgaxantina II, como por ejemplo, la remolacha roja, que contiene mayor cantidad de betanina y vulgaxantina I [5].

Las betalaínas tienen diversas aplicaciones en alimentos como: repostería, confitería, colorante en polvo y productos cárnicos y lácteos. Estos pigmentos son estables en un rango de temperatura de 14 °C a 25 °C, mientras que las betacianinas son menos estables a 37 °C. Las betalaínas procedentes de frutas de cactáceas, no presentan impactos negativos en el sabor de los alimentos, convirtiéndose en fuentes de color potenciales. Las cactáceas requieren poco suelo y agua para su cultivo, por lo que representan una alternativa para la agricultura de regiones áridas y semiáridas. En diversos estudios se ha reportado que la pulpa de fruta de cactáceas contiene altas concentraciones de betacianinas y betaxantinas [5].

Tabla 3.1 Principales sustituyentes identificados en betalaínas naturales [32].

Betalaína ^a	Residuo ^b
Aglicona	
Betanidina	
Grupo de la Betanina	
Betanina	5-O-Glc
Filocactina	5-O-Glc
Lampantina-I	5-O-Glc
Grupo de la Amarantina	
Amarantina	5-O-Glc-2-O-GlcU

Continuación Tabla 3.1	
Celosianina II	5-O-Glc-2-O-GlcU
Bugambilia	
Bugambilia	5-O-Glc-2-O-GlcU
Grupo de la Gompenina	
Comprenina-I	6-O-Glc
Betaxantinas	
DOPAxantina	DOPA
Indicaxantina	Prolina
Portulaxantina-II	Glicina
Vulgaxantina	Ácido glutámico

La estabilidad de las betalainas es restringida, debido a que su color se altera por varios factores: pH, temperatura, actividad acuosa y luz; no se ha logrado la estabilización de estos pigmentos a través de acilación o sustitución de la molécula, aunque su estabilidad puede aumentar si se añaden antioxidantes como ácido ascórbico [29]. Las betaxantinas se degradan con mayor rapidez que las betacianinas además que por su color amarillo en general se enmascaran por las betacianinas u otros compuestos presentes. Todas las reacciones se aceleran por la acción catalítica de algunos metales, principalmente del cobre [26].

Efecto del pH

Aunque se altere su carga sobre el pH los cambios no están susceptibles a la hendidura hidrolítica al igual que las antocianinas. En cambio, guardan su aspecto sobre la gama amplia del pH a partir del 3 a 7, pero se degrada debajo de pH 2, por debajo del pH 3.0 el color cambia a violeta, y su intensidad decrece, arriba del pH 7.0, el color es más azulado debido a un efecto batocrómico y sobre pH 9 donde se observa una mayor intensidad del azul, respectivamente. Sin embargo, durante el proceso, la isomerización, la descarboxilación, o la pérdida de betacianinas por el calor o el ácido puede ocurrir. Considerando que las primeras alteraciones no tienen

consecuencias visibles, este último viene junto con pérdida total del color. Permitiendo los extractos recientemente procesados colocarse por algún tiempo en los valores de pH de cerca de 5 y las temperaturas debajo de 10° C compensan en parte la pérdida de la producción porque la regeneración de la betacianina de productos tempranos de la degradación es posible. No obstante el ácido ascórbico en niveles de 0.1% protege su integridad química así como un pH entre 4 y 6 [45].

Efecto de la temperatura

La degradación de betalinas como betanina y vulgaxantina-I sigue una reacción de primer orden en un intervalo de pH 3.0 a 7.0, en ausencia de oxígeno, la betanina, por otra parte, produce isobetanina y/o betanina descarboxilada cuando se calienta a un pH de 3.0 a 4.0. La fracción azúcar es muy sensible a la ruptura en altas temperaturas, así como a reacciones de oxidación, lo que iniciará una polimerización que dará productos similares a las melaninas como se muestra en la figura 3.8.

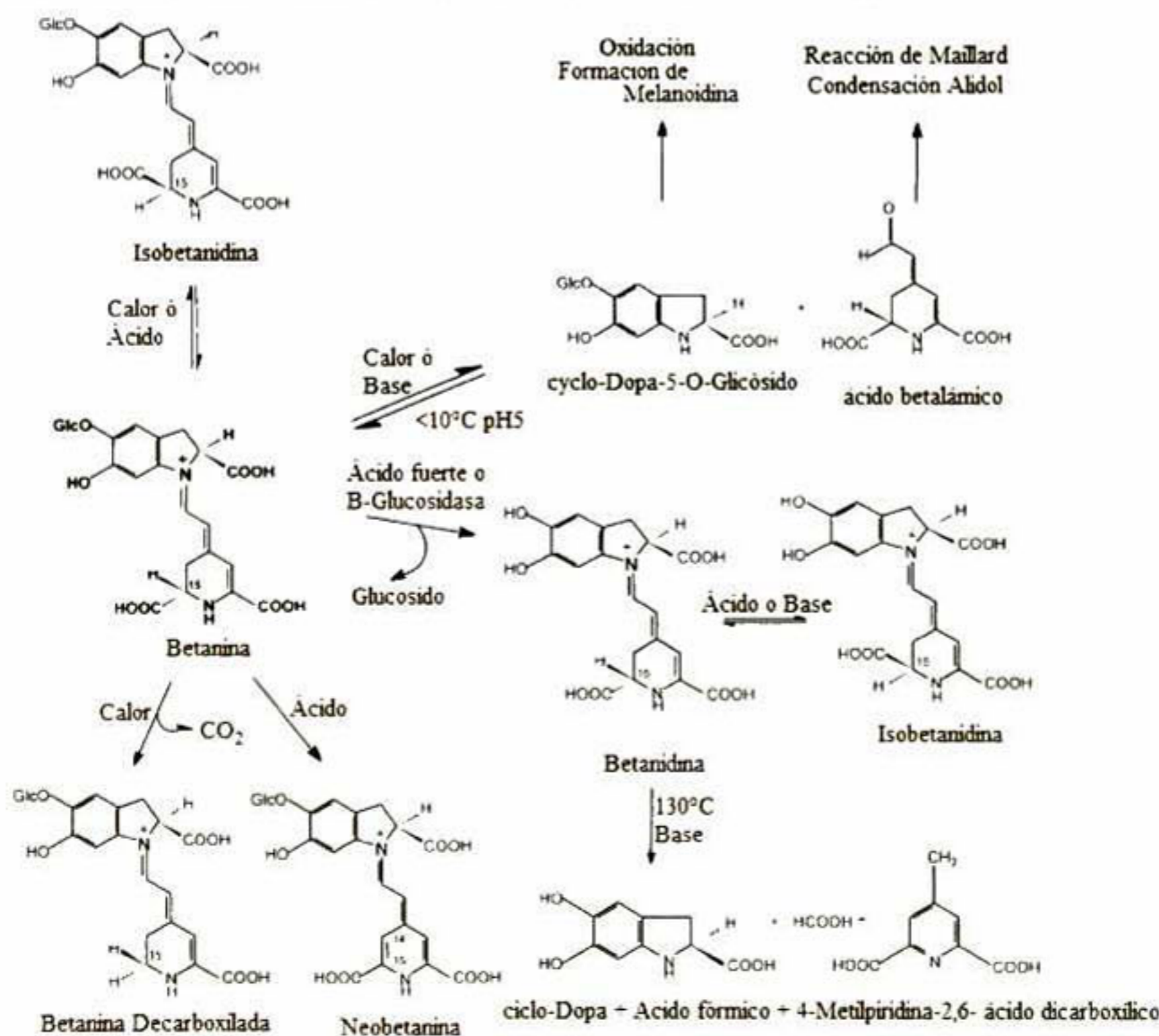


Figura 3.8 Patrones de degradación de la betanina.(Stirling)

Efecto de las radiaciones

Al igual que las antocianinas, las betalainas son muy susceptibles a la degradación iniciada por radiación de varios tipos; la degradación por fotooxidación depende del pH, y ocurre con más intensidad a pH de 3.0 que a 5.0 [53].

Efecto del oxígeno

La presencia de oxígeno afecta la velocidad de fotooxidación y de degradación por temperatura; los iones metálicos (fierro, cobre, estaño, aluminio) aceleran la oxidación en presencia de oxígeno. La presencia de ácido ascórbico ó α -tocoferol no protegen a las betalainas de la oxidación; sin embargo, el ácido cítrico y EDTA sí la reducen, posiblemente al neutralizar parcialmente el efecto electrofílico del núcleo [21].

Efecto de la actividad del agua

Son estables en productos deshidratados con una actividad del agua menor a 5.0. Los tocoferoles y la vitamina C solo funcionan como antioxidantes de las betalainas a 1,000 ppm, pero a esa concentración son prooxidantes que afectan el pigmento la betalaína se vuelve más inestable a medida que se aumenta la actividad del agua y el contenido de humedad del alimento; por esta razón, los sólidos del betabel deben almacenarse con la menor cantidad de agua posible y en las condiciones más secas [54].

Acción enzimática

Otro mecanismo de decoloración de la betacianina y de la betaxantina, particularmente en el betabel, es por la acción enzimática que alcanza su máximo a un pH 3.4; en apariencia debido a la actividad de la peroxidasa [47].

3.2 Productos de extracción de betalainas

Se manejaron dos productos como fuente de obtención de betalainas para este proyecto, las cuales fueron elegidas por ser producidas en la zona del Bajío de

México y ser complementarias en su disponibilidad a lo largo del año.

3.2.1 Betabel

El betabel (*Beta vulgaris var conditiva*) está considerado como una hortaliza de raíz, aunque en realidad se trata de un "tallo engrosado bulboso", y constituye un órgano de almacenamiento, principalmente de azúcares y almidones, también las hojas del betabel cocidas son comestibles. El sistema de raíces es muy profundo y ramificado; el tallo floral puede alcanzar una altura de 1 a 1.30 m; presenta flores hermafroditas, con estambres y pistilos pudiendo aparecer solas o en grupos (panícula) apretados de dos o tres; las hojas son de un color verde intenso y los pecíolos, es decir, los tallos de las hojas son de color rojo o púrpura [25].

Clima

El betabel es una planta de clima frío, aunque se puede explotar en clima cálido pero ésta será de menor calidad. La temperatura de germinación es de 10 a 30°C, siendo la óptima entre los 20 y 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. El betabel es sensible a suelos ácidos, desarrolla mejor en suelos neutros y alcalinos, prefiriendo un PH de 6.5 a 7.5, es altamente tolerante a la salinidad; en cuanto a textura, se desarrolla mejor en suelos ligeros (arenosos) ya que en suelos arcillosos se deforman "los bulbos".

Siembra

Para el cultivo del betabel se utiliza principalmente la siembra directa aunque se puede realizar por trasplante, y éste se efectúa cuando la plantita tiene de 3 a 4 hojas verdaderas. Cuando se aplica siembra directa, se debe realizar el aclareo. Se pueden obtener poblaciones de 215,000 y 220,000 plantas por hectárea. La densidad de siembra es de 10 a 15 kg/ha; la distribución entre surcos es de 66 ó 77 cm a hilera sencilla, 92 ó 100 cm a doble hilera; la distribución entre plantas es de 10 a 15 cm.

Cosecha

Se utilizan dos indicadores de cosecha, uno que implica conocer el diámetro del "bulbo" (cuando presente un diámetro de entre 8 a 10 cm) y otro es el tiempo en días, 60 a 80 días para cultivares precoces, 80 a 100 días para intermedios y 100 a 110 días para tardíos.

3.2.2 Garambullo

El género *Myrtillocactus* pertenece a la familia de las cactáceas, e incluye cuatro especies, tres de las cuales se encuentran en México (*Myrtillocactus cochal*, *Myrtillocactus geometrizarans*, *Myrtillocactus schenckii*) y una en Guatemala (*Myrtillocactus eichlamii*) [2]. La distribución geográfica de estas especies en México es como sigue: *Myrtillocactus cochal*, se distribuye en los límites del desierto de Sonora y Baja California. *Myrtillocactus schenckii*, se distribuye en Puebla y Oaxaca [2]. *Myrtillocactus geometrizarans*, es una de las pocas especies de cactáceas columnares endémicas de México con amplia distribución en la República Mexicana [23], encontrándose en los estados de Hidalgo, Guanajuato, Michoacán, Jalisco, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Tamaulipas, Nuevo León, Estado de México, Puebla, Veracruz, Guerrero y Oaxaca [46].

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizarans*) es una . El garambullo se encuentra en altitudes de 1800 a 2200 m. Crece en suelos fértiles y poco fértiles. Es una planta resistente a los rayos de sol y al ataque de insectos (*Spodoptera frugiperda* y *Tenebrio molitor*) por su contenido de terpenoides (peniocerol, macdougallina y chichipegenina) [23]. En Querétaro crece en matorrales xerófilos crasicale, micrófilo y rosetófilo, en pastizales y en el bosque tropical caducifolio [46]. El clima muy lluvioso y con bajas temperaturas menores a 10 °C, limita su distribución en varias regiones de México, su propagación puede ser de manera in vivo por explantes, injertos ó semillas, e in vitro por explantes apicales o basales [23].

Es una cactácea fácilmente propagada, crece en zonas áridas y semiáridas de México, y proporciona un fruto comestible de color morado globoso, de 1 a 2cm de diámetro, sin espinas [44]. Las zonas en donde hay una mayor producción es en los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro y Guanajuato, esto no quiere decir que en otros estados no haya producción, pero se desconoce el potencial productivo y la superficie sembrada [23]. Su periodo de cultivo va del mes de abril a septiembre. La producción en condiciones silvestres es relativamente baja inferior a 500kg/Ha, de toda la producción, sólo se cosecha entre el 35 y el 70%, esto por la dificultad para ser cosechados [44].

El fruto es no climatérico con tiempo de vida postcosecha muy corto [23], es consumido de manera fresca o procesado de manera local, ya que es utilizado para preparar refrescos, mermeladas, como colorante para alimentos, licor, pasteles, galletas, dulces, agua fresca, en conserva, nieve, helados y paletas [46]. Los estudios en la fruta se han enfocado a las betalainas, pigmentos característicos con un contenido de 2.3 mg/100 g de peso fresco. En análisis por HPLC, se han identificado cuatro picos, una betaxantina, betanina, isobetanina y probablemente filocactina [45]. Las betalainas se han encontrado estables a pH bajo, sin riesgos toxicológicos e inocuas en concentraciones hasta 15 g/kg en vía oral en la utilización como aditivo colorante [45].

IV. GENERALIDADES

4.1 Resinas de intercambio iónico

Se consideran como sustancias granuladas insolubles las cuales tienen en su estructura molecular radicales ácidos o básicos que pueden ser intercambiados. Los iones positivos o negativos fijados en estos radicales serán reemplazados por iones del mismo signo en solución en el líquido en contacto con ellos. El intercambio iónico es completado sin deterioración o solubilización cambiando el número total de iones en el líquido antes del intercambio. Hoy en día, las sustancias de intercambiadores de iones son usadas casi exclusivamente sobre el nombre de resinas. Se consideran 4 tipos principales de resinas:

Resinas catiónicas de ácido fuerte. En este tipo de resinas se intercambian iones positivos (cationes), estas resinas funcionan a cualquier pH que se desee trabajar y se utiliza principalmente para suavizar aguas como una primera columna de desionización en desmineralizadores o lechos mixtos, elimina cationes del agua y es necesaria una gran cantidad de regenerante.

Resinas catiónicas de ácido débil. Su capacidad de intercambio es mucho menor, por lo cual a pH bajo no se consideran funcionales. Presentan un elevado hinchamiento y contracción lo cual hace aumentar las pérdidas de carga, es una resina muy eficiente ya que requiere una menor cantidad de solución regenerante y trabajan a flujos menores que las de ácido fuerte.

Resinas aniónicas de base fuerte. Trabaja con intercambio de aniones, su aplicación es principalmente para suavizado de aguas y como segunda columna de desionización en desmineralizadores y lechos mixtos. Elimina aniones del agua y se utiliza gran cantidad de regenerante.

Resinas aniónicas de base débil. Es un tipo de resina muy eficiente, se utiliza menor cantidad de regenerante y trabaja a pH bajos, estas resinas pueden sufrir problemas de oxidación y ensuciamiento.

4.2 Estabilización

En estabilización se ha reportado que sistemas como el ácido ascórbico al 1% mejora la estabilidad de los sistemas de betalaína aumentando su rendimiento ante la luz y temperatura, sin embargo, se emplearon partículas cerámicas de sílice (SiO_2), las cuales se encuentran derivadas de un alcóxido de silicio (Tetraetilortosilicato), utilizando un sistema de reacción de hidrólisis para el acoplamiento de las partículas a la molécula de betalaína.

4.3 TEOS (Óxido de silicio)

Cuando se habla de alcoholes ácidos, se considera que tienen una fuerza similar al agua. El hidrógeno está ligado al muy electronegativo elemento oxígeno. La polaridad del enlace O-H facilita la separación de un protón relativamente positivo; desde otro punto de vista, el oxígeno electronegativo acomoda muy bien la carga negativa de los electrones abandonados. La acidez de los alcoholes se observa principalmente por su reacción con metales activos para liberar hidrógeno gaseoso y esto forma alcóxidos. Estos alcóxidos son reactivos muy útiles. Son bases poderosas, aún más fuertes que el hidróxido, mediante la variación del grupo alquilo se puede variar su grado de basicidad, sus necesidades estéricas y sus propiedades de solubilidad. Como nucleófilos se pueden utilizar para introducir el grupo alcóxido en moléculas [37].

Para esta aplicación se utilizaron alcoxilanos, los cuales son compuestos derivados del silicio que consisten en un átomo de silicio unido a un grupo alcoxi. El Tetraetilortosilicato se considera un alcóxido metálico que se hidroliza lentamente en dióxido de silicio y etanol al encontrarse en la humedad del ambiente. Los óxidos de silicio (sílice, SiO_2), véase figura son materiales inorgánicos extensamente usados en

procesos de separación y adsorción de moléculas, biomedicina, cromatografía líquida (HPLC), aditivos en pinturas, cargas reforzantes en caucho sintético, tecnología de membranas e ingeniería molecular, electrónica y óptica, tratamiento superficial químico-mecánico, y una aplicación industrial muy importante es su uso como soporte de catalizadores para formar catalizadores heterogéneos. Para todas estas aplicaciones se requiere que la sílice presente alta área superficial y porosidad, esta última propiedad debe ser preferiblemente del tipo mesoporosa; además, para algunas de estas aplicaciones la sílice debe tener una morfología de partícula específica [42].

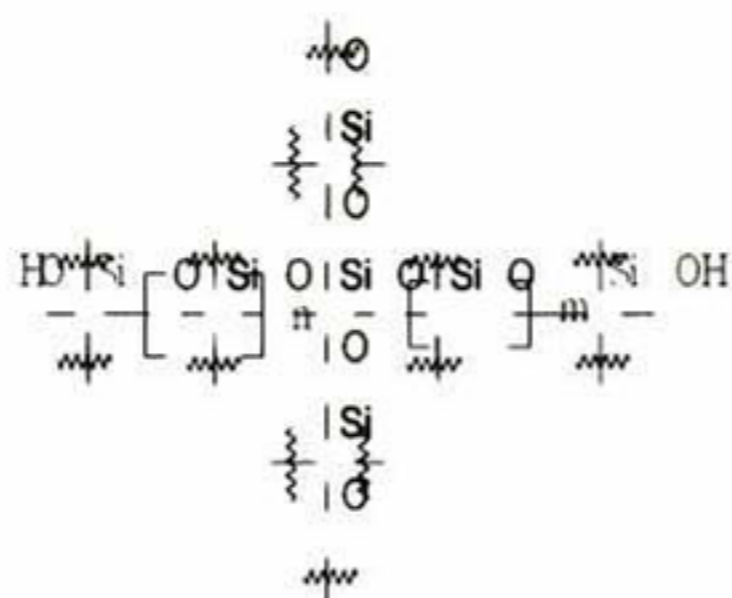
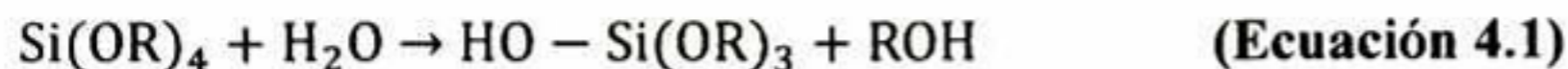


Figura 4.1 Representación esquemática de la sílice.

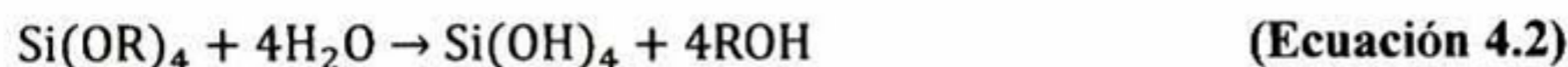
La sílice se produce comúnmente en la naturaleza como la arenisca, arena de sílice o cuarcita. Si se encuentra en estado amorfo constituye el ópalo y suele incluir un porcentaje elevado de agua. Tiene una estructura de red cristalina atómica, aunque puede adoptar tres formas cristalinas en la naturaleza; cuarzo, tridimita y cristobalita. En estado vítreo 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 [32]. Dado a que se considera un producto inorgánico el cual se ha enfriado hasta un estado rígido sin pasar por cristalización y al ser considerado una cerámica, este contiene las propiedades más comunes de las cerámicas como es el ser un material duro, frágil, transparente y amorfo.

4.3.1 Reacción de hidrólisis

Los alcóxidos metálicos son compuestos metal orgánicos, que tienen un ligando orgánico unido a un átomo metálico o metaloide. Los alcóxidos metálicos son precursores que reaccionan fácilmente con agua mediante la ruptura de una especie química en dos por la acción del agua, a esto se le llama proceso de hidrólisis [32].



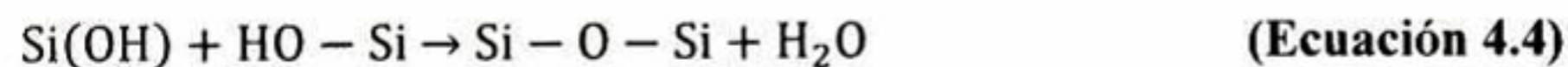
Dependiendo de la cantidad de agua y el catalizador, la hidrólisis puede llevarse a cabo por completo (los grupos OR son remplazados por OH).



O detener las reacciones mientras el metal se encuentra parcialmente hidrolizado



Dos moléculas parcialmente hidrolizadas pueden unirse a una reacción de condensación, como:



Por definición, la condensación se produce cuando se libera una molécula pequeña, tal como agua o alcohol [32].

4.4 Secado por congelación (Liofilización)

Combina dos métodos de conservación. Congela el alimento y después deshidrata el alimento congelado por sublimación del hielo al vacío. Es decir, el agua pasa del



estado de hielo al estado vapor sin pasar por el estado líquido. Esta es una manera suave de eliminar agua. En otros métodos de secado, la solución se mueve hacia la superficie del alimento, desde donde el agua se elimina y el soluto se concentra. Durante el secado por congelación, el frente de sublimación se desplaza hacia el interior del alimento en su localización original y el alimento retiene su estructura original, en consecuencia, estos se rehidratan rápidamente al 90-95% de su contenido de humedad original [34].

Este procedimiento inhibe a los microbios por la disminución de A_w durante la congelación y por la sublimación del hielo. El grado de lesión celular durante estas dos fases puede ser diferente. La supervivencia microbiana también depende de la composición del alimento secado por congelación. Habitualmente, los carbohidratos, las proteínas y las sustancias coloidales son protectores. La viabilidad celular decrece lentamente durante el almacenamiento de los alimentos secados por congelación [34].

4.5 Técnicas de caracterización

Se manejaron distintas técnicas para el análisis comparativo de las muestras, algunas de las cuales son:

4.5.1 Azúcares reductores

Son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar con otras moléculas. La reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad de su grupo carbonilo. Se sabe que la forma abierta o extendida de los azúcares no es muy estable, a tal punto que, por ejemplo, en la glucosa representa sólo el 0,002 %. Las moléculas de azúcar consiguen estabilizarse a través de un equilibrio entre dicha forma abierta y por lo menos dos formas cerradas (anómeros cíclicos) en las que el grupo carbonilo ha desaparecido. [34]

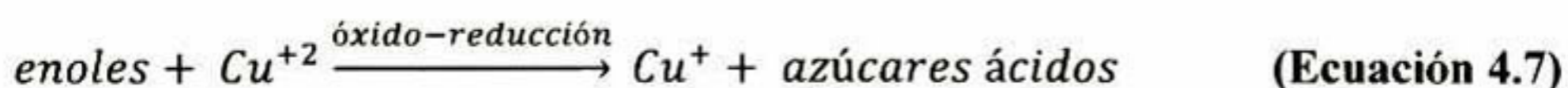
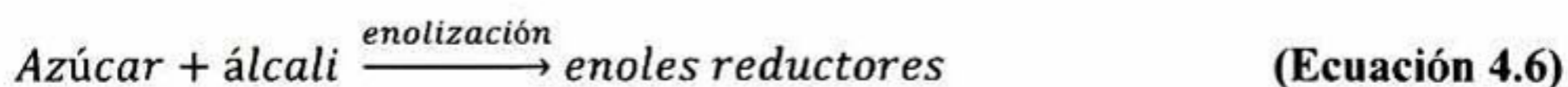
El reactivo de Fehling, es una solución descubierta por el químico alemán vander Fehling y que se utiliza como reactivo para la determinación de azúcares reductores. El ensayo con el licor de Fehling se fundamenta en el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído. Éste se oxida a ácido y reduce la sal de cobre (II) en medio alcalino a óxido de cobre(I), que forma un precipitado de color rojo. Un aspecto importante de esta reacción es que la forma aldehído puede detectarse fácilmente aunque exista en muy pequeña cantidad. Si un azúcar reduce el licor de Fehling a óxido de cobre (I) rojo, se dice que es un azúcar reductor. [6]

Esta reacción se produce en medio alcalino fuerte, por lo que algunos compuestos no reductores como la fructosa (que contiene un grupo cetona) puede enolizarse a la forma aldehído dando lugar a un falso positivo.

El licor de Fehling consiste en dos soluciones acuosas:

- a) Sulfato cúprico cristalizado, 35 g; agua destilada, hasta 1.000 ml.
- b) Sal de Seignette (tartrato mixto de potasio y sodio), 150 g; solución de hidróxido de sodio al 40%, 3 g; agua, hasta 1.000 ml.

Con estas soluciones se produce una reacción en tres partes para la generación del precipitado de cobre, las cuales son [6]:



4.5.2 Antioxidantes

Los antioxidantes son un grupo de vitaminas, minerales, colorantes naturales y otros compuestos vegetales y enzimas, entre otros, que tienen la capacidad de retardar o evitar la oxidación de las moléculas orgánicas al disminuir las reacciones químicas que involucran oxígeno. Es decir, los antioxidantes son capaces de neutralizar la acción oxidante de moléculas inestables o radicales libres. En general los antioxidantes tienen el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor de estos últimos [1].

Existen sistemas antioxidantes exógenos y endógenos. Los primeros actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de alimentos que los contengan. En este grupo se encuentran las vitaminas C, E y A, los carotenoides y los polifenoles. En los segundos se encuentran las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), y el cofactor glutatión reducido (GSH) [52].

El radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH) es uno de los pocos radicales orgánicos estables, posee un color violeta y se encuentra disponible de manera comercial. El ensayo se basa en la reducción del DPPH por los antioxidantes mediante la pérdida del color del radical, monitoreando el cambio en la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro [42]. Los resultados pueden expresarse como TEAC comparando cantidades estándar del antioxidante sintético Trolox. (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico, un análogo de la vitamina E). El TEAC se expresa en la concentración milimolar de una solución de Trolox que tiene una capacidad antioxidante equivalente a una solución 1 mM de la sustancia que se está evaluando [52]. La reacción del antioxidante y el DPPH se muestra en la Figura 4.2.

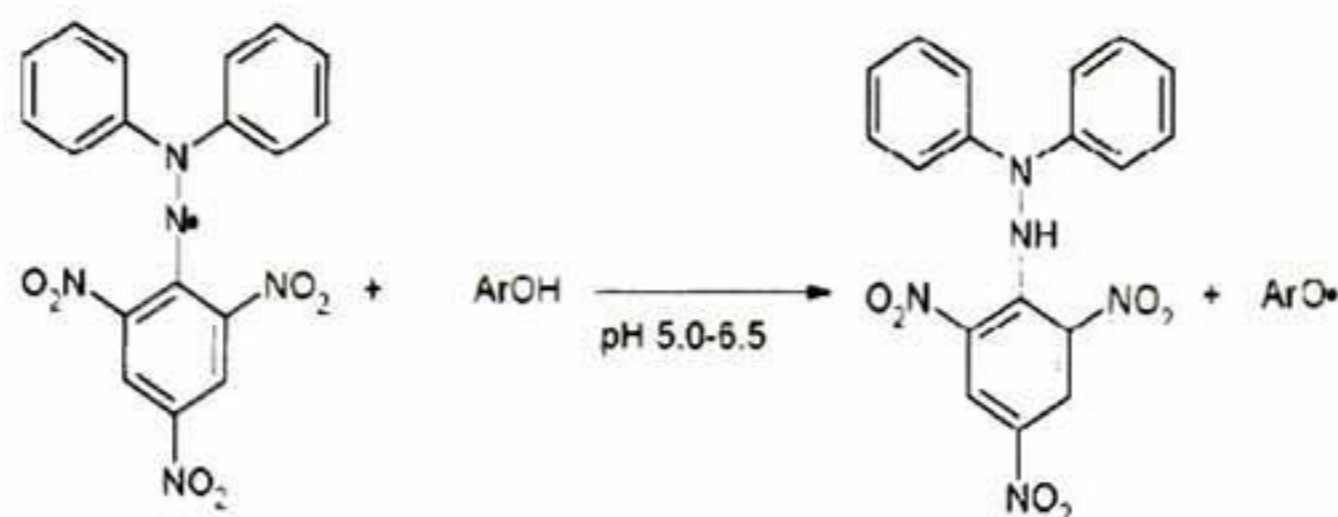


Figura 4.2 Reducción del DPPH por el antioxidante [35]

4.5.3 Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos se clasifican en fenoles simples y ácidos fenólicos, derivados del ácido hidroxicinámico y flavonoides. Muchos de los inhibidores discutidos anteriormente son fenólicos.

Los compuestos fenólicos simples incluyen monofenoles, difenoles y trifenoles. El ácido gálico se halla presente en las plantas como ésteres del ácido quínico o taninos hidrolizables. Los únicos fenoles simples utilizados como conservantes son los del humo de madera. El ahumado de carnes, quesos, pescados y aves imparten, además del sabor deseado, un efecto conservante. El fenol y el cresol contribuyen al aroma del ahumado y actúan como antioxidantes y antimicrobianos [34].

4.5.4 Espectroscopia UV

La luz de longitud de onda entre unos 400 nm y 750 nm es visible. Más allá del extremo rojo del espectro visible se encuentra la región infrarroja. Más allá del extremo violeta del espectro visible se encuentra la región ultravioleta. Los espectrómetros para el ultravioleta de uso común miden la absorción de luz en la región visible y ultravioleta cercana, es decir, en el intervalo de 200-750 nm. Esta luz es de frecuencia más elevada que la infrarroja, y cuando es absorbida por una molécula produce cambios en estados electrónicos que requieren más energía [37].

En una transición a un nivel electrónico más alto, una molécula puede ir desde cualquiera de varios subniveles, correspondientes a diversos estados vibracionales y rotacionales, hacia cualquiera de varios otros subniveles, el resultado es la observación de bandas anchas de absorción ultravioleta. Cuando una molécula es elevada a un nivel electrónico superior, indicamos el paso de un electrón de un orbital a otro de energía mayor. Este electrón puede ser cualquiera de los descritos: un electrón σ , uno π o uno n (un electrón no enlazante, es decir, uno de un par no compartido). Un electrón σ está firmemente sujeto, por lo que se necesita fuera del intervalo del espectrómetro usual, luz del ultravioleta lejano. Las excitaciones que aparecen en el espectro ultravioleta cercano corresponden principalmente a los estados excitados más bajos: los más estables [37].

4.5.5 Color.

El color en los alimentos es un parámetro de calidad y factor determinante en la preferencia de los consumidores ya que es un indicador de las características externas e internas, tales como la dulzura, sabor, estado de madurez para cosecha, consumo y procesamiento [5]. El color, también es un parámetro que ha sido utilizado para determinar el contenido de pigmentos ya que está correlacionado con el contenido de estos compuestos y pueden variar de acuerdo con su estado de madurez [5].

El color puede ser visto de manera diferente por cada persona debido a la percepción e interpretación subjetiva de cada individuo. La expresión verbal del color es difícil y complicada ya que incluye adjetivos como: brillante, opaco y oscuro. La percepción del color varía debido a diversos factores como la fuente luminosa, la sensibilidad de los ojos de cada persona, el tamaño del área donde son expuestos, el color del fondo donde son expuestos y el ángulo desde donde son vistos [38]. El color puede ser expresado objetivamente en términos de matiz (color), luminosidad (brillantez) y saturación (vivides). Estos atributos se describen en una carta de colores, en donde, el ángulo de color (parámetro h°) indica el color de los objetos, medido a partir del 5 eje $+a^*$ y es expresado en grados de 0° a 360° ; la luminosidad (parámetro L^*) indica la

brillantez o oscuridad de los colores, cambia verticalmente en una escala de 0 a 100 y la saturación (parámetro C^*) que indica vivides, siendo cero en el centro (opaco) y aumenta conforme se aleja del centro (vivido) como se muestra en la Figura 4.3. Los atributos del color pueden ser medidos numéricamente, para lo cual, a lo largo del tiempo se han establecido escalas y métodos de medición, creados por la Comisión Internacional del Color.

Los tres más ampliamente conocidos son el método Yxy color space, establecido en 1931, así como, el $L^*a^*b^*$ color space y $L^*C^*h^\circ$ color space, establecidos en 1976. Los cuales son usados mundialmente para la comunicación del color [38].

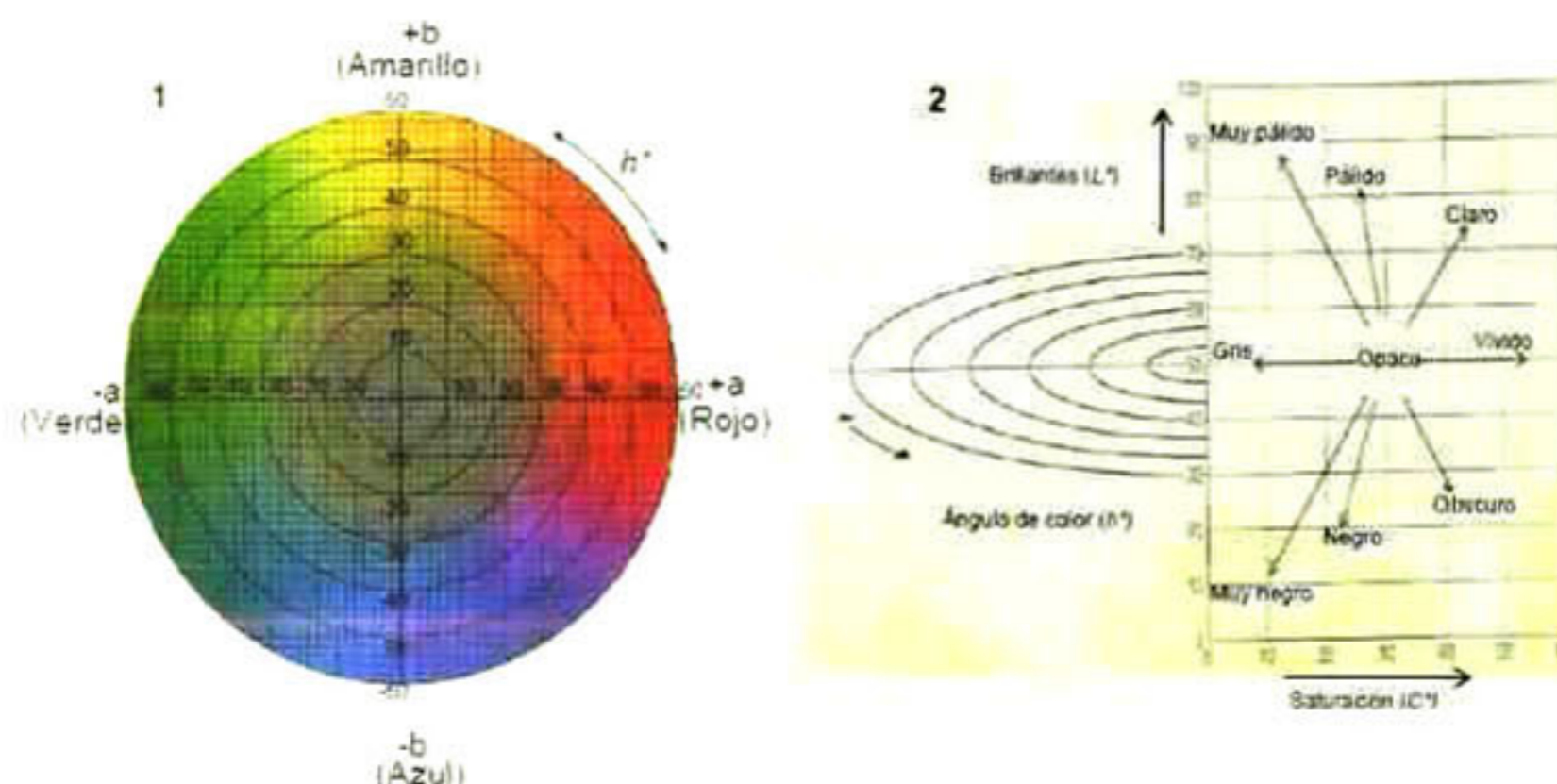


Figura 4.3 Parámetros utilizados para la descripción del color, en 1: rojo-verde (a^*), amarillo-azul (b^*), ángulo de color (h°); 2: brillantes (L^*) y saturación (C^*) [38].

4.5.6 Teoría de doble capa

El líquido más importante que existe es el agua, es por eso que debido a su constante dieléctrica es un buen solvente para iones. Por esta razón muchas superficies en agua están cargadas. Los diferentes procesos que pueden llevarse a cabo para la carga pueden ser que los iones absorban una superficie o se disocian de una superficie. Una proteína, puede por instancia, exponer un grupo amino en esta superficie. Esta puede protonarse y por lo tanto cargarse positivamente, mientras que los óxidos se cargan negativamente en agua durante la disociación de un protón de la superficie de un

grupo hidroxilo, su superficie se carga a causa de un campo eléctrico. Este campo eléctrico atrae counteriones (ión móvil). La capa de carga superficial y el contrarrestar los iones es llamado la teoría de doble capa eléctrica. En el modelo más simple, los counteriones son atraídos directamente a la superficie y neutralizan la carga superficial como en un plato capacitor [10].

Cuando el campo eléctrico generado por las cargas superficiales está cortamente limitado al grosor de una capa moléculas se llama ley de Helmholtz. En las bases del cuadro de Helmholtz uno puede interpretar algunos de los rasgos básicos de las cargas superficiales, pero el modelo falla para explicar una de las principales propiedades que pueden ser fácilmente medidas: la capacitancia de una doble capa [10].

En los años 1910-1917, Gouy y Chapman fueron un paso más lejos. Ellos tomaron en cuenta el movimiento térmico de los iones. Las fluctuaciones térmicas tienden a manejar los counteriones fuera de la superficie y se da la formación de una capa difusa, la cual se extiende a una capa molecular. Para el caso simple de un plano cargado negativamente, la cual se observa en la figura 4.4. Gouy y Chapman aplican su teoría de la doble capa eléctrica a superficies planares. Después Debye y Hückel calcularon el potencial y la distribución iónica alrededor de superficies esféricas [10].

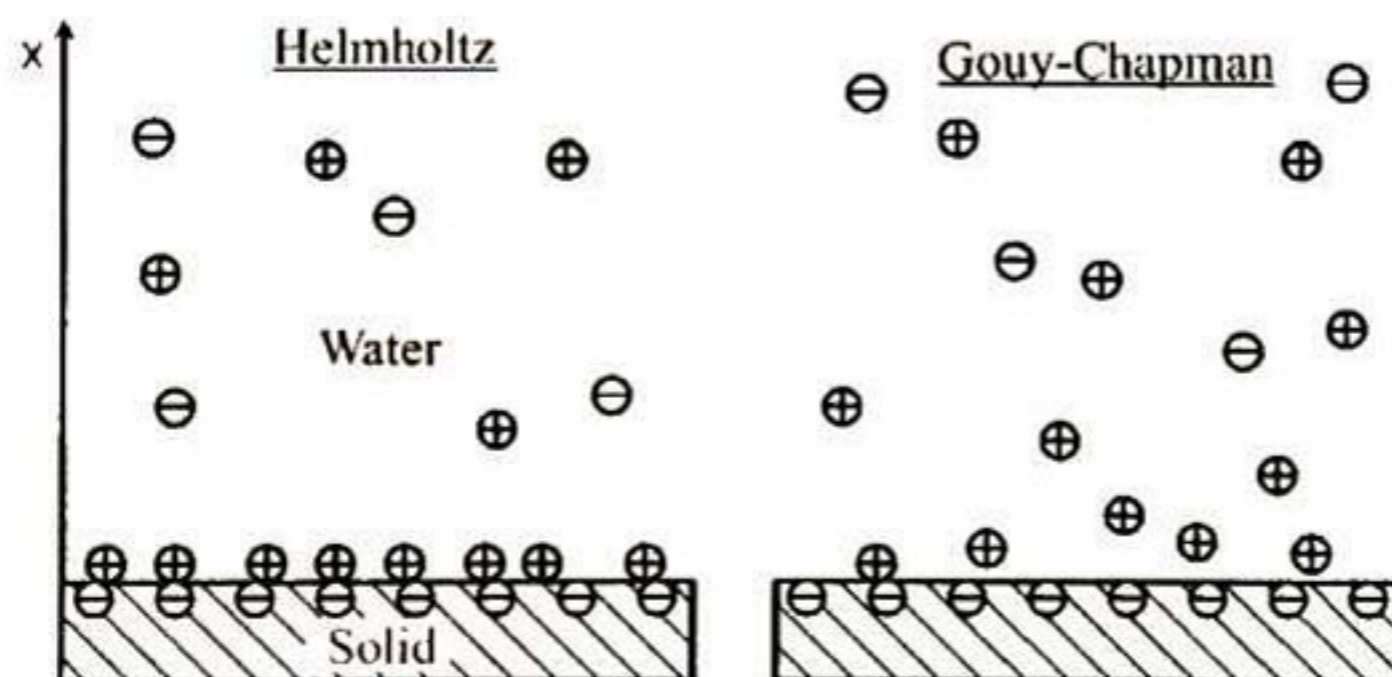


Figura 4.4 Modelo de la doble capa eléctrica de Helmholtz y Gouy-Chapman.

Después Stern combina las ideas de Helmholtz y la ley de difusión. En la teoría de Stern, tomamos un pragmático aunque un tanto artificial, aproximación y división de la doble capa en dos partes: una parte inerte, la ley de Stern, y en otra parte la ley de difusión. Esencialmente la ley de Stern es la ley de los iones y es directamente absorbida a la superficie la cual es inmóvil. En contraste, la ley de Gouy-Chapman consiste en los iones móviles que obedece a la estadística de Poisson-Boltzmann. El potencial en el punto donde la unión a la ley de Stern termina y la ley de difusión móvil empieza es el potencial zeta (ζ potencial) [10].

El potencial zeta es una medida utilizada frecuentemente en la química coloidal. Esta nos indica el potencial necesario para poder penetrar la capa iónica que se encuentra alrededor de una partícula, con la finalidad de desestabilizar a esta. Así podemos decir, que el potencial zeta es considerado una potencia electrostática que hay entre las capas que se encuentran situadas en torno a la partícula.

El potencial zeta, el cual se expresa bajo la letra ζ , se utiliza también, en la electroforesis, la cual se encarga de medir el movimiento que realizan las partículas en un coloide, cuando se encuentran bajo la influencia de un campo magnético bajo.

En el modelo de doble capa, se conoce como potencial zeta, al punto donde se unen las dos capas, la capa difusa y la capa Stern. Debido a que en dicho modelo no podemos medir la carga superficial, ni tampoco el potencial, utilizamos el potencial zeta como medio útil y efectivo de medida para controlar al coloide en cuestión, pues consigue indicar los posibles cambios que se producen en el potencial de la superficie, así como en las fuerzas de repulsión existente entre los coloides. [10].

Existe una relación destacable entre el potencial zeta y el potencial de superficie, relación que depende de la cantidad de iones presentes en la solución. Así por ejemplo, en el caso del agua, la doble capa provoca que el potencial zeta tenga una aproximación aceptable del potencial de superficie. [10].

Cabe recordar que la capa Stern, en el modelo de la doble capa, hace referencia a la atracción que sufre el coloide negativo de la solución, la cual inicialmente provoca que algunos iones positivos se dispongan conformando una capa rígida, la cual se sitúa rodeando la superficie del coloide. Dicha capa rígida es lo que conocemos como capa Stern.

El modelo de doble capa se utiliza frecuentemente, para visualizar el entorno o atmósfera iónica que se encuentra en las proximidades de un coloide cargado, además de para explicar el funcionamiento de las fuerzas de repulsión eléctricas. El modelo de doble capa se entiende como una serie de etapas que tienen lugar en torno al coloide negativo, cuando los iones que se encuentran neutralizando las cargas, son separados improvisadamente [10].

Hay iones positivos que se encuentran atraídos por el coloide negativo, pero que a la vez son rechazados por la capa Stern, al mismo tiempo que otros iones con igual carga, intenta acercarse al nombrado coloide, hecho que crea un cierto equilibrio dinámico. Este equilibrio existe como resultado de la formación de una capa, conocida como difusa, de contraiones (iones que acompañan a los iones con la finalidad de mantener la neutralidad en sus cargas), los cuales tiene una presencia alta en la superficie, concentración que va disminuyendo a medida que se agranda la distancia, hasta conseguir de nuevo un equilibrio [10].

4.5.7 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

Es una magnitud que establece la relación (cociente) entre la tensión y la intensidad de corriente. Tiene especial importancia si la corriente varía en el tiempo, en cuyo caso, ésta, la tensión y la propia impedancia se describen con números complejos o funciones del análisis armónico. Su módulo (a veces impropriamente llamado impedancia) establece la relación entre los valores máximos o los valores eficaces de la tensión y de la corriente. La parte real de la impedancia es la resistencia y su parte imaginaria es la reactancia [17].

El concepto de impedancia generaliza la ley de Ohm en el estudio de circuitos en corriente alterna (AC). El término fue acuñado por Oliver Heaviside en 1886. En general, la solución para las corrientes y las tensiones de un circuito formado por resistencias, condensadores e inductancias y sin ningún componente de comportamiento no lineal, son soluciones de ecuaciones diferenciales. Pero, cuando todos los generadores de tensión y de corriente tienen la misma frecuencia constante y sus amplitudes son constantes, las soluciones en estado estacionario (cuando todos los fenómenos transitorios han desaparecido) son sinusoidales y todas las tensiones y corrientes tienen la misma frecuencia que los generadores y amplitud constante. La fase, sin embargo, se verá afectada por la parte compleja (reactancia) de la impedancia [17].

Es conocido como dieléctrico el material que tiene propiedades tales que lo hacen un mal conductor de electricidad esta es una de las razones por las cuales puede ser utilizado como aislante eléctrico. Si el dieléctrico es expuesto a un campo eléctrico externo puede llegar a establecer un campo eléctrico interno en él. A diferencia de los materiales aislantes con los que suele confundirse se puede afirmar que todos los materiales que son considerados dieléctricos son aislantes pero vale aclarar que no todos los materiales aislantes pueden ser dieléctricos. Algunos de los ejemplos que podemos poner de este tipo de materiales son el vidrio, la cerámica, la goma, la mica, la cera, el papel, la madera seca, la porcelana y la baquelita. En cuanto a los gases se usan como dieléctricos más comúnmente el aire y en otros casos el nitrógeno.

Para el cálculo de la constante dieléctrica, nos basamos en el espectro de Nyquist de impedancia simple, el cual es esencialmente un semicírculo como el de la figura, de los valores de R_S , R_P y ω puede ser obtenido un procedimiento de ajuste de un circuito equivalente fácilmente [17].

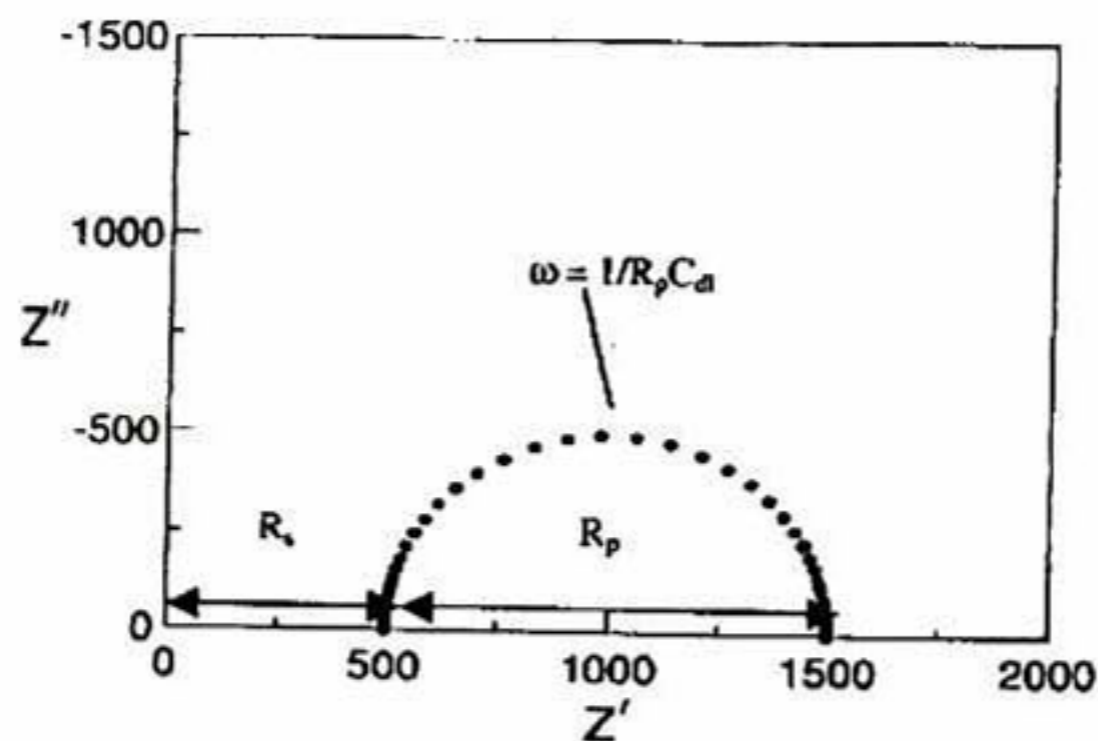


Figura 4.5 Estimación de los parámetros de circuito de un espectro de Nyquist

A partir de ello, obtenemos la capacitancia del dieléctrico, el cual es punto clave para la obtención de la constante dieléctrica del sistema.

4.5.8 Dispersión de Luz Dinámica

DLS es una técnica óptica ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios y de PSDs de coloides poliméricos con partículas de tamaño submicrométrico [14]. Básicamente, el instrumental empleado consiste en:

- Una fuente de luz láser monocromática que incide sobre la una solución muy diluida del látex a analizar
- Un fotómetro posicionado a un dado ángulo de detección, θ , medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, y que colecta la luz dispersada por las partículas
- Un correlador digital que conjuntamente con un software específico, permiten obtener la función de autocorrelación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo.

Para diferentes valores del retardo de tiempo, K . La PSD se obtiene por inversión numérica del modelo matemático que describe el fenómeno de dispersión de luz, dado por la teoría de Mie [14].

V. JUSTIFICACIÓN

A través del tiempo los colorantes usados en la industria han generado distintas afectaciones en el ambiente y en la salud, sin embargo no es posible dejar de lado a tan importante factor en la industria alimenticia, textil y cosmetológica, ya que gracias a ellos los productos son atractivos a la población.

Actualmente la mayoría de estos colorantes son de origen sintético, los cuales contienen moléculas con gran cantidad de grupos bencílicos, los cuales se tiene conocimiento que afectan a las células del cuerpo humano generando cáncer principalmente de estómago por su ingesta en alimentos, así como de pulmón en caso de su introducción por vía respiratoria, esto sin contar las alergias e intoxicaciones producidas por los mismos.

Una acción ante estos es disminuir el consumo de éstos reemplazándolos por colorantes naturales que se encuentran en distintos frutos y vegetales, que dado su origen no crean afectaciones en la salud, sin embargo su estabilidad da distintos factores climatológicos no permite su uso en distintas industrias, ya que los tiempos de anaquel no pueden ser cubiertos.

Sin embargo es posible reemplazarlos y no solo eso, también disminuir su impacto ambiental en los desechos industriales manipulando la molécula de los distintos colorantes naturales y poder recuperarlos en la industria alimentaria, o en algunos casos buscar una aplicación en otras industrias de aplicación de estos colorantes.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Estabilizar el colorante natural betalaina extraído de distintos frutos de la región del bajo por medio de partículas cerámicas para mejorar la resistencia a la degradación y poder ser utilizado en sustitución de colorantes artificiales en diferentes industrias.

6.2 Objetivos Específicos

- Selección y extracción del colorante de distintos productos regionales.
- Establecer el método estándar de reacción para la estabilización del colorante de las distintas variedades.
- Pruebas de estabilidad a la temperatura, radiación y pH
- Caracterización del colorante por espectrometría UV, potencial ζ , colorimetría $L^*a^*b^*$.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Proceso de estabilización del colorante

La metodología a emplear se encuentra basada en un trabajo anterior que por los resultados arrojados se utilizará la reacción doble descrita en la Figura 7.1:



Figura 7.1 Diagrama de flujo de estabilización del colorante

7.1.1 Extracción

Se realiza dependiendo el fruto del cual se obtendrá el colorante, por lo tanto se describen las dos formas a manejar:

Betabel

El betabel se lavó, se le cortó el tallo y se registró su peso. Aparte se calentó agua a 90°C y se sumergieron en ella, los betabeles ya pesados y lavados durante 2 minutos (proceso de escaldado). Los betabeles escaldados, se cortaron y se pasaron por un extractor de jugos. El jugo obtenido se pasó por una malla tamiz de 100 mesh, para eliminar los sólidos presentes

Garambullo

Se lavó el garambullo y se agregó el 20% del total de peso en agua al mismo, se procedió a moler en licuadora el producto, posteriormente se centrifugó para eliminar el bagazo y los residuos de semilla que no son necesarios y obtener solamente el jugo del garambullo.

7.1.2 Reacción de estabilización

La reacción se llevó a cabo en dos ocasiones utilizando el mismo método, el cual se realizó colocando en un matraz balón el alcóxido de silicio en una relación que corresponde a 1.96 ml de TEOS por cada 100 ml de extracto éste último se agregó por goteo manteniendo una agitación constante en la solución hasta que se termine de agregar todo el extracto, una vez terminado se deja agitando por una hora y se retira la reacción.



Figura 7.2 Reacción de estabilización del colorante

7.1.3 Centrifugación

Se utilizó una centrífuga de 8000 rev/seg durante un tiempo de 30 minutos, de esta manera se retiran los sólidos disueltos en el extracto, esto se realizó después de la extracción, posteriormente después de cada reacción de estabilización para retirar los sólidos que se puedan ir generando a lo largo del proceso y pudieran generar contaminación del colorante.

7.1.4 Retención de azúcar

Se deja pasar el extracto a través de una resina de intercambio iónico (Amberlita IRA 958 CI) que fue previamente analizada en la bibliografía [32] con un flujo de 32 ml/min (20 BV/hr), hasta que se tenga la retención de color, en lo cual se va dejando pasar el azúcar libre del extracto, que será recogido y eliminado una vez que se termine el procedimiento, posteriormente se utiliza cloruro de amonio 1M con un pH entre 5 y 5.5 como solución de arrastre, la cual se dejará pasar por la columna para recuperar el colorante dejando los primeros 60 ml aparte ya que se considera que es el azúcar restante que se quedó en la columna, también se puede tomar en cuenta probando la solución sobrante, en el momento que no se perciba el azúcar se hace el cambio de vaso y comenzará la recolección de color posteriormente, dejando que de acuerdo a la cantidad que se haya pasado por columna de solución de color se deben

anexar 100 ml extras de solución de cloruro de amonio 1M para poder recuperar la mayor cantidad de color posible.



Figura 7.3 Sistema de extracción de azúcar

7.1.5 Liofilización

Se lleva a cabo por un tiempo de 36 a 48 horas dependiendo la capacidad del equipo a una presión de vacío de 0.14 mbar y una temperatura de -40°C para extraer el líquido del colorante y de esta manera tenerlo en polvo y poder manipularlo para las distintas pruebas, el procedimiento de liofilización se realizó de la siguiente manera.

1. La muestra se colocó en congelación por un tiempo de 24 horas en un congelador convencional hasta que la muestra no presentara líquido alguno.
2. El equipo se enciende y programa una temperatura de -40°C y una presión de 0.14 mbar, durante un tiempo de 48 horas y se espera hasta que alcance la temperatura y presión adecuados.
3. Una vez alcanzadas las condiciones se colocan las muestras dentro de los frascos de vacío evitando el contacto con la luz y el calor y se conecta el

primero dentro de alguna de las entradas de vacío considerando que no se tengan fugas de vacío.

4. Ya colocado el frasco se espera a que se vuelva a estabilizar la presión y la temperatura para poder colocar otro frasco.
5. Una vez terminado esto se protegen los frascos de la luz con papel aluminio y se deja por 48 horas.
6. Cuando termina el procedimiento, se cierran las válvulas de vacío de los frascos retirándolos del equipo y se raspará el colorante de las paredes para recuperarlo y guardarlo para su posterior análisis.



Figura 7.4 Equipo de Liofilización

7.2 Colorimetría

La determinación del color se realizará de acuerdo con la metodología ASTM D1925 (ASTM, 1995). Se evaluará con un Colorímetro Portátil MiniScan Hunter Lab (Reston, Virginia, EUA), que mide el color de las superficies, simulando la luz del día iluminando C. El principio se basa en registrar la intensidad de la luz absorbida por el color negro y la reflejada por el color blanco, así como la descomposición de la luz en los colores: rojo, azul, amarillo y verde.



Figura 7.5 Equipo Hunter L*a*b*

El método se basa en la determinación por reflexión de la luz, de tres parámetros, “L” que mide el grado de luminosidad y varía de 100 para el blanco perfecto a 0 para el negro, “a” y “b”, son indicativos de la cromaticidad, los valores positivos de “a” están relacionados con el color rojo y los negativos con el color verde; mientras que los valores positivos del parámetro “b” están asociados con el color amarillo y los negativos con el azul. Las mediciones se realizarán en dos muestras y en diferentes puntos de ella, se utilizará como referencia una teja blanca, proporcionada por el proveedor.

7.3 Pruebas de estabilidad a luz UV.

De acuerdo a la Norma ASTM D4329, se realizaron disoluciones de 100 mg de colorante en 100 ml de agua acidulada y se tomaron alícuotas de 5 ml y fueron sometidas a radiación ultravioleta con una longitud de onda de 340 nm durante un tiempo de exposición de 30 min.



Figura 7.6 Radiación de la muestra

7.4 Pruebas de estabilidad a la temperatura.

Se realizaron disoluciones de 100 mg de colorante en 100 ml de agua acidulada y se tomaron alícuotas de 5 ml y se sometió a calentamiento de 80°C en baño maría durante 1 minuto hasta completar un total de 8 mediciones.

7.5 Pruebas de estabilidad al pH.

Se realizaron disoluciones de 100 mg de colorante en 100 ml de agua acidulada y Se tomaron alícuotas de 10 ml por muestra y se agregó Hidróxido de amonio con un pH de 14, gota a gota agitando en cada agregado de solución hasta llegar a un total de 10 mediciones.



Figura 7.7 Adición y registro de pH de la muestra

7.6 Cuantificación de color rojo, betanina

Esta prueba fue realizada para los colorantes tanto en su forma natural como la modificada y representa el porcentaje en peso de color rojo de betanina en la betalaina, este porcentaje se obtiene tomando 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 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) para betanina; 1120 L/gr-cm [40], la longitud de la celda medida en cm(L) y el peso de la muestra en gramos (W), lo cual se toma de la siguiente manera:

$$A = A_{536\text{ nm}} * 1.095$$

(Ecuación 5.1)

$$B = A * 0.009018 \quad \text{(Ecuación 5.2)}$$

$$C(g/L) = B * \text{Factor de dilución} \quad \text{(Ecuación 5.3)}$$

$$D(g) = C(g/L) * \text{Volumen del extracto} \quad \text{(Ecuación 5.4)}$$

$$\%color = \frac{D * g_{colorante} * 1000}{\text{Peso de la muestra}} * 10 \quad \text{(Ecuación 5.5)}$$

7.7 Cuantificación de azúcares reductores.

Se colocaron 5 ml de reactivo de Fehling A y 5 ml de reactivo de Fehling B y 50 ml de agua destilada en un matraz, mientras tanto se coloca en la bureta una solución de glucosa de 1.6 gramos por 100 ml.

Se calienta a punto de ebullición en la parrilla y se agita constantemente con un movimiento giratorio para evitar proyecciones de líquido. Se deja caer la solución azucarada gota a gota manteniendo el líquido en ebullición y movimiento. Evitar el agregado de gran volumen de líquido que enfríe el Licor de Fehling y provoque la formación de un precipitado coloidal amarillo de óxido cuproso y difícil sedimentación. La operación está terminada desde el momento en que el líquido sobrenadante sea completamente incoloro, en este momento se agrega el gasto de glucosa (G) y se halla el título del Licor de Fehling:

$$T = \left(\frac{1.6 \text{ gr de glucosa}}{100 \text{ ml}} \right) * G \quad \text{(Ecuación 5.6)}$$

Una vez obtenido el título se procede a la determinación sobre la muestra. Para esto se coloca la muestra en la bureta y se prepara el Licor de Fehling como se mencionó anteriormente, se deja caer gota a gota hasta que se tenga el cambio de color del licor de Fehling, considerando que el punto se determina dependiendo la muestra ya que al reaccionar con monosacáridos, se torna verdoso; si lo hace con disacáridos, toma el

color del ladrillo y una vez obtenido el gasto de muestra para decolorar el Licor de Fehling (G'), se procede de la siguiente forma:

$$x = \left(\frac{100 \cdot T}{G'} * F \right) \text{ gaz}/100\text{ml} \quad \text{(Ecuación 5.7)}$$

Donde F es el factor de disolución de la muestra en caso de ser necesario.

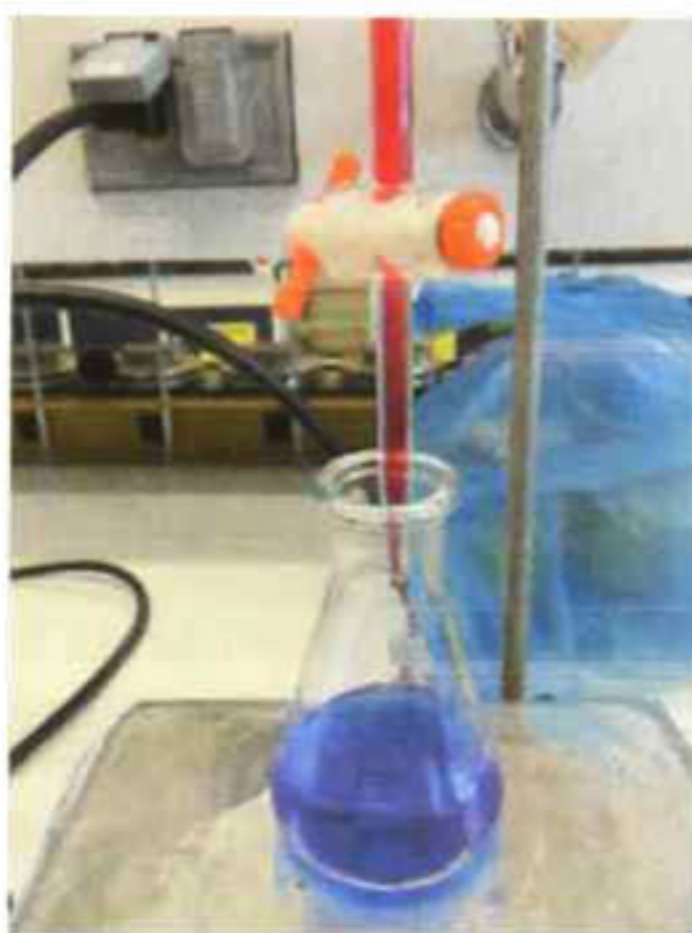


Figura 7.8 Prueba de análisis de azúcares reductores.

7.8 Cuantificación de los polifenoles totales

El método fue el de Folin y Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi (1965) [48]. Donde primero se considera la preparación de la solución de ácido gálico (solución stock). Se pesan 12 mg de ácido gálico y se aforan con agua a 100 ml. En frascos pequeños hacer diluciones de la solución stock teniendo un volumen final de 2 ml.

Tabla 7.1 Concentraciones para la curva estándar de compuestos fenólicos

Concentración (mg/100 mL)	Stock ml	Agua ml
12	2.000	0.000
10	1.667	0.333
8	1.333	0.667
6	1.000	1.000
4	0.667	1.333
2	0.333	1.667
0	0.000	2.000

De cada extracto se toman 0.2 ml y agregan 0.2 ml de reactivo Folin – Ciocalteu y agitar. Añadimos 2ml de Na_2CO_3 al 7%, agitar y agregar 2.6 ml de agua. Incubar por una hora. Leer a 750 nm en el espectrómetro.

Para la disolución de la muestra se toma una alícuota de 2.5 ml de la muestra y aforamos con agua a 25 ml. Tomar 0.2 ml del extracción y agregar 0.2 ml de reactivo Folin – Ciocalteu y agitar. Añadir 2ml de Na_2CO_3 al 7%, agitar y agregar 2.6 ml de agua. Incubar por una hora. Leer a 750 nm en el espectrómetro. Los resultados obtenidos se expresaran como mEq de ácido gálico/g de muestra

7.9 Medición de la actividad antioxidante (DPPH)

La actividad antioxidante se determino por el método de DPPH desarrollado por Brand-William et al. (1995) [57]. Se pesan 25 mg de ácido ascórbico y aforar a 100 ml con MeOH al 80%. Forrar tanto el matraz como el vaso donde se va a pesar con papel aluminio. La muestra stock se realiza con ácido ascórbico, se coloca en viales tomando en cuenta las siguientes cantidades.

Tabla 7.2 Concentraciones para curva estándar de
Actividad antioxidante

Concentración (mg/100 mL)	Stock (ml)	MeOH al 80% (ml)
25	2.000	0
21	1.680	0.320
17	1.360	0.640
12.5	1.000	1.000
9	0.720	1.280
5	0.400	1.600
0	0	2.000

Se agregara a un matraz de 25 ml 5 ml de muestra y se aforara a 25 ml con agua destilada. Pesar de DPPH 3.9 mg. Es importante evitar el contacto con la luz con el reactivo. Aforar a 100 ml con MeOH al 80%, cubrir el matraz y el vaso de precipitado donde va a pesar con el papel aluminio y cubrir por completo. Sonicar 10 min.

Preparar las celdas colocando 100 µl de los viales con las diluciones de la muestra stock para la curva estándar, así como del extracto obtenido de la muestra. Colocar 2.900 ml de DPPH en las celdas, hacerlo en la oscuridad total. Reposar 30 min contando a partir de la primera muestra a la que se le agregara DPPH. Colocar en el espectrofotómetro el blanco (MeOH al 80%) y comenzar a medir las muestras a 517 nm. Reportar como mEq de ácido ascórbico/L.

7.10 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

Se realizaron con una celda para la medición de impedancia en líquidos. La celda consta de dos electrodos, los cuales tienen un diámetro de 2 cm aprox., dichos electrodos están recubiertos con teflón. A partir de la mínima separación entre los electrodos (d) y después se determina su constante dieléctrica.



7.11 Dispersión de Luz Dinámica

La prueba se llevó a cabo con un equipo marca Brookhaven modelo BI200SM, el cual permite hacer Dispersión de Luz Dinámica a diferentes ángulos, se trabajó a un ángulo de 90° para que el volumen dispersor fuera mínimo. El equipo cuenta con un correlador digital de alta velocidad PCI-BI9000AT que permite analizar muestras con un tamaño de partícula desde 5 nm hasta 2 micras, la fuente de luz del equipo de dispersión es un láser de He-Ne de 35 mW modelo 9167EB-1 marca Melles-Griot.

7.12 Potencial ζ

Se llevo a cabo en un equipo marca Colloidal Dynamics modelo AcoustoSizer II, se trabajó con las 4 muestras disueltas en agua desionizada en una relación 5% en peso para un volumen de 30 ml, se realizaron 3 mediciones para la obtención del potencial ζ . Una vez que se han determinado los parámetros a manejar procedemos al análisis de los resultados.

7.13 Análisis Estadístico

Los resultados de cada análisis se presentaron como media \pm error estándar. Se realizaron tres observaciones ($n=3$). Los resultados fueron sujetos a análisis de varianza para determinar si existieron diferencias significativas entre las medias para cada ensayo. La comparación de medias entre las cuatro muestras se realizó por el método de Duncan utilizando SAS 9.0V Copyright © 1989 - 2012 SAS Institute Inc.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1 Colorimetría

El análisis de las muestras se realizó tomando tres medidas del sistema para poder obtener un promedio de datos del color, de los cuales se puede observar de acuerdo a la tabla 8.1 que el betabel natural tiene una tendencia principalmente hacia el color rojo en a^* y hacia el amarillo en b^* con una luminosidad muy alta que en comparación con el colorante estabilizado es mayor que por el proceso de estabilización disminuye sus valores en 8.12% dando una alta pérdida de color, que se ve afectado por la pérdida de color rojo.

Tabla 8.1 Promedio de datos obtenidos de color.

MUESTRA	L	a	b	E
Betabel	4.87 ± 0.145^B	7.32 ± 0.57^B	2.2 ± 0.238^A	9.08 ± 0.357^B
Betabel estabilizado	1.94 ± 0.145^C	-0.043 ± 1.10^D	0.41 ± 0.242^C	2.18 ± 0.317^D
Garambullo	9.93 ± 0.064^A	15.32 ± 0.121^A	1.34 ± 0.111^B	18.31 ± 0.074^A
Garambullo estabilizado	3.8 ± 0.174^D	5.12 ± 0.513^C	1.12 ± 0.324^B	6.49 ± 0.27^C

A pesar de esto el garambullo presenta una mayor tendencia hacia el rojo en a^* con respecto al betabel y aunque se tiene una menor tendencia a los amarillos en b^* , para este trabajo no tiene trascendencia por el enfoque que se está manejando, a todo esto el garambullo estabilizado una disminución del 11.9% con respecto al natural, lo cual está principalmente afectado por la brillantez de la muestra L y la pérdida de color rojo, esto se puede observar más claramente en la figura 8.1.

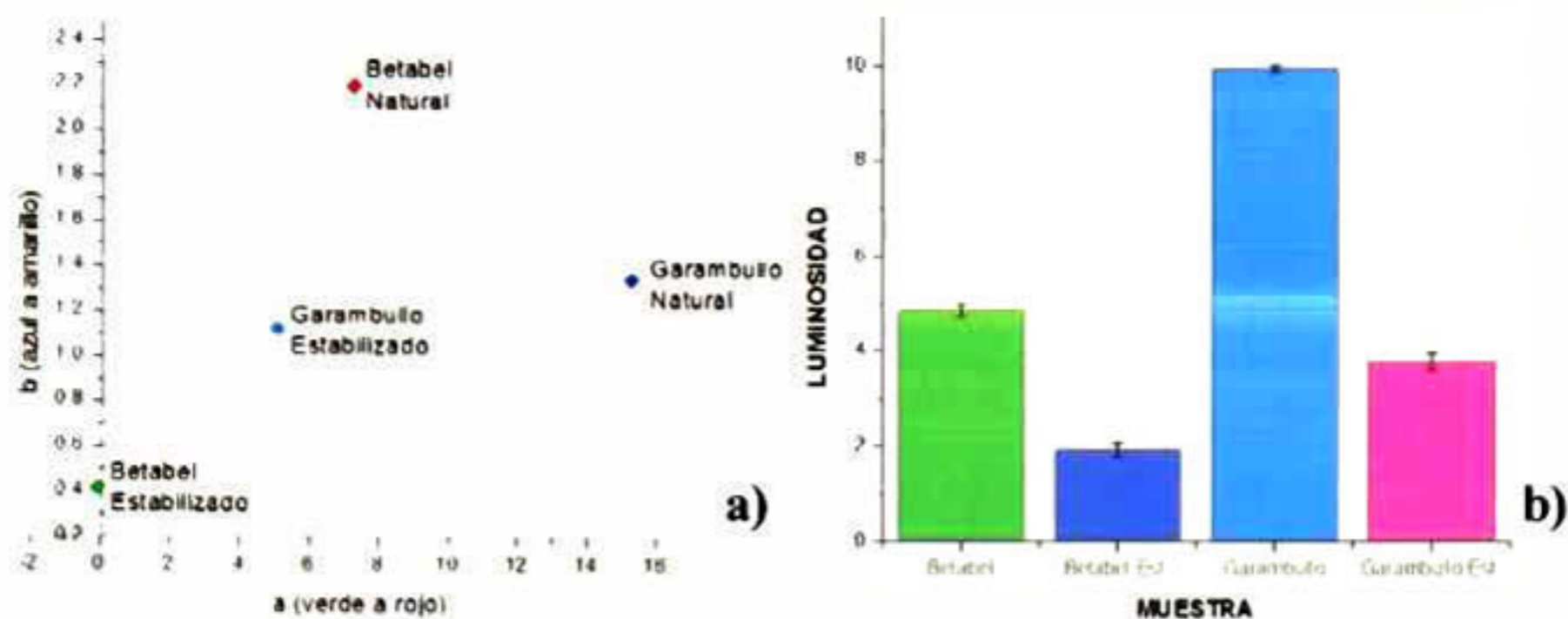


Figura 8.1. a) Gráfico de color a*, b* y b) Gráfico de Luminosidad

A partir de estos datos, se realizaron los cálculos de Tono y Cromaticidad para poder notar mejor las diferencias en color de las películas de acuerdo al almidón utilizado.

$$\text{Tono}(h^{\circ}) = \tan^{-1} \frac{b}{a} \quad \text{(Ecuación 5.1)}$$

$$\text{Cromaticidad}(C^*) = (a^2 + b^2)^{1/2} \quad \text{(Ecuación 5.2)}$$

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.2 donde se observa que el garambullo natural tiene valores mayores de tono (h°) y cromaticidad (C^*) a comparación de las otras muestras, aunque se presenta afectación en el garambullo estabilizado por el proceso, es menor a la presentada en el betabel estabilizado.

Tabla 8.2 Promedio de datos obtenidos de color

MUESTRA	h° (x)	C^* (y)
Betabel	3.22 ± 0.594^B	3.08 ± 0.080^B
Betabel estabilizado	-8.75 ± 3.00^B	0.60 ± 0.384^D
Garambullo	11.35 ± 1.011^B	4.08 ± 0.018^A
Garambullo estabilizado	4.48 ± 2.073^A	2.49 ± 0.089^C

Podemos observar en la figura 8.2 que el sistema que maneja una mayor semejanza al betabel natural utilizado actualmente en la industria alimentaria es el garambullo estabilizado que por lo mismo abre una posibilidad a su aplicación en esta misma.

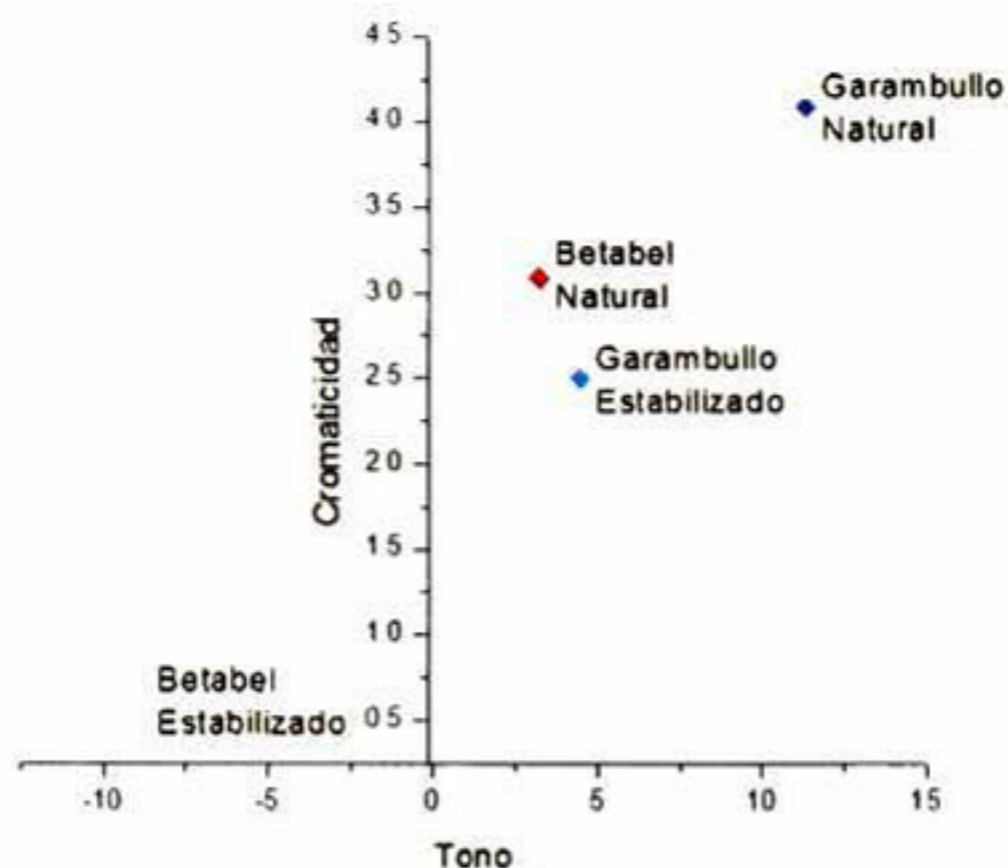


Figura 8.2 Gráfico de color Tono – Cromaticidad

A partir de esto es posible buscar la estabilidad que presentan los colorantes a diversos factores que deben llevar durante un proceso industrial como en la vida diaria, esto se presenta a continuación.

8.2 Prueba de estabilidad a luz UV

La prueba fue realizada con una lámpara UV, el sistema se colocó en el centro de la lámpara y se realizaron irradiaciones con intervalos de 5 minutos para poder observar el efecto sobre la muestra y su disminución de absorbancia.

Se puede observar en la figura 8.3 que el sistema de betabel en su estado natural no presenta grandes cambios en las zonas de 480 nm y 536 nm de absorbancia, registrando una pérdida total de 10.63%, sin embargo, en la zona debajo de 400 nm se puede observar una tendencia a la linealidad por la generación de azúcar libre en la muestra sin alteraciones derivada de la radiación, en el betabel estabilizado se observa que la muestra se mantiene a lo largo del sistema sin alteraciones significativas a lo

largo de la prueba mostrando una pérdida de 4.01% menor a lo reportado por el betabel natural.

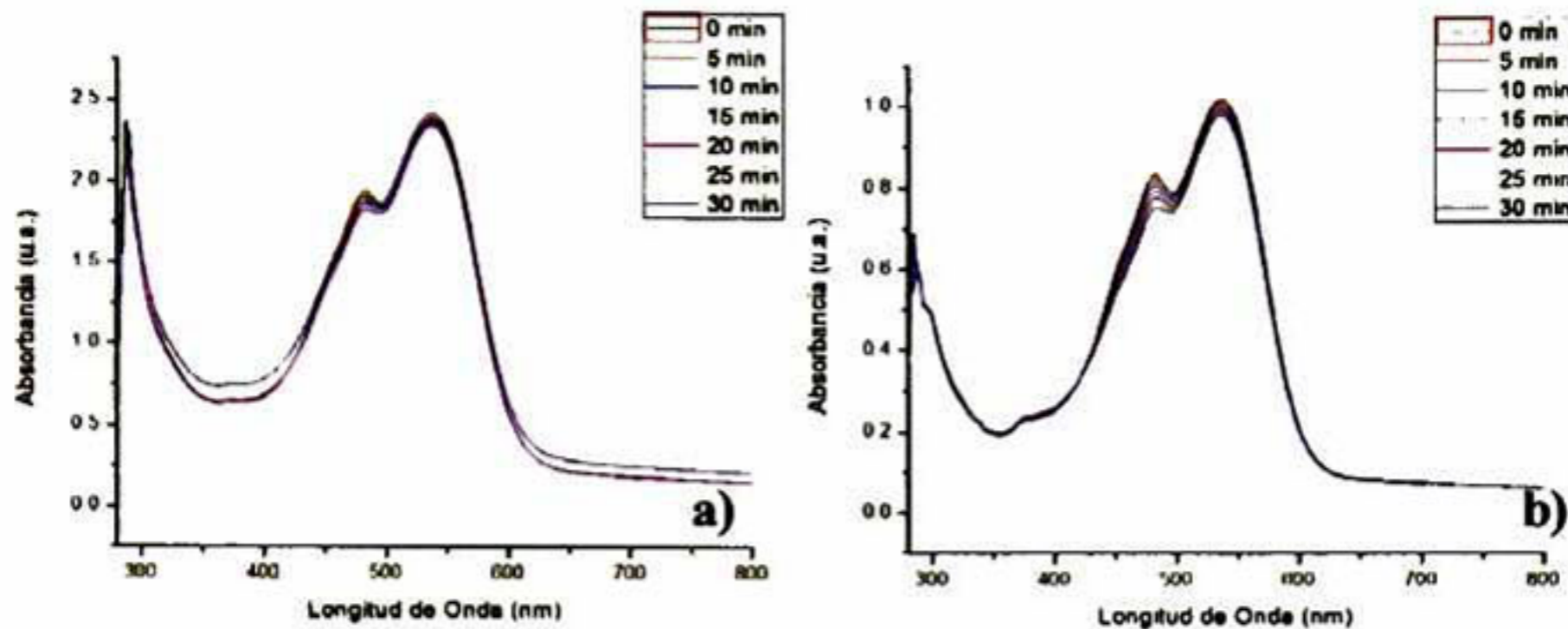


Figura 8.3 Efecto de la radiación UV a) betabel natural b) betabel estabilizado.

Mientras que la muestra de garambullo natural presentó durante la prueba un precipitado blanco que fue generado por la radiación y se asume que es azúcar libre de la muestra y en la figura 8.4 se puede observar que la caída en esta muestra es de 43.59%, lo cual marca una degradación fuerte debido a la cantidad de azúcares que contiene, mientras que el garambullo estabilizado no presenta afectaciones visibles en el sistema aunque haciendo el análisis de la gráfica se tiene una caída de 3.62% esta es la menor de las cuatro muestras demostrando una gran resistencia a la radiación UV.

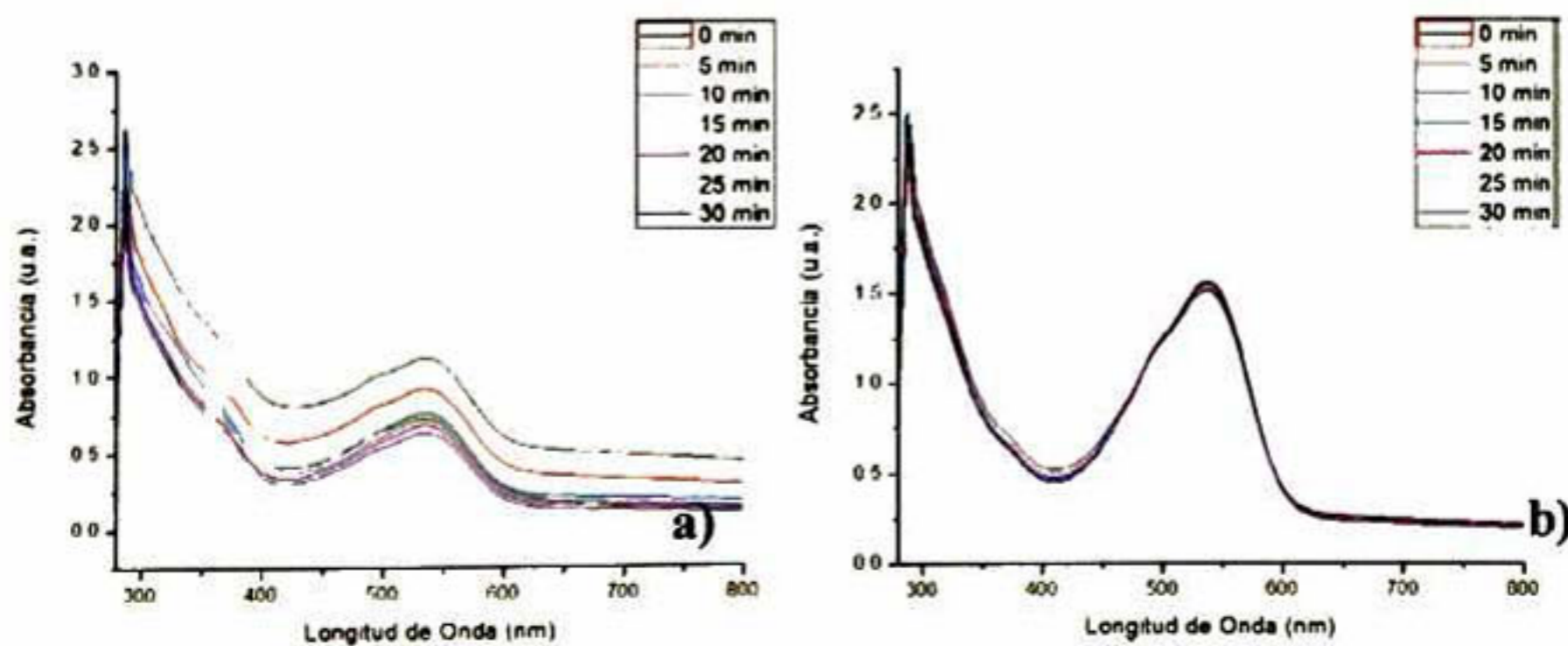


Figura 8.4 Efecto de la radiación UV a) garambullo natural, b) garambullo estabilizado.

Esto muestra que debido al proceso de estabilización, la betalaína puede resistir exposiciones prolongadas a la luz sin sufrir variaciones significativas.

8.3 Prueba de estabilidad al pH

Durante esta prueba se realizaron un total de 10 mediciones para poder llevar la muestra hasta el punto de hidrólisis del sistema, el cual de acuerdo a la figura 8.5 se comenzó a generar a partir de la medición número 9 con un pH entre 8.5 y 9, en este punto las muestras que se encuentran en estado natural ya presentan azúcar precipitada en el vaso de precipitados, lo cual genera alteraciones en la estabilidad del colorante, mientras que en las muestras con el proceso de estabilización generado no se presenta esta clase de precipitados en la muestra.

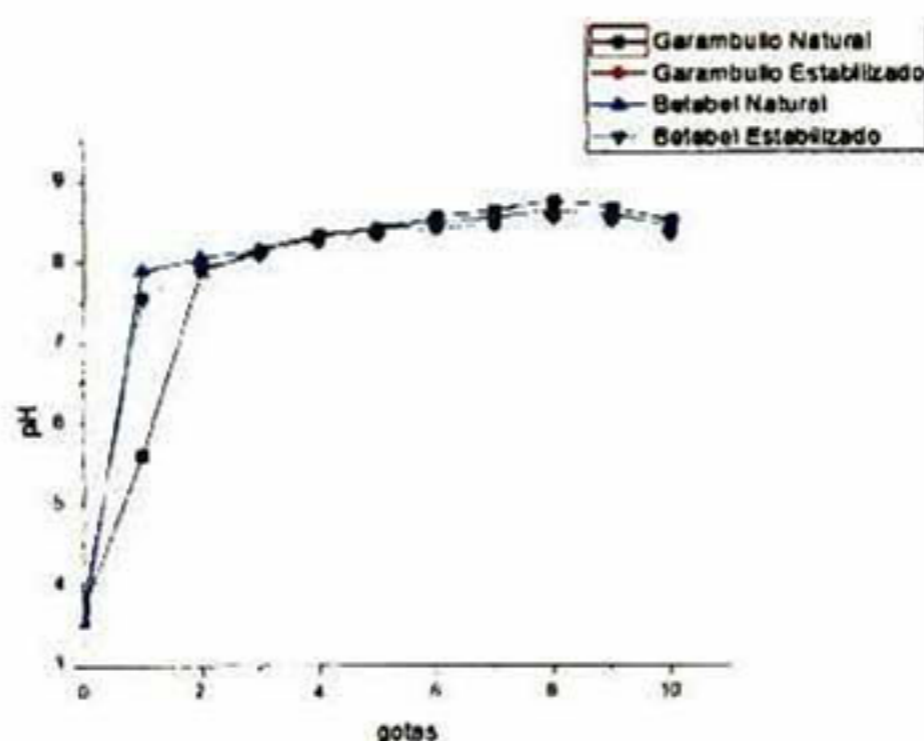


Figura 8.5. Cambio de pH a lo largo de la prueba

Con respecto al betabel se puede observar en la figura 8.6 que el betabel natural tiene una caída mucho mayor en el pico de 538 nm, dado que la betacianina solo es estable entre un pH de 3.5 a 7, dejando lugar solo para la betaxantina, se presenta una caída de 58.13% en la betacianina, mientras que en el betabel estabilizado la pérdida es menor, llegando a 21.69% del valor inicial, así se observa que la estabilidad de la betalaína del betabel se ve aumentada por la modificación química con la sílice.

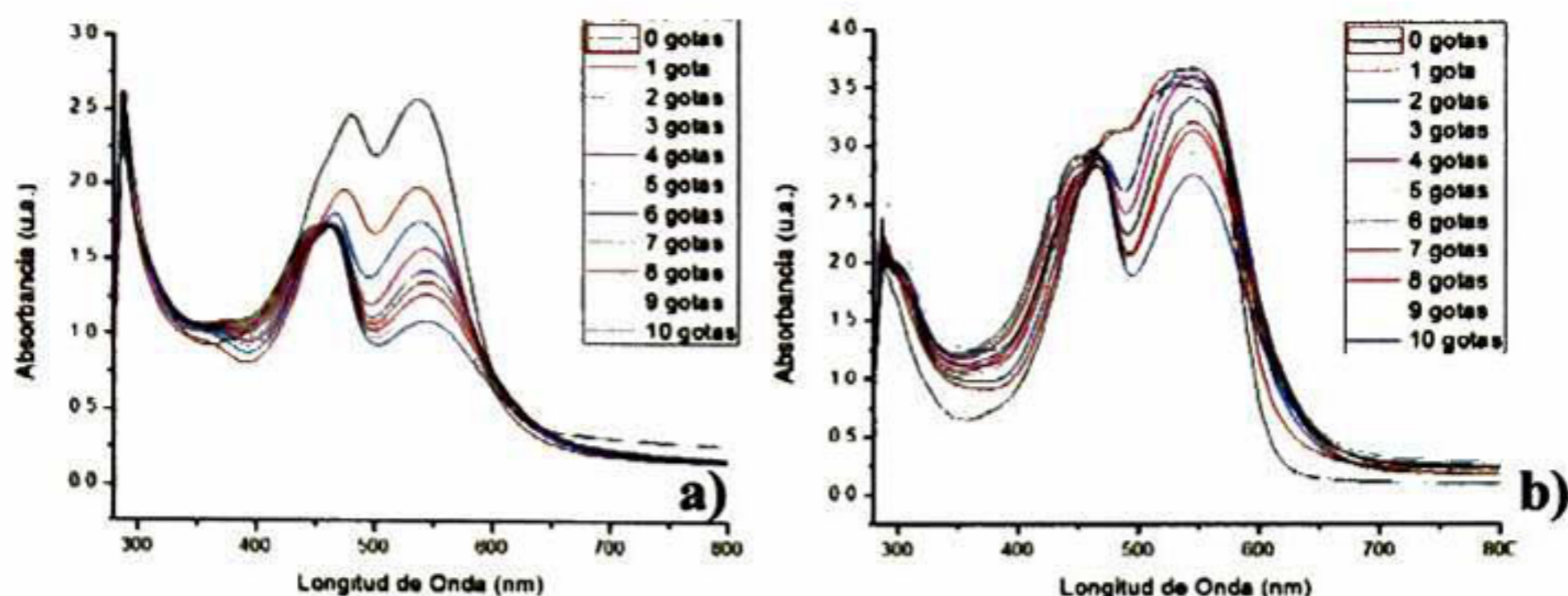


Figura 8.6. Cambio de espectro de absorbancia con respecto al pH de a) betabel natural, b) betabel estabilizado.

En la figura 8.7 se observan los comportamientos para el garambullo natural y el garambullo estabilizado, el primero presenta un comportamiento de rápida degradación, generando un aumento en los azúcares en la zona entre 280 nm y 350 nm, lo cual también puede ser apreciado en el garambullo estabilizado pero de una forma gradual, en el pico 536 nm se observa una rápida degradación de la betacianina teniendo una pérdida total de 29.34% de su valor original, que en comparación con el garambullo estabilizado que solo llega a una pérdida de color de 5.67%, dejando en claro que la estabilización del sistema es efectiva para los cambios bruscos de pH que pueden generarse en la industria de las bebidas carbonatadas.

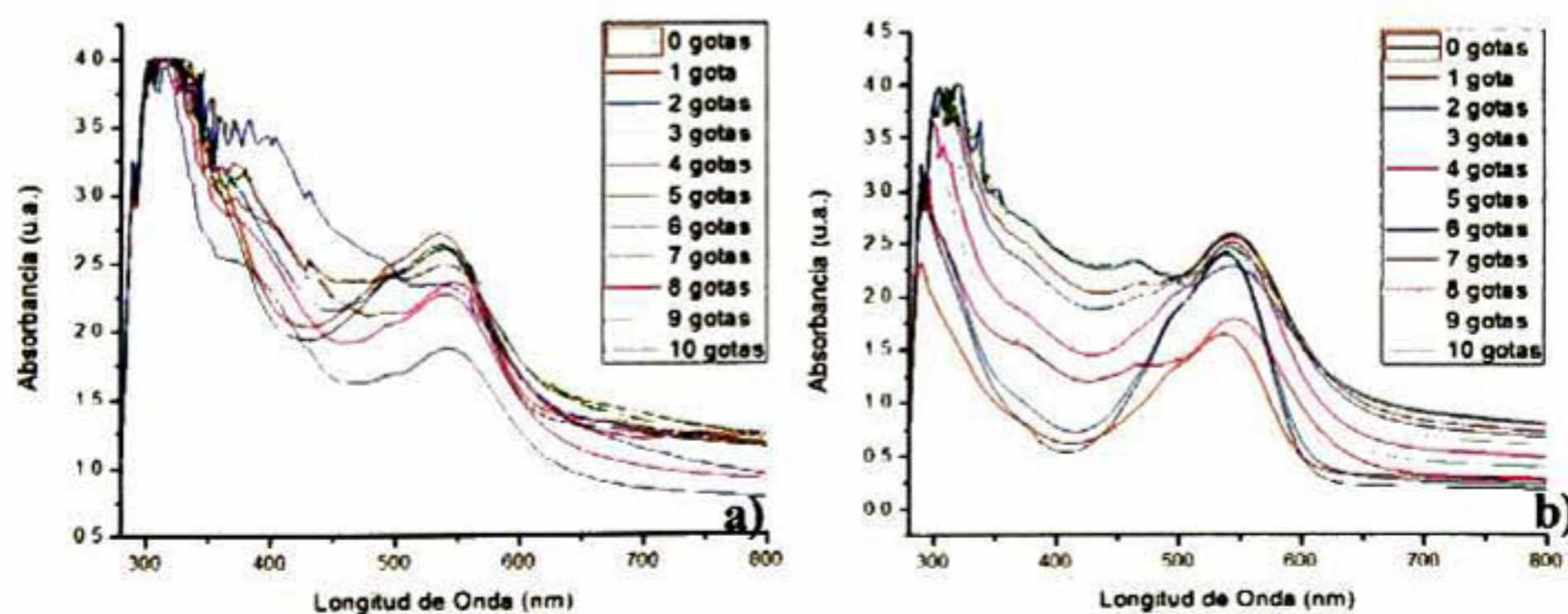


Figura 8.7. Cambio de espectro de absorbancia con respecto al pH de a) garambullo natural, b) garambullo estabilizado

Para completar estas pruebas se observará el efecto de la temperatura en las muestras en las pruebas siguientes.

8.4 Prueba de estabilidad a la temperatura

En esta prueba se realizó la medición de la absorbancia en dos formas, la primera enseguida del calentamiento de la muestra y la segunda se tomó después de dejar enfriar la muestra por 5 minutos para poder observar el efecto del enfriamiento sobre la muestra. De acuerdo a que se consideraron dos puntos de referencia, los resultados se encuentran clasificados por temperatura y por tipo de colorante como se muestra a continuación:

8.4.1 Prueba de estabilidad a la temperatura de 50°C

Se consideró esta temperatura dadas las de almacenamiento de algunos productos en bodegas o incluso por los lugares donde se acostumbra a dejar algún alimento por tanto tiempo. En los resultados para el betabel natural se puede observar en la figura 8.8 que la caída de color fue en 7.90% caliente y que no se aprecia una diferencia significativa en la muestra una vez que se deja enfriar, ya que deja un 7.9% de caída al igual que la muestra calentada, mientras que el betabel estabilizado presenta al principio una caída significativa, pero posteriormente se mantiene estable con una caída total de 1.54% debido al calentamiento que cuando se encuentra en forma fría, la muestra encuentra un equilibrio y obtiene una leve recuperación el sistema, por lo cual se observa una caída de 1.48%, con esto se observa que mejora la resistencia del sistema a la degradación por temperatura debido al debido a la reacción química del alcóxido con la molécula de betalaína.

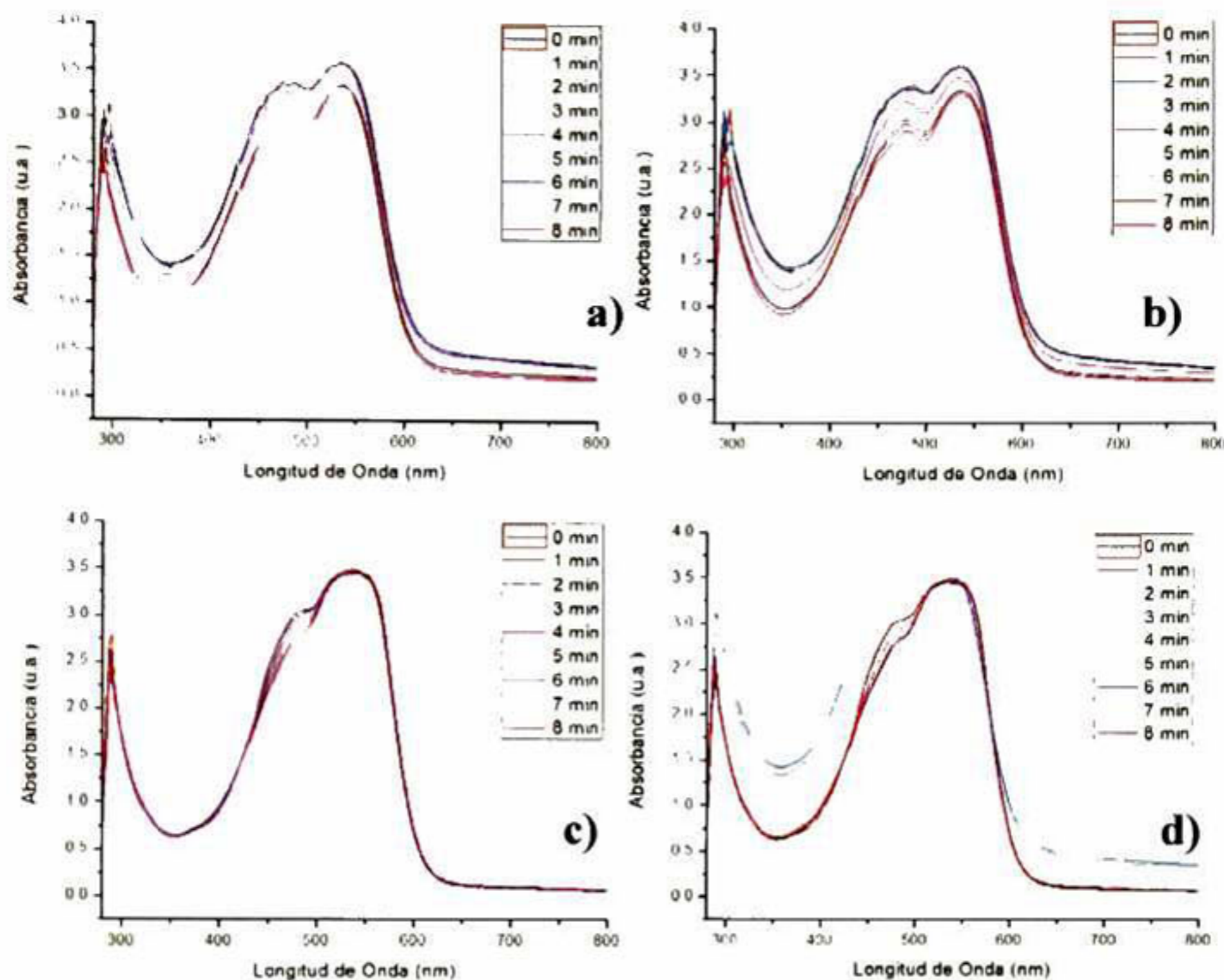


Figura 8.8. Efecto de una temperatura a 50°C sobre el colorante natural del betabel
 a) recién calentado, b) temperatura ambiente y betabel estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.

Para el garambullo en estado natural se observa en la figura 8.9 que los cambios observados en el colorante son graduales conforme se va dando el calentamiento de la muestra y se llega a una caída de 36.22% en la absorbancia debida al calentamiento y al mismo tiempo se puede observar que la generación de azúcar en la muestra es muy apreciable a lo largo de la prueba, que si es comparado con el garambullo estabilizado, no se observan cambios apreciables a simple vista, aunque se presenta una caída de 6.92% en forma calentada y 6.29% en forma fría, lo cual representa un porcentaje mucho menor que el garambullo natural, dejando entrever que el efecto de la cerámica es notable en las muestras.

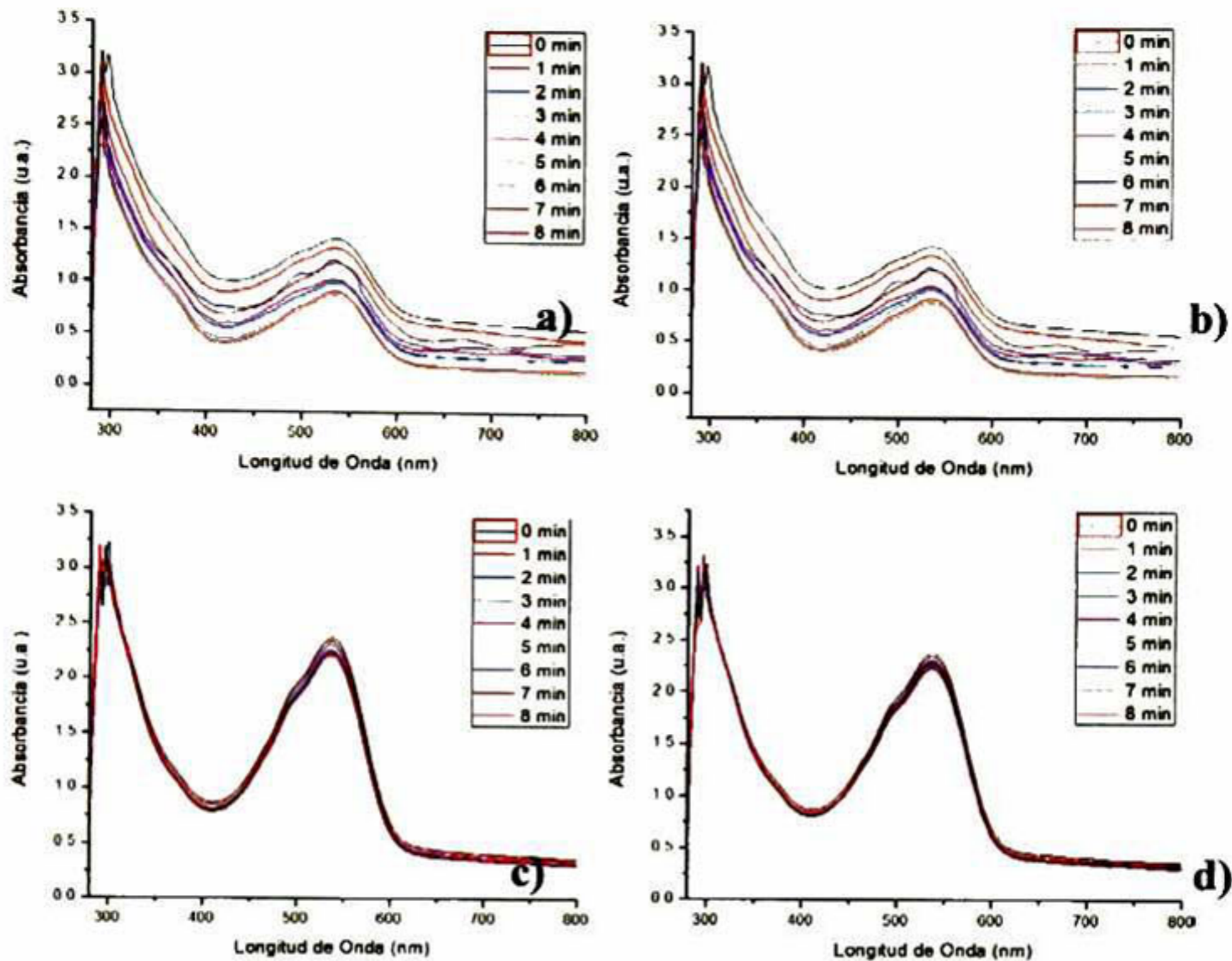


Figura 8.9. Efecto de una temperatura a 50°C el colorante natural del gambullo a) recién calentado, b) temperatura ambiente y gambullo estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.

Sin embargo es necesario trabajar a una temperatura mayor para algunos procesos donde se vean implicadas temperaturas mayores, es por eso que se trabajó a una temperatura de 80°C para poder realizar un comparativo más cercano a la realidad.

8.4.2 Prueba de estabilidad a la temperatura de 80°C

En esta temperatura se comenzó con el betabel natural, el cual en la figura 8.10 presenta mayores variaciones absorbancia que en la temperatura de 50°C , en primera instancia se observa una caída de 4.07% en la muestra calentada, la cual cuando llega al equilibrio se llega hasta una variación de 3.36%, se marca una clara recuperación de color, sin embargo se puede observar que a pesar de ello, la betacianina sufre el

cambio permanente del sistema, a diferencia de la betaxantina que se mantiene un poco más de tiempo hasta que finalmente cede el sistema.

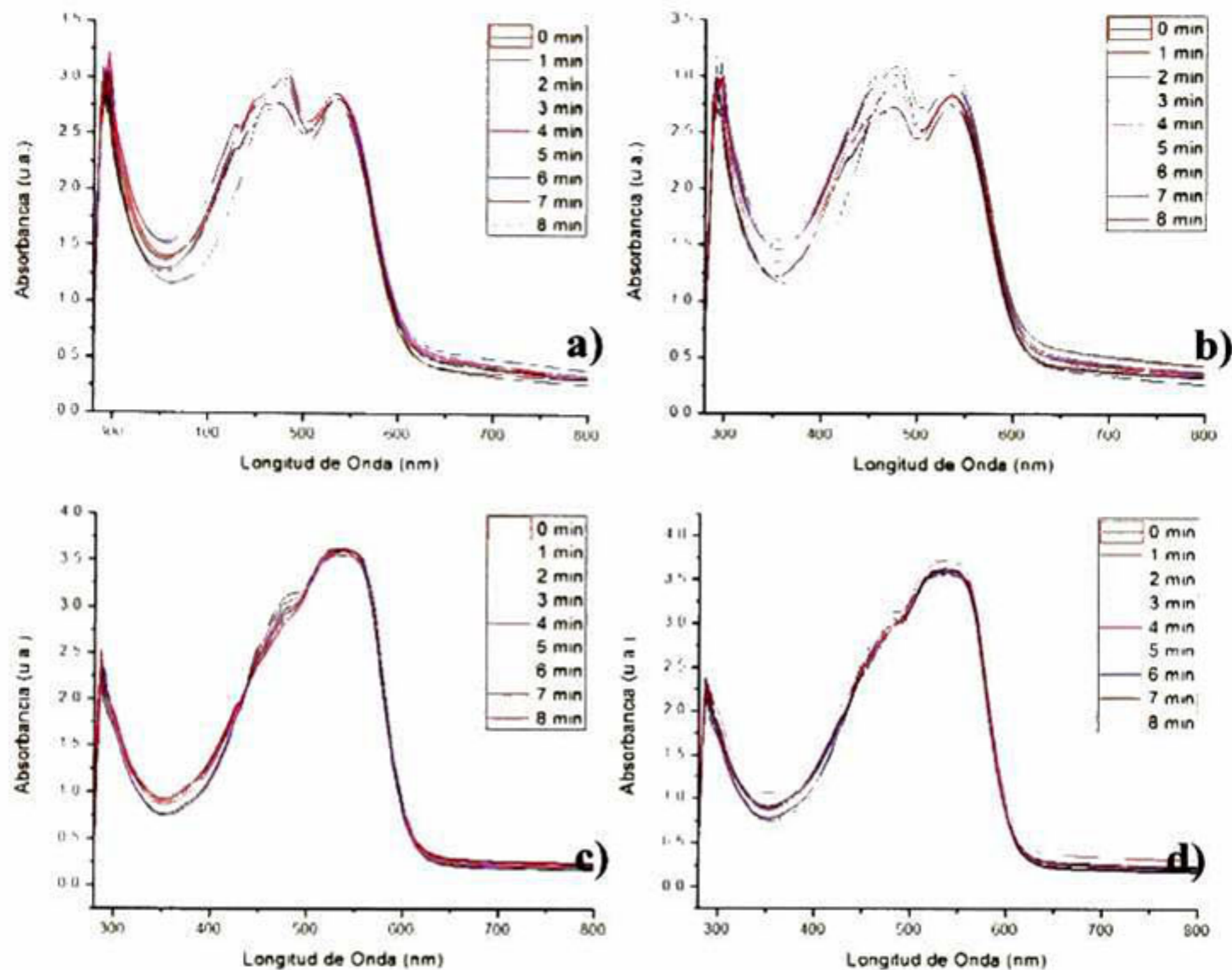


Figura 8.10. Efecto de una temperatura a 80°C sobre el betabel natural a) recién calentado, b) temperatura ambiente y betabel estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.

Mientras que el betabel estabilizado realmente no genera cambios importantes en el sistema, presenta una variación de 2.20% calentado y 1.13% frío marcando una diferencia importante con el betabel natural.

En el garambullo natural (figura 8.11) se ve un cambio de 16.42% en ambas formas, y un aumento en la cantidad de azúcares que presenta la muestra, de hecho al momento realizar la prueba, se observan depósitos de azúcar en el fondo de la celda producto del calentamiento producido en el mismo, mientras que el garambullo

estabilizado presenta una diferencia de solo 0.32% calentado y 0.07% frío, esto produce una mejora notable en el producto ya que no se observa formación de precipitado en la muestra.

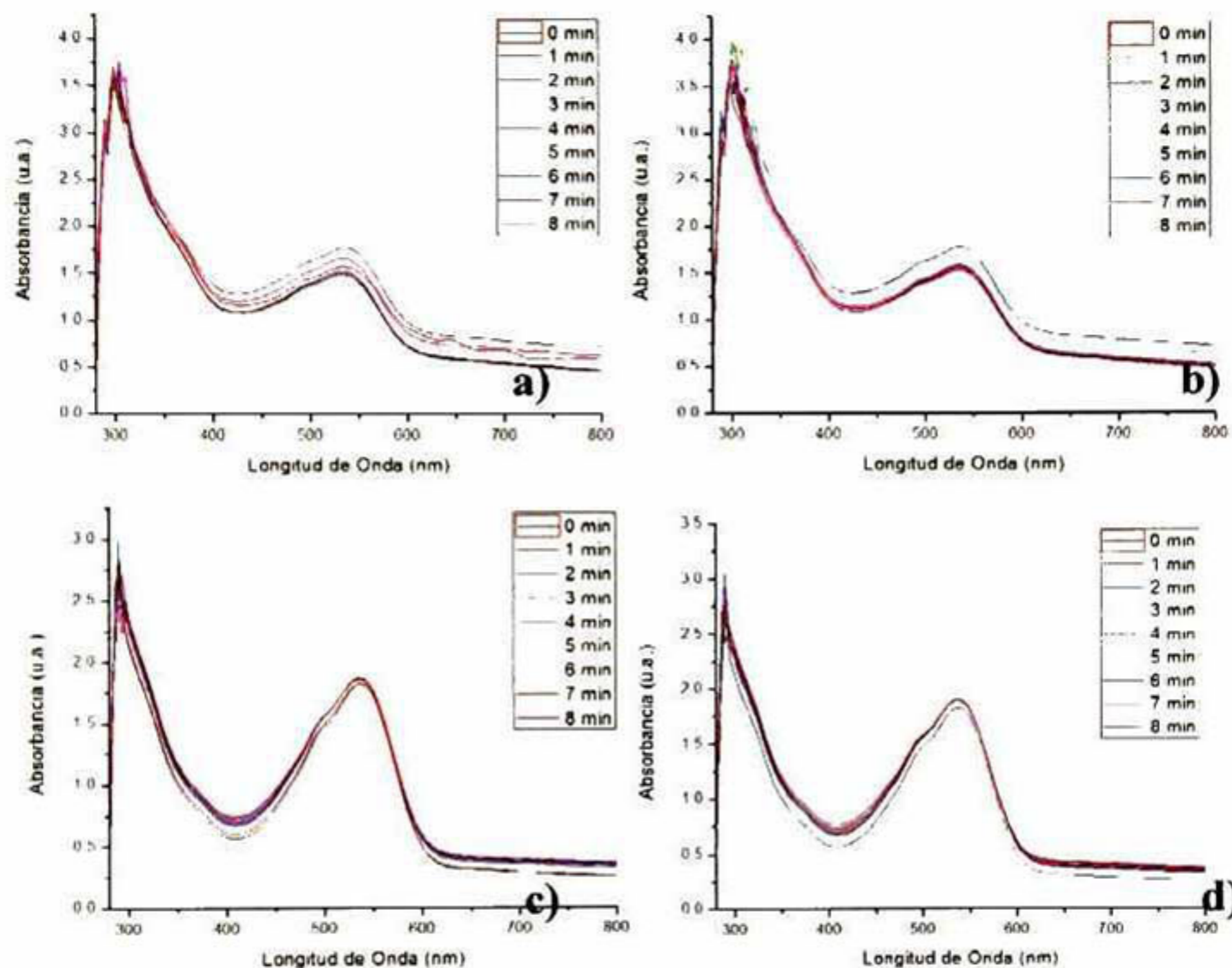


Figura 8.11. Efecto de una temperatura a 80°C sobre el gambullo natural a) recién calentado, b) temperatura ambiente y gambullo estabilizado c) recién calentado, d) temperatura ambiente.

A todo esto se puede decir que la cantidad de betalainas contenidas en las muestras estabilizadas presentan más resistencia a los cambios de temperatura que las naturales, sin embargo es necesario cuantificar el número de betaninas de cada una para poder tener una mejor comparación de los valores.

8.5 Cuantificación de color rojo, betanina

Para esta prueba se consideró el peso inicial del betabel y garambullo antes de la extracción, de esta manera también se toma el volumen obtenido de muestra y el peso del colorante en seco, para lo cual de acuerdo a la bibliografía el porcentaje de color debe encontrarse alrededor de 1% y 2%, se puede observar que la mayor cantidad de color se encuentra en la muestra de garambullo natural con 1.8% de betanina, sin embargo cae un 19.15% la cantidad de color debido al proceso de estabilización llegando a 1.45% de betanina, este valor se puede comparar con el obtenido del betabel natural de 1.44%, sin embargo durante el proceso de estabilización no hay una pérdida de azúcar mayor, ya que llega hasta 1.37% perdiendo solo un 5.03% de color durante el proceso, estas diferencias de color pueden ser observadas en la figura

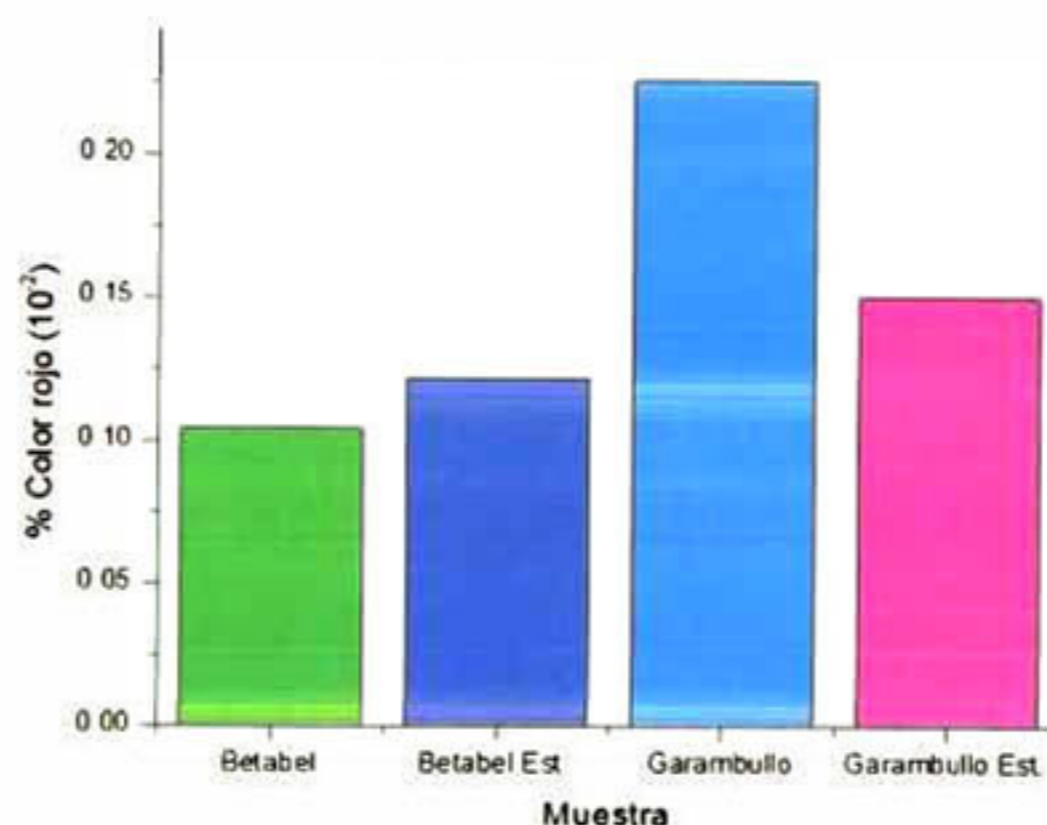


Figura 8.12. Gráfico comparativo de la cantidad de color rojo (betanina) en las muestras

8.6 Cuantificación de azúcares reductores

Las muestras se analizaron por triplicado, lo cual de acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que la muestra de garambullo natural fue la que contenía una mayor concentración de azúcares generando 108.16 ± 6.9 gr azúcar/L, lo cual durante el proceso de retiro de azúcares hubo una reducción del 76.19% ya que en el garambullo estabilizado se obtuvieron 25.75 ± 4.8 gr azúcar/L, con ello se toma en cuenta que los valores de azúcar en este producto se ven alterados por el proceso y

mejorando las propiedades que se necesitan para la aplicación del colorante en la industria alimenticia principalmente, además que ayuda a disminuir el proceso de degradación del colorante.

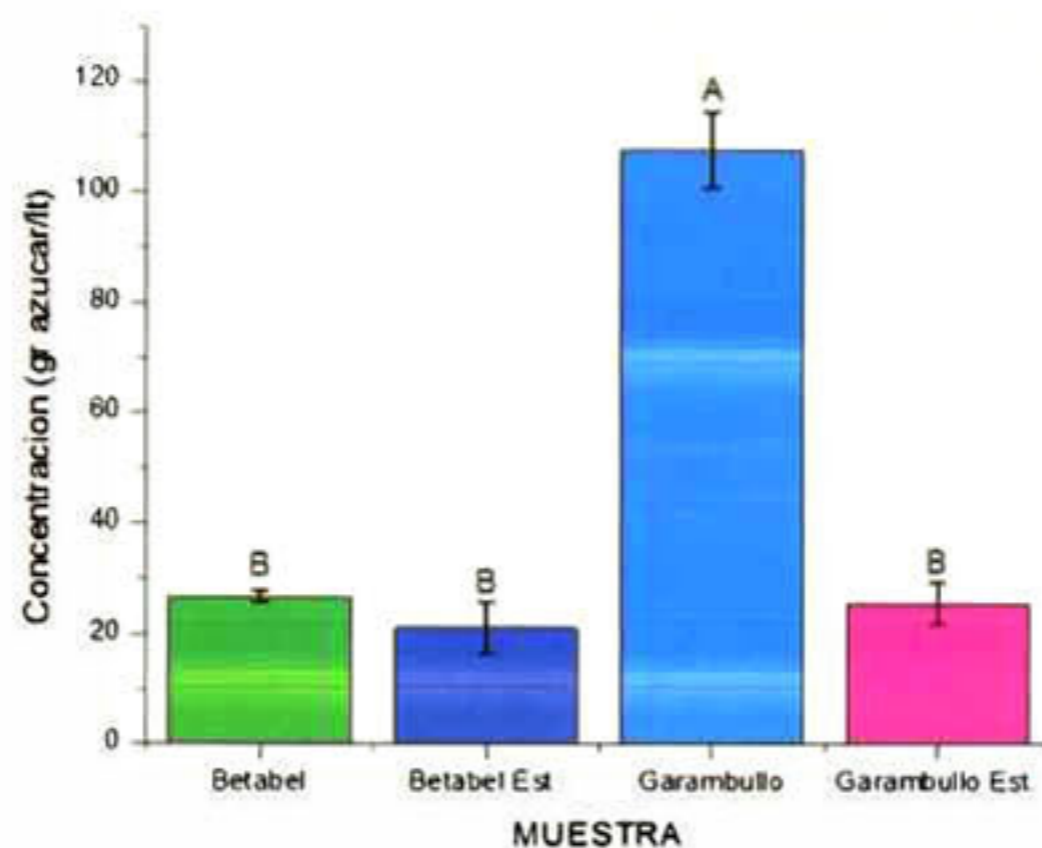


Figura 8.13. Gráfico comparativo de la cantidad de azúcar en las muestras

En las muestras de betabel se observa que también hay una disminución de la cantidad de azúcar del estabilizado con respecto al natural, pasando de 26.77 ± 0.9 gr azúcar/L a 21.125 ± 4.8 gr azúcar/L en el estabilizado llegando a una caída del 21.09% en la cantidad de azúcar libre en la muestra, a pesar de ser una caída menor, la sensación de sabor del betabel ya no es perceptible dentro del colorante.

En cuanto al tipo de azúcar encontrado en cada muestra, se observa en la figura que las muestras de garambullo natural y estabilizado presentan azúcares de tipo monosacáridos, mientras que las muestras de betabel natural y estabilizado presentan disacáridos en su estructura.

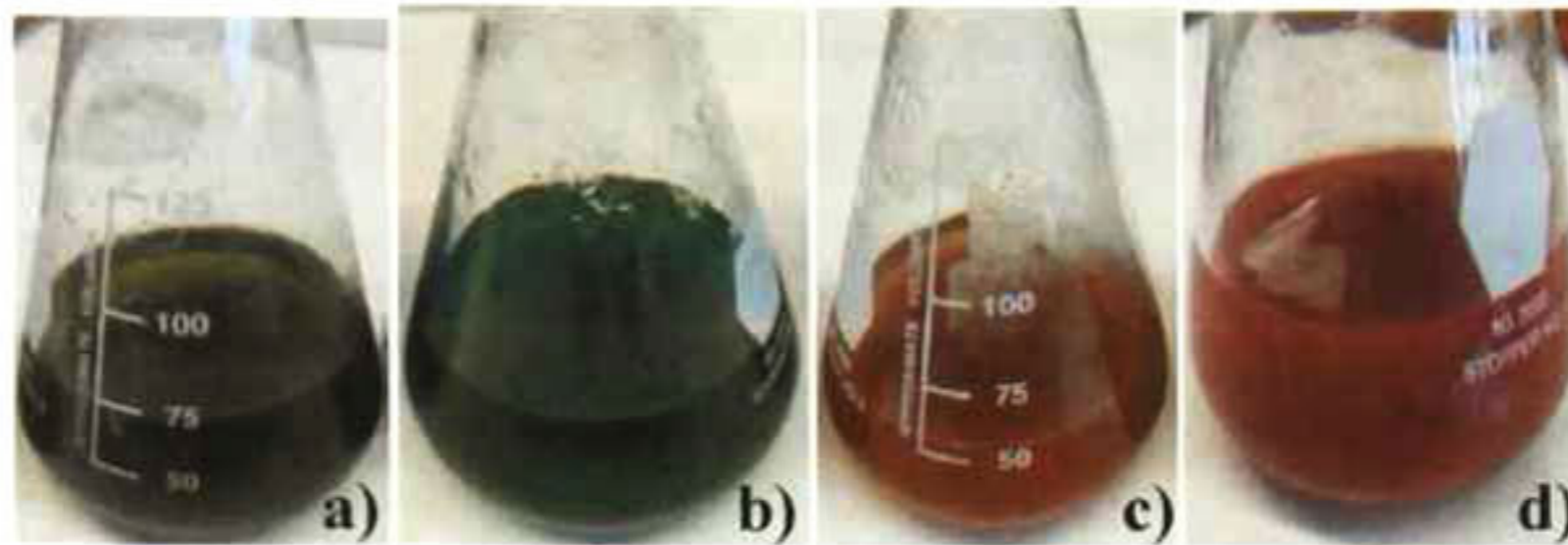


Figura 8.14. Color obtenido del licor de fehling de las muestras después del análisis de azúcares reductores a) betabel natural, b) betabel estabilizado, c) garambullo natural, d) garambullo estabilizado.

8.7 Cuantificación de polifenoles totales

Para la observación del retiro de azúcares de las muestras, se realizó de primera mano la cuantificación de polifenoles totales tomando como sistema de referencia el ácido gálico, el cual se contempla como uno de los fenoles de mayor aparición en los sistemas alimenticios, a lo cual se realizó una curva de calibración del sistema, obteniendo el gráfico presentado en la figura , que servirá como base para conocer los valores de concentración de las muestras, basado en la ecuación obtenida a través de una regresión lineal.

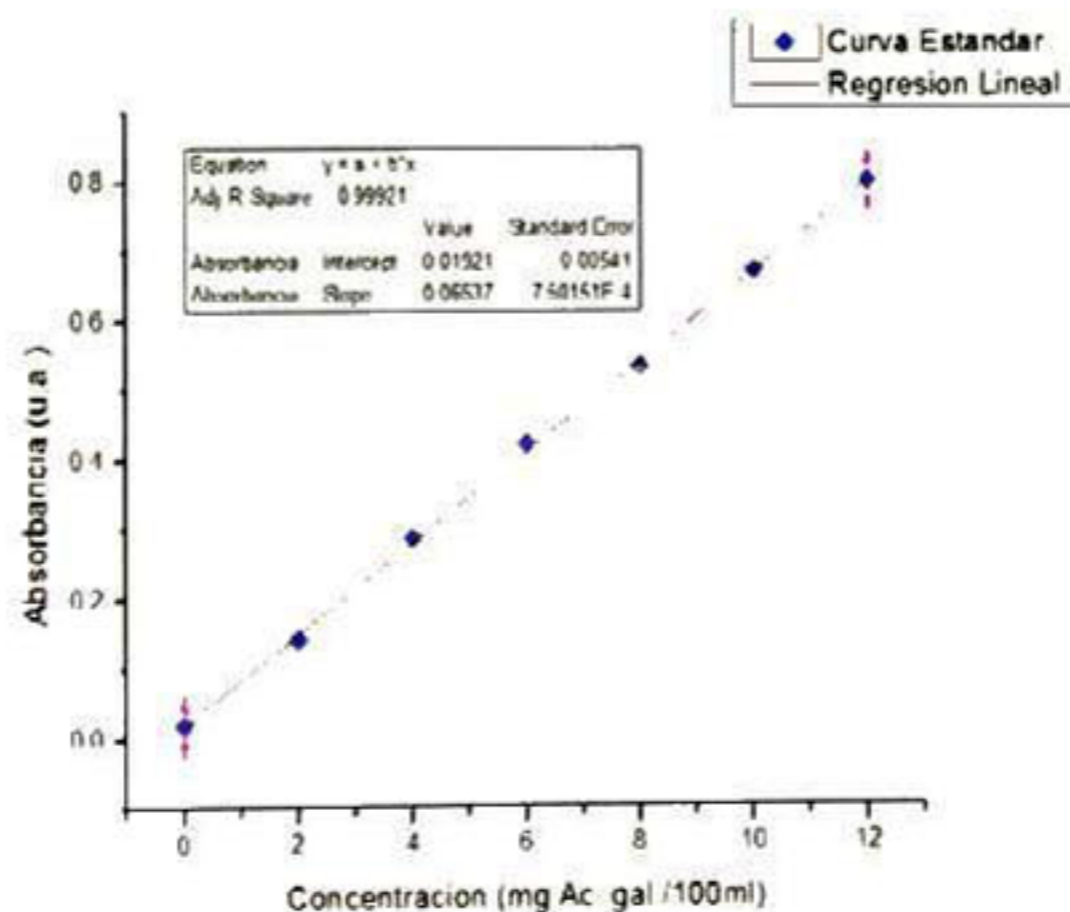


Figura 8.15. Curva de calibración de ácido gálico

Una vez realizado esto se observa en la figura 8.16 que la muestra de garambullo natural es la que contiene la mayor cantidad de polifenoles en su sistema, esto puede asignarse a la gran cantidad de azúcar que contiene por sí misma, lo cual después del retiro de azúcares se observa una gran disminución de la cantidad de polifenoles, pasando de 93.1 ± 16.6 mgAG/gr hasta llegar a 8.8 ± 4.37 mgAG/gr, dando una diferencia de 90.51%, esta caída confirma la alta reducción de azúcares generada en el proceso de intercambio iónico.

Este cambio también se ve reflejado en el betabel, el cual pasa de 35.2 ± 4.05 mgAG/gr a 16.3 ± 0.44 mgAG/gr, con una diferencia de 53.73% en la muestra, se puede encontrar que la cantidad de polifenoles en el betabel natural es menor a que la contenida en el garambullo natural, sin embargo la reducción de fenoles en la muestra es menos drástica que en garambullo.

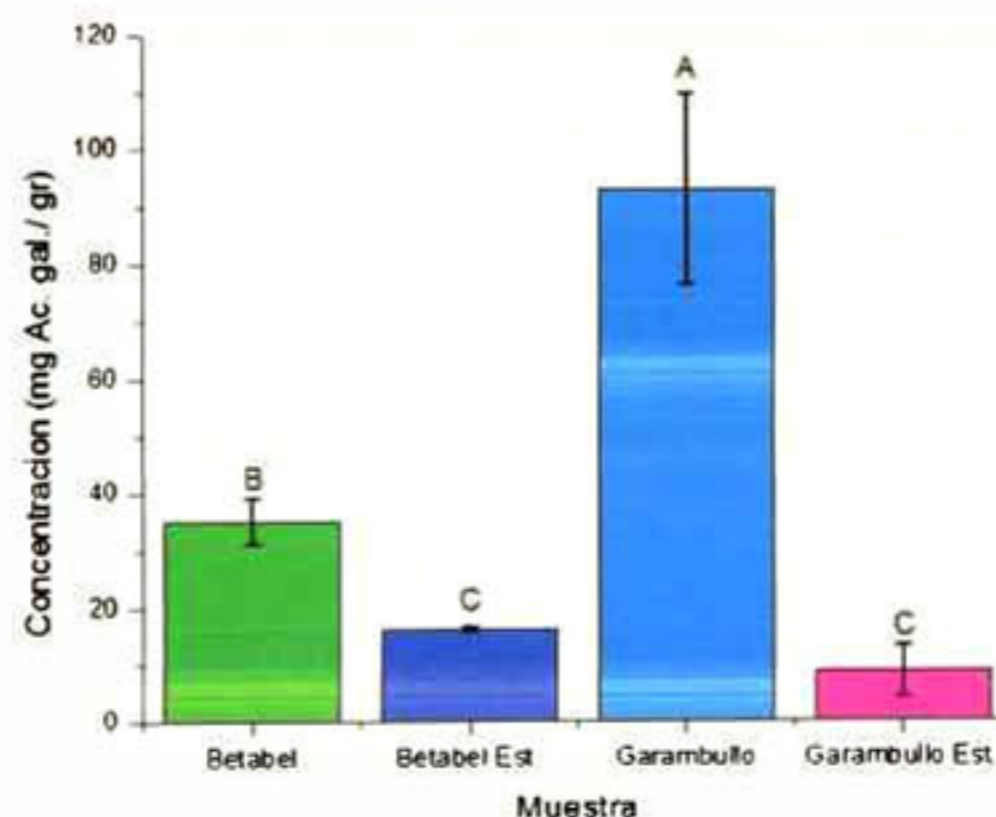


Figura 8.16. Cantidad de polifenoles por muestra.

En base a esto se analiza la actividad antioxidante para observar cómo fue afectada la muestra por la reducción de polifenoles.

8.8 Medición de la actividad antioxidante.

Durante la prueba anterior se observó en gran medida la reducción de fenoles dentro de la muestra por el retiro de azúcares generado en el intercambio iónico, en esta

prueba se utilizó como medio de comparación el ácido ascórbico o vitamina C ya que se conoce que este compuesto es el que se encuentra en la mayoría de frutos y vegetales como indicador de antioxidantes en ellos, donde su curva de calibración se ve reflejada en la figura 8.17 para obtener las concentraciones relacionadas con cada muestra.

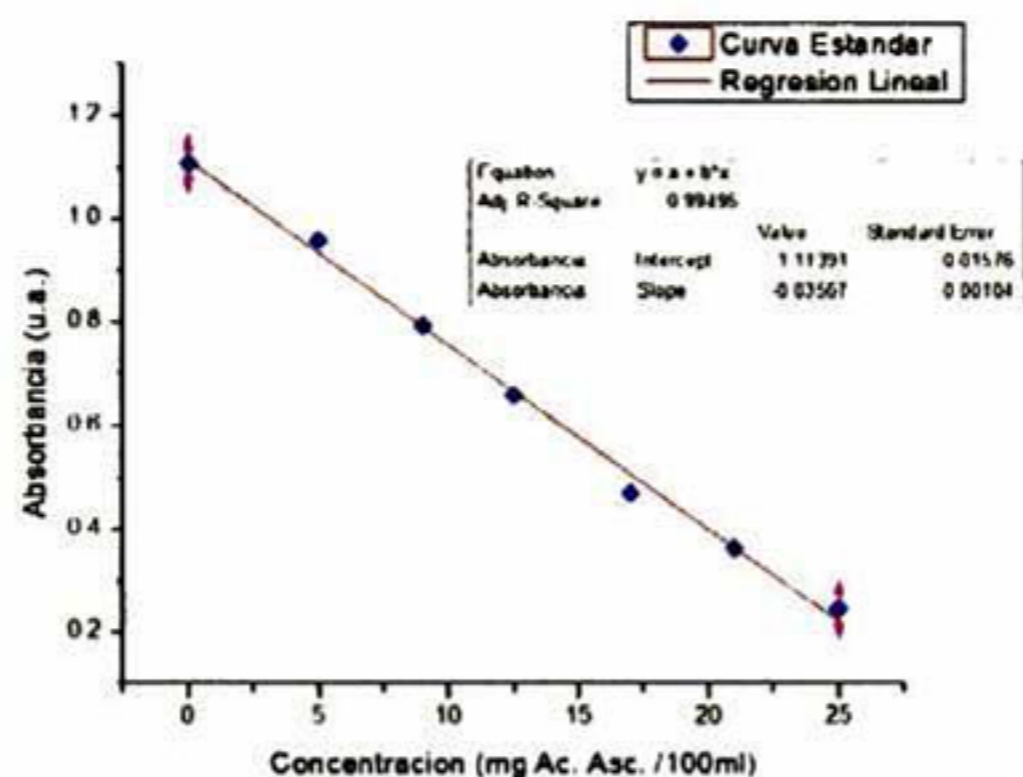


Figura 8.17. Curva estándar de ácido ascórbico

Una vez obtenida la curva estándar se realizaron los cálculos basados en la ecuación de la recta, donde de acuerdo a la figura 8.18 se puede observar que el betabel natural tiene una concentración de 33.3 ± 0.028 mg AA/gr y por el proceso de estabilización pasa hasta un valor de presentando una diferencia del 63.84% con respecto al original, donde se puede determinar que debido a el proceso de estabilización hubo una pérdida de antioxidantes del colorante y de esta manera no solo darle estabilidad al colorante sino que proporcionar algo extra al producto final.

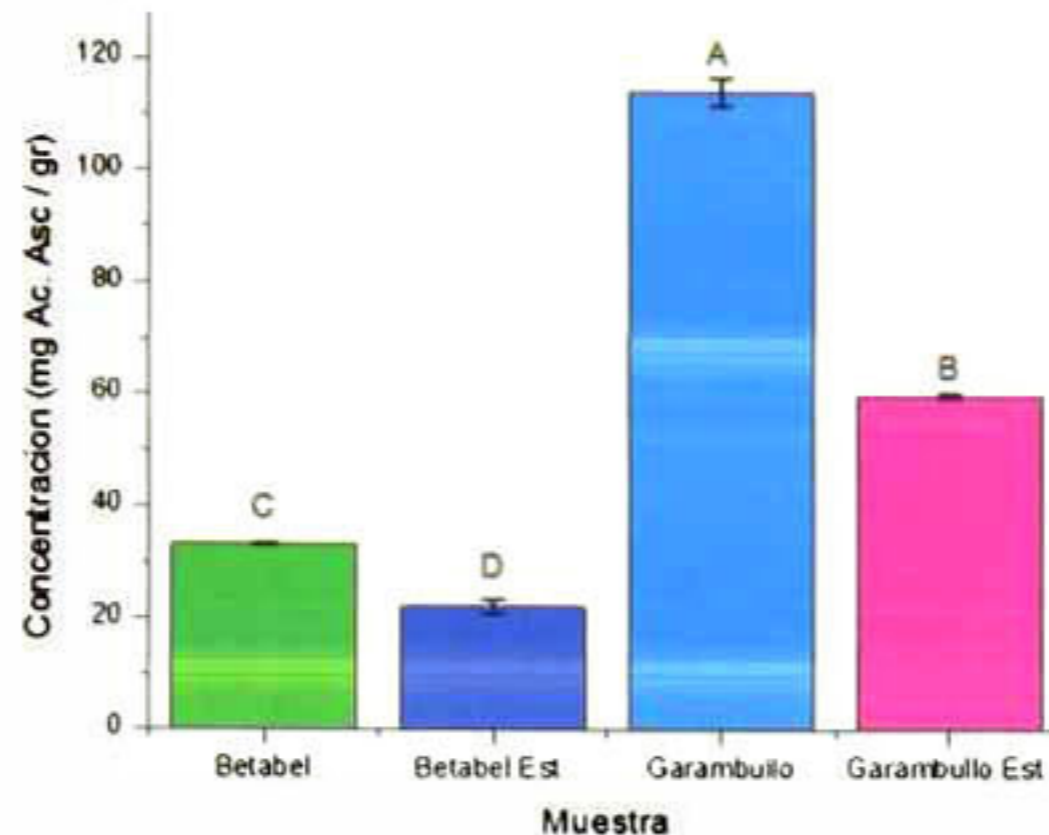


Figura 8.18. Cantidad de antioxidantes por muestra

En cuanto al garambullo en su forma natural, la concentración de antioxidantes es de 114.8 ± 2.52 mg AA/gr, el cual es mayor a la concentración reportada en el arándano de 59.4 mg AA/gr, pero también observamos que el garambullo estabilizado presenta una concentración de 60.3 ± 0.042 mgAA/gr, teniendo una disminución de 90.14% en la cantidad de antioxidantes totales, esto genera un producto con propiedades mayores a los jugos con antioxidantes que se ofrecen en el mercado, en los cuales puede aplicarse el colorante para aumentar los porcentajes ofrecidos comúnmente.

8.9 Espectroscopia de Impedancia Electroquímica

En esta prueba se tomó una muestra con una concentración del 5% p/V de colorante en 10 ml de agua desionizada para realizar una prueba de impedancia de líquidos, del cual se obtuvo el espectro de Nyquist de la figura 8.19 correspondiente a esta solución, donde en base a la teoría se obtuvieron los valores de R_S , R_P y ω .

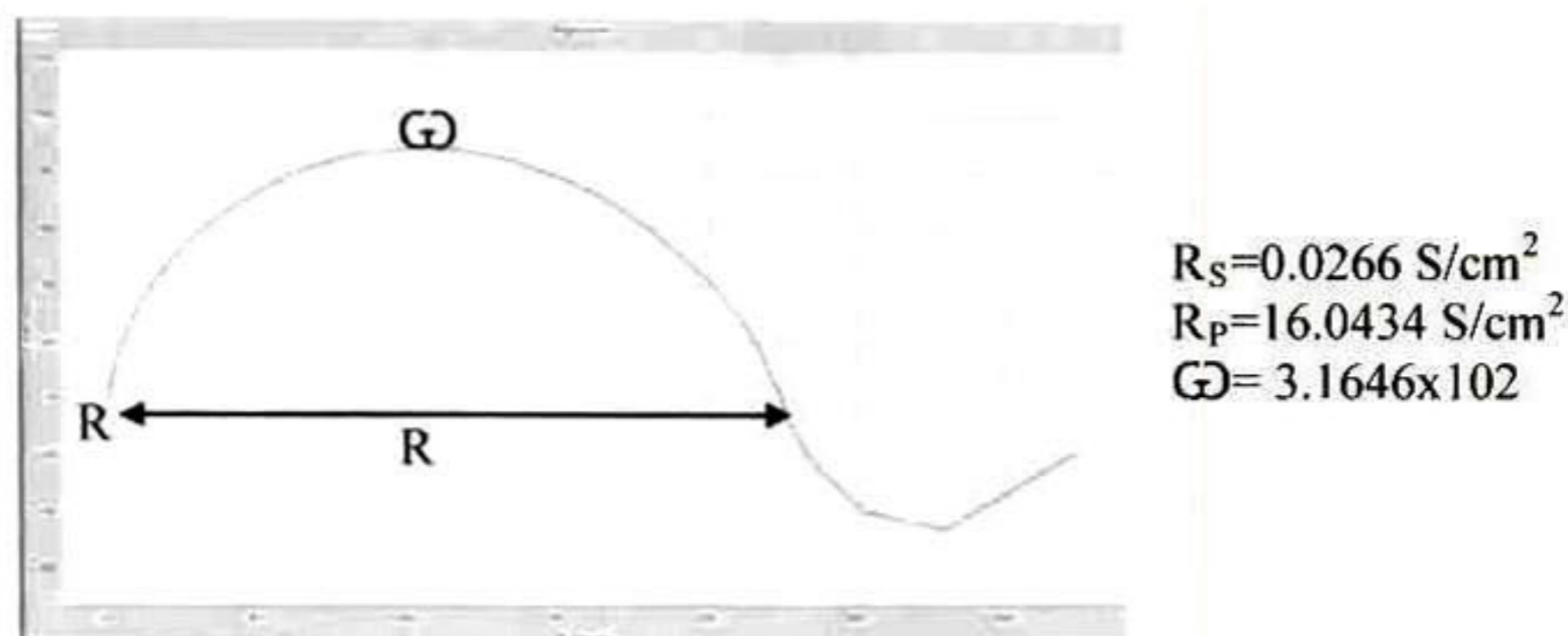


Figura 8.19. Espectro de Nyquist de solución de betalaína

Una vez obtenidos estos valores se realizaron los cálculos correspondientes donde se obtuvo el valor para la capacitancia del dieléctrico de 7.1×10^{-5} F, este valor fue utilizado para la constante dieléctrica del sistema que está dado por la ecuación:

$$C = \epsilon \epsilon_0 \frac{A_C}{d_C} \quad \text{(Ecuación 5.3)}$$

De donde se obtuvo que la constante dieléctrica (ϵ) del sistema es 7.84 y se encuentra cercano a otros colorantes disponibles en la industria actualmente, por lo cual se considera un valor real y puede ser utilizado para las pruebas de potencial ζ que se reportan más adelante.

8.10 Dispersión de Luz Dinámica

Para la determinación de la densidad de partícula de las muestras, se realizó una medición de cada una tomando 0.1 mg de muestra y fueron dispersados en 20 ml de agua, se trabajó sin filtro de láser, con un tiempo de integración de 10 segundos, para lo cual se obtuvieron los resultados que se pueden observar en la figura 8.20.

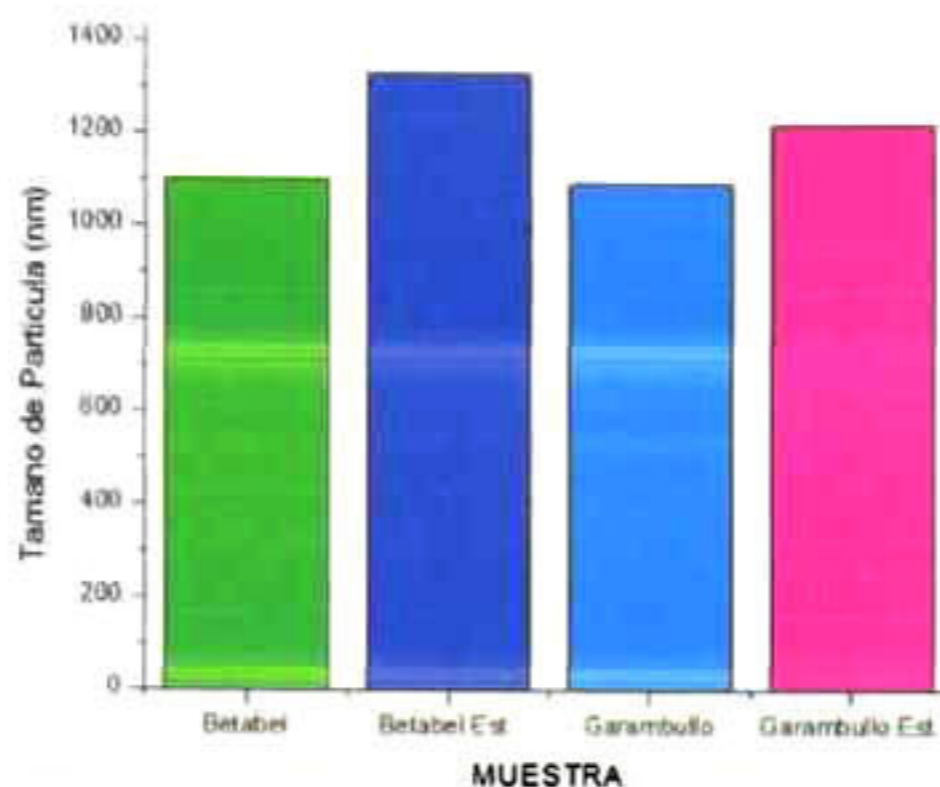


Figura 8.20 Gráfico comparativo de tamaño de partícula.

En esta figura se puede observar que las partículas de las muestras en estado natural de betabel y garambullo, tienen un tamaño promedio de 1103.2 nm y 1093 nm, mientras que el betabel estabilizado reporta 1330 nm observándose un aumento en el tamaño de partícula, de la misma forma el garambullo estabilizado presentó un tamaño de partícula de 1221.4 nm.

Con estos tamaños se obtiene la densidad de partícula, la cual se obtiene tomando un volumen determinado de muestra, buscando que no queden espacios libres, una vez que se ha tomado el volumen, se registra el peso de la muestra utilizado para obtener una densidad total que al ser dividida por el tamaño de partícula se obtendrá la densidad de partícula de cada muestra, para fines de este trabajo se obtuvo una densidad de 1.066 gr/ml

8.11 Potencial ζ

Para cada muestra, se utilizó la constante dieléctrica y densidad de partícula obtenidas anteriormente, así como la densidad de 5% p/v de muestra, otro factor a considerar fue la constante dieléctrica del agua que es 80.4 y su densidad 99.56 g/ml, estos datos después de tres mediciones se observan en la figura 8.21 donde se relacionan los resultados obtenidos.

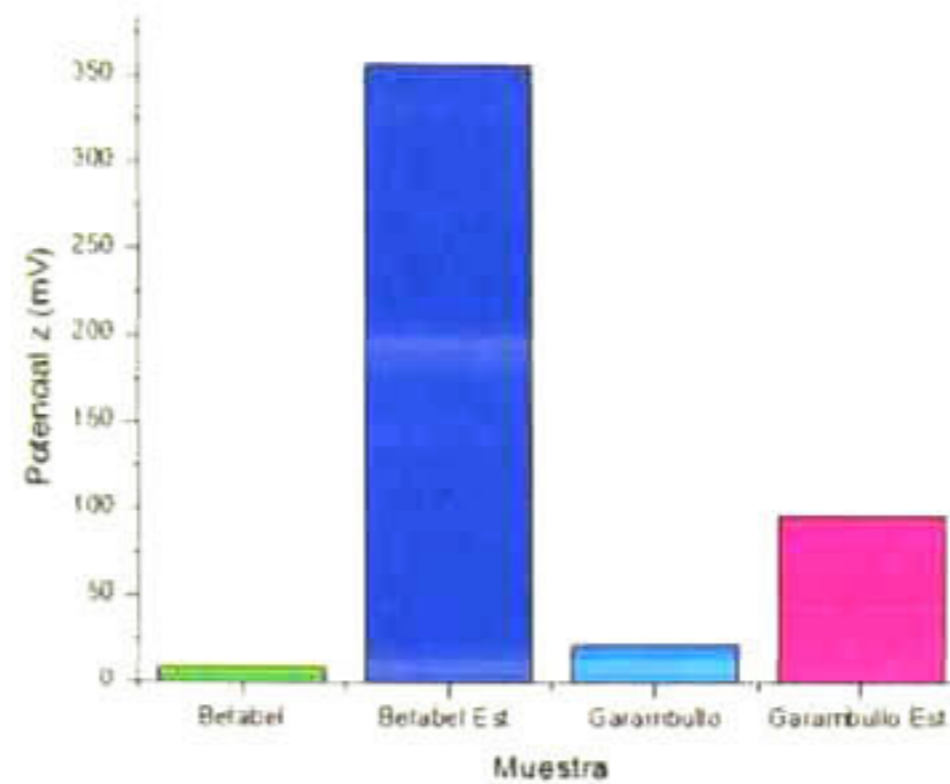


Figura 8.21 Gráfico comparativo de potencial ζ

De esto podemos determinar que el betabel natural se encuentra en 9.9 mV y durante el proceso de estabilización llega hasta un valor de 357.4 mV que dado el aumento presentado se considera que la sílice se encuentra acoplada al sistema, mejorando sus propiedades notablemente como se ha observado a lo largo de los distintos análisis realizados. Para el garambullo natural se tiene un valor de 22.3 mV, el cual al momento de la estabilización el valor sube hasta 97.2 mV, este valor se puede observar afectado por el azúcar que no puede ser retirada de la muestra.

IX. CONCLUSIONES

- El retiro de azúcares fue altamente eficiente tanto en el betabel como en el garambullo, sin embargo por el tipo de azúcar y las cantidades que contienen, el garambullo aún conserva azúcar libre que afecta a la estabilidad del sistema, ya que cuando el polvo era disuelto, después de colocarlo en reposo por tiempos prolongados se encontraba un residuo de azúcar muy leve en la muestra.
- En cuanto a color el garambullo contiene una mayor cantidad de rojo que amarillo con respecto al betabel, sin embargo al momento de la estabilización tiene una pérdida de color muy alta, pero a pesar de ello sigue siendo aún mayor que la de betabel estabilizado, presentando más color rojo en la muestra y esto es muy apreciable en la cromaticidad de la muestra.
- El método de estabilización fue exitoso en ambos casos de acuerdo a las pruebas de estabilidad realizadas, dando una gran mejoría en la resistencia a los parámetros de pH, temperatura y luz ultravioleta, el garambullo estabilizado fue el que presentó los mejores resultados al respecto a pesar de tener aún azúcar libre que afecta.
- Dentro de las pruebas de estabilidad, el cambio de pH fue el que marcó mayor daño a las muestras, dejando ver el azúcar en el garambullo, dado a que se registraba un aumento en la zona de 280 nm – 320 nm, el proceso de estabilización protegió las muestras de la degradación disminuyendo la rapidez con la que disminuía la cantidad de betacianinas y betaxantinas en la muestra.
- En la radiación UV el garambullo estabilizado presentó el mejor comportamiento de los 4, mientras que el garambullo natural fue el que presentó mayor daño y hasta un precipitado de azúcar libre de la muestra, el

betabel no tuvo diferencias significativas en el betabel estabilizado con respecto al natural, sin embargo el natural llegó a presentar precipitación de azúcar, coincidiendo con el garambullo natural, con esto se reflejó el cambio de azúcar en la muestra.

- Los polifenoles totales se vieron disminuidos en su mayoría por el mismo retiro de azúcar con intercambio iónico, esta disminución afectó directamente a la cantidad de antioxidantes de las muestras ya que durante el propio procedimiento de estabilización disminuye estas cantidades, ya que una depende de la otra.
- La cantidad de antioxidantes presentes principalmente en el garambullo es superior a lo presentado en el arándano, el cual es el producto por excelencia que se reporta para obtención de productos con propiedades antioxidantes en el mercado, lo cual abre un campo en el área de bebidas enriquecidas para el colorante procesado.
- La cuantificación de betacianinas totales realizadas, muestra como se mantiene un porcentaje alrededor del 1% aún después del proceso de estabilización, esto se debe a que durante el intercambio iónico la solución de arrastre generó que fuera obtenida la mayor cantidad de betalaína sin azúcar posible a comparación de trabajos anteriores, también por este mismo proceso se disminuyó el olor intenso característico con el que se contaba anteriormente a pesar de la purificación.
- El tamaño de partícula promedio de las cuatro muestras se encuentra aproximadamente en el mismo rango entre ellos, mostrando que a pesar del procedimiento realizado se mantiene en rangos constantes.
- Para el potencial ζ se observó un cambio muy grande en él principalmente en el betabel, debido a que el mismo proceso de acoplamiento del cerámico ayuda a que la interacción entre el soluto y el solvente sea mayor, mientras

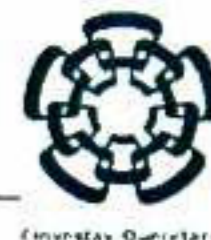
que el garambullo estabilizado aunque presentó aumento en su potencial, no llega a ser tan alto como el betabel por la misma presencia de azúcar libre en la muestra que no pudo ser extraída.

- Tanto el betabel como el garambullo estabilizados pueden ser utilizados para sustituir el ácido carmínico en los alimentos y así evitar la generación de enfermedades derivadas de la ingesta de este producto, aunque el garambullo necesita un trabajo posterior para seguir disminuyendo su cantidad de azúcar y poder mejorar sus propiedades y aplicación en la industria del color.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alpizar, S. 2002. Determinación de vitaminas liposolubles antioxidantes en suero de pacientes con alto riesgo de cáncer gástrico en Costa Rica. Tesis de licenciado en Nutrición, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica, p 1-53.
2. Anderson, E. E. 2001. The cactacea family. Timber press, Inc. 472-475. Portland, Oregon. USA.
3. Anonymous, 1986. "Food colors", Food Technol., 4(1):49
4. Aranda, V. 1994. "Short overview on raw meat colour". Proc. 40th Int. Cong. Meat Sci. Technol. La Haya, Holanda.
5. Azeredo, H. M. C. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. Int J. Food Sci. Tech., 44: 2365-2376.
6. Badui D.S., 2006. "Química de los alimentos", Pearson educación, México
7. Briton, G. 1999. "Pigments in foods. More than just colors", Proc. 1st International Congress Pigments in Foods, Sevilla, España
8. Butera D., Tsoriere L., Di Gaudio F., Bongiorno A., Allegra M., Pintaudi A.M., Kohen R. and Livrea M.A., 2002. "Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruits extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin", J. Agric. Food Chem., 50:6895.
9. Baltazar Hernández, P., 2001. Cinética de la transformación de fase amorfo – anatasa en óxido de titanio dopado con cobre(II), Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.
10. B- Hanz-Jürgen y M. Kappl, 2010. Surface and Interfacial Forces, Ed. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.
11. Castellanos-Santiago E., Y- Elhadi M., 2008. Identification and Quantification of Betalains from the Fruits of 10 Mexican Prickly Pear Cultivars by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, J. Agric. Food Chem., 56:5758–5764

12. Chandler, L.A. and Schwartz, S.J. 1987. "HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables", *J. Food Sci.*, 52:669
13. Cheynier, V. 1999. "Structure a color property of anthocyanins and related pigments", *Proc. 1st International Congress Pigments in Foods*, Sevilla, España.
14. Clementi L. A., 2008. "Estimación de distribuciones de tamaños de partícula por técnicas de dispersión de luz. Utilización de algoritmos genéticos para resolver el problema inverso", 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales – Posadas – Misiones, Asociación Argentina de Materiales.
15. Comisión de salud pública de España, 2000. Neumonitis por hipersensibilidad o alveolitis alérgica extrínseca, protocolos de vigilancia sanitaria específica.
16. Cordeiro de Azeredo H. M., Pereira A. C., A. Claudio Rodrigues de Souza, S- Thomaz Gouveia and K- C. Barbosa Mendes, 2009. Study on efficiency of betacyanin extraction from red beetroots, *Int. J. Food Sci. Tech.*44:2464–2469
17. Cottis R. and Turgoose S., 1999. "Electrochemical Impedance and Noise", NACE International, Estados Unidos de America, 149 pp.
18. Crozier, A., Lean, Mc Donald and Black C. 1997. "Analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery", *J. Agric. Food Chem.*, (45)3:590.
19. Francis, F.J. 1999. "Colorants", *Practical Guides for the Food Industry*, American Association of Color Chemists. Eagan press, T. Paul, Minnessota.
20. FAO/WHO Joint Expert Committee of Food Additives, 1987. "Caramel Colours", en *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*, Roma, Italia.
21. Florian C. Stintzing and Reinhold Carle, 2004. "Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition", *Food Sci. Tech.* 15:19–38.



22. Fox, J.B., 1994. "Los pigmentos de la carne", en Ciencia de la carne y de los productos cárnicos, Ed. Por J.F. Pirce y B.S. Schweigert, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
23. Hernández-López, D., Vaillant, F., Reynoso-Camacho, R., and Guzmán-Maldonado, S. H. 2008. *Myrtillocactus* (cactaceae): botanical, agronomic, physicochemical and chemical characteristics of fruits. *Fruits*, 63:201-208.
24. Hendry, G.A. and Houghton, J.D., 1996. *Natural Food Colorants*, Blackie Academic and Professional, Glasgow, Escocia.
25. <http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/appestado/monografias/hortalizas/betabel%20.html>
26. Huang, A.S. and von Elbe, J.H., 1985. "Kinetics of the degradation and regeneration of betanine", *J. Food Sci.*, 50:1115
27. Jackman R.L. and Smith D.L. 1996. "Anthocyanins and betalains", en *Natural Food colorants* Ed. Por G.A.F. Hendry y J.D. Houghton. Blackie Academic and Professional, Glasgow, Escocia.
28. Lee, Y.K. and Khng H.P. 2002. "Natural color additives", en *Food Additives*, Ed. by L.A. Branen, Marcel Dekker, Nueva York.
29. Lee, S., Hoo, S.T., Alderton, A.L., Hill, D.V., 1982. "Purification and concentration of betalains by ultrafiltration and reverse osmosis", *J. Food Sci.*, 47:465
30. Lock, O., 1997. *Colorantes naturales*, Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, Primera edición, Perú, 274 p.p.
31. Marmion, D.M. 1991. "Handbook of U.S. Colorants". John Wiley and Sons, Nueva York.
32. Méndez Espinoza M. C, 2010. *Estabilización de un colorante natural (betalaína) usando partículas cerámicas para su empleo en alimentos*", Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.
33. Minguez-Mosquera, M.K., 1997. "Isolation of C-glucosyl-flavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruits", *J. Agricul. Food Chem.*, (45)12:4619.

34. Montville, Thomas J. and Matthews, Karl R., 2008. "Microbiología de los alimentos. Introducción", Editorial ACRIBIA, S.A., 459 p.p., Zaragoza España.
35. Moon, J. K., and Shibamoto, T. 2009. Reviews. Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57:1655-1666.
36. Moreno, A., García, C., Gil, I., and Gil, A. 2008. Betalains in the era of global agrifood science, technology and nutritional health. *Phytochem Rev*, 7:261–280.
37. Morrison y Boyd, 1998. *Química Orgánica*, Addison Wesley Longman, 1474 p.p.
38. Minolta, 1994. *Precise color communication, color control from feeling to instrumentation*. Press, Japan.
39. Nagel, C.W. and Wulf, L.W., 1979. "Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon", *Am. J. Enol. Viticul.*, 30:111
40. Nilsson T., 1970 Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *Vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshögskolans Annaler*, 36:179–219.
41. Pérez Trueba, G., 2003. "Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes". *Rev. Cubana Invest Bioméd*, vol.22, no.1 pp. 0-0.
42. Peña, J., Cardona, E., and Ríos, L., 2008. Síntesis de óxidos de silicio de altas área superficial y porosidad empleando el metodo sol-gel en presencia de glicerol y monoestearato de glicerilo como estructurantes. 75:156, noviembre-sin mes, pp. 207-216
43. Prior, R. L., Wu, X., and Schaich, K. 2005. Standarized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 55:680-687.
44. Reynoso, R., García, F., Morales, D., and González de Mejia, E. 1997. Stability of betalain pigments from a cactacea fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 45:2884–2889.

45. Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Tovar, A., Vaillant, and F., Brat, P. 2010. Physicochemical, nutritional and functional characteristics of two underutilised fruit cactus species (*Myrtillocactus*) produced in central México. *Food Chem.*, 121:381-386.
46. Scheinvar, L. 2004. Flora cactológica del Estado de Querétaro: diversidad y riqueza. Primera edición. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. p. 195-199.
47. Shi, J. C.C. and Wiley, R.C., 1982. "Betacyanine and betaxanthine decolorizing enzymes in the beet (*Beta vulgaris*) root", *J. Food Sci.*, 47:164
48. Singleton V. L. & Rossi J. A. Jr, 1965. "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents", *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
49. Stewart, I. 1980. "Color as related to quality in citrus", en *Citrus Nutrition and Quality*, American Chem. Soc., Washington, D.C.
50. Thorngate, H.J., 2002. "Synthetic food colorants", en *Food Additives*, Ed. Por L.A. Branen, Marcel Dekker, Nueva York.
51. Vaca R. M. y Santana A.K. 1999. "Principales requisitos para la importación de colorantes en Estados Unidos". Gerencia de Desarrollo de Productos de Información. Banco de comercio Exterior, México.
52. Venereo, G. J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* 31(2):126-133.
53. Von Elbe J.H. and Goldman I.L., 2000. "The betalains", en *natural Food Colorants*, Ed. Por G.J. Lauro y F.J. Francis, Basic Symposium Series, Marcel Dekker, Nueva York.
54. Von Elbe, J.H., Schwartz. S.K. and Hildenbrand. B.E., 1981. "Loss and regeneration of betacyanine pigments during processing of red beets", *J. Food Sci.*, 46:1973
55. Wrolstand, R.E. 2000. "Anthocyanins", en *natural Food Colorants*, Ed. Por G.J. Lauro y F.J. Francis, Basic Symposium Series, Marcel Dekker, Nueva York.

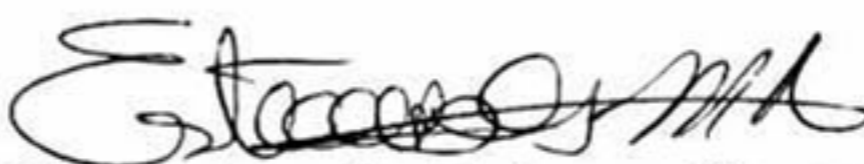


56. Weller, T.A. and Lasure, L.L., 1982. "Betalains in beet root tissue culture", J. Food Sci., 47:162.
57. W. Brand-Williams, M.E. Cuveliera, and C. Berset, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensm.-Wissen. Technol. 8:25-30

EL JURADO DESIGNADO POR LA UNIDAD QUERÉTARO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, APROBÓ LA TESIS DE MAESTRÍA DEL (LA) C. KARLA ADRIANA MORALES VÁZQUEZ TITULADA: "ESTUDIO COMPARATIVO DEL COLORANTE NATURAL BETALAÍNA ESTABILIZADO, OBTENIDO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA REGIÓN", FIRMAN AL CALCE DE COMÚN ACUERDO LOS INTEGRANTES DE DICHO JURADO, EN LA CIUDAD DE QUERÉTARO, QRO., A LOS 10 DÍAS DEL MES DE AGOSTO DE 2012.



Dr. Juan Francisco Pérez Robles



Dra. Miriam Rocío Estevez González



Dr. Juan de Dios Figueroa Cárdenas



Dr. J. Gabriel Luna Bárcenas



CINVESTAV - IPN
Biblioteca Central



SSIT0011043