



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZATAPALAPA

**CARACTERIZACION PARCIAL DEL PIGMENTO ROJO
DEL FRUTO DE LA JIOTILLA (*Escontria chiotilla*);
UNA CACTÁCEA SUBEXPLORADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A:

I. A. MIRIAM ELIZABETH FRANCO ZAVALA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE SORIANO SANTOS

MEXICO D.F.

SEPTIEMBRE 2004

Iztapalapa, D.F. a 10 de Septiembre del 2004

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

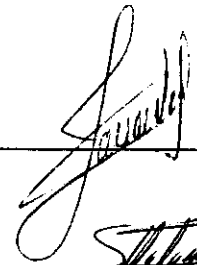
**CARACTERIZACION PARCIAL DEL PIGMENTO ROJO
DEL FRUTO DE LA JIOTILLA ((*Escontria chiotilla*); UNA
CACTACEA SUBEXPLORADA**


que presentó

MIRIAM ELIZABETH FRANCO ZAVALA

COMITÉ TUTORIAL

Director: Dr. Jorge Soriano Santos
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa





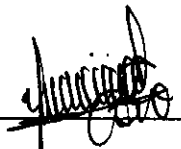
Asesora: Dra. Clara Pelayo Zaldívar
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

JURADO

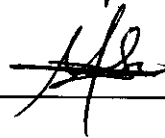
Presidenta: Dra. Edith Ponce Alquicira
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa




Secretario: Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez
Universidad Autónoma de Tlaxcala



Vocal: Dra. Clara Pelayo Zaldívar
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el número de registro 0471-O.

Iztapalapa, D.F. a 10 de Septiembre del 2004

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

**CARACTERIZACION PARCIAL DEL PIGMENTO ROJO
DEL FRUTO DE LA JIOTILLA ((*Escontria chiotilla*); UNA
CACTACEA SUBEXPLORADA**

que presentó

MIRIAM ELIZABETH FRANCO ZAVALA

COMITÉ TUTORIAL

Director: Dr. Jorge Soriano Santos _____
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora: Dra. Clara Pelayo Zaldívar _____
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

JURADO

Presidenta: Dra. Edith Ponce Alquicira _____
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral _____
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez _____
Universidad Autónoma de Tlaxcala

Vocal: Dra. Clara Pelayo Zaldívar _____
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por darme la oportunidad de superarme.

Al Dr. Jorge Soriano Santos, por haber creído en mí, por su confianza y ayuda invaluable en la dirección de este trabajo.

A la Dra. Clara Pelayo Zaldívar, por su ayuda y dedicación en el asesoramiento de esta tesis, pero sobre, por su amistad y apoyo en momentos difíciles.

A los miembros del jurado, por sus acertados comentarios y correcciones a mi trabajo.

Al M en C. Ramón Verde Calvo, por la revisión y enriquecimiento de esta tesis.

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta, por su amistad y apoyo incondicional.

A la Dra. Lourdes Yáñez, por brindarme su amistad de manera desinteresada y al Dr. Miguel Angel Armella por facilitarme material fotográfico de la jiotilla.

Al Dr. Francisco Cruz Sosa, porque de manera desinteresada estuvo pendiente de mi trabajo y aclaró mis dudas.

Al Laboratorio de Tecnología de Leches, por brindarme sus instalaciones en la determinación de los espectros.

A todos los integrantes de la Planta Piloto 1, especialmente a las Profesoras Erika Ortiz, Frida Malpica y Aída Malpica, quienes me ayudaron en el manejo de equipo y me alentaron a seguir adelante.

A mis maestros que contribuyeron en mi formación de maestra.

A mis compañeros y amigos de maestría, Elvia, Roberto, Alma, Adriana, Fernanda, Oscar, Ma. de Jesús, Oswaldo, Citlali, César, Luz María, Ana Luisa, Luis Guillermo y demás nombres que escapan a mi memoria, por todos los momentos que pasamos en el aula y ayudarme en mis dudas, gracias por su amistad.

A mis familiares: primos, tíos, cuñadas, sobrinos, por la estimación y apoyo que siempre me han brindado, y especialmente a mis tíos Gerardo [†] y Liduvina, José María y Oliva, por su cariño incondicional.

A Dios, por darme la fuerza y perseverancia

A mis padres, María. Luisa y Adolfo, por su apoyo y cariño incondicional

A mi hermana y cuñado, María Idalia y Octavio, por su comprensión y afecto

A mi esposo, con todo mi amor, por compartir momentos difíciles y apoyarme en mi superación personal y profesional

A nuestros hijos Mildred y Adolfo, quienes son la motivación de mi vida, por su paciencia y comprensión

RESUMEN

Debido a las restricciones sobre el uso de colorantes sintéticos por su posible toxicidad, se ha desarrollado una legislación más estricta que regula los colorantes autorizados para su uso en alimentos, aumentando el interés por los colorantes naturales como posibles sustitutos, ya que a la fecha no hay evidencia de que su uso sea dañino. Entre los pigmentos naturales que dan tonalidades rojas se encuentran las betalainas, que se localizan solamente en diez familias del reino vegetal y están formadas por dos tipos de pigmentos solubles en agua: los rojo-violeta denominados betacianinas y los amarillos conocidos como betaxantinas. El betabel es la principal fuente de obtención de betalainas y es uno de los productos más utilizados, debido principalmente a su gran concentración de pigmentos y a la factibilidad de obtenerlos a nivel industrial. Sin embargo, es de gran interés encontrar otras fuentes de obtención de estos pigmentos. En el presente estudio se utilizó a la jiotilla (*Escontria chiotilla*), cactácea que crece en zonas áridas de los estados de Oaxaca, Michoacán y Guerrero principalmente y que produce frutos de pulpa roja, realizándose la caracterización fisicoquímica parcial del pigmento rojo de estos frutos. A partir de la pulpa de la jiotilla y de betabel se determinó el contenido de humedad y proteína cruda. Se encontró que ambos presentaron valores similares del 84 % de humedad y 4 % de proteína cruda. Posteriormente, se extrajo el jugo de los frutos de jiotilla y se separó en dos porciones: jugo natural a pH 4.0 y jugo ajustado a pH 5.8. Ambos extractos fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, el jugo ajustado fue secado por dos métodos: rotoevaporación y liofilización. El secado por liofilización fue el más adecuado para la obtención del extracto en polvo de jiotilla pues se obtuvo un polvo de color similar al color original del extracto, a diferencia del extracto secado por rotoevaporación cuyo color cambió. Una vez obtenidos los extractos crudos y deshidratados se les realizaron barridos espectrofotométricos en el intervalo de 200 a 700 nm. El jugo natural y jugo ajustado tuvieron espectros de barrido semejantes, observándose en ambos casos, dos picos de máxima absorbancia a 536 y 488 nm, los cuales fueron comparados con los del betabel y con los resultados obtenidos por otros autores, concluyéndose que se trata de betalainas, específicamente de

betacianinas (pigmentos rojos) y betaxantinas (pigmentos amarillos), respectivamente.

También se encontró un pico a 280 nm que indicó la posible presencia de proteínas. Éstas se analizaron por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica, encontrándose que las proteínas asociadas a los pigmentos rojos y amarillos son diferentes en la jiotilla y que la naturaleza de las proteínas asociadas al pigmento rojo son diferentes en betabel y jiotilla, ya que los perfiles cromatográficos y los valores de los tiempos de retención fueron distintos. En el espectro de absorción del jugo secado por liofilización los pigmentos rojos presentaron valores de máxima absorbancia semejantes a los del jugo ajustado, indicando que no sufrieron modificaciones durante el proceso de secado, mientras que los amarillos presentaron un ligero corrimiento en la absorbancia; este mismo comportamiento se observó en betabel. La separación de pigmentos del jugo de jiotilla se logró por la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como soporte celulosa microcristalina y una mezcla de disolventes polares formada por 2-propanol-etanol-agua-ácido acético (20:35:40:5), obteniéndose dos bandas con coloraciones rojo y amarillo, que de acuerdo a sus valores de máxima absorbancia correspondieron a betacianinas y betaxantinas. La cuantificación de pigmentos en los jugos natural y jugo estabilizado se realizó midiendo la absorbancia a 478 y 536 nm en diluciones apropiadas con buffer de citrato pH 5.8 y utilizando para fines de cálculo los valores de absorptividad reportados para betalainas. El contenido de pigmentos en jugo natural de jiotilla fue de 89 ± 6.5 mg de betacianinas/kg pulpa y 119 ± 3.1 mg de betaxantinas/kg pulpa, siendo valores bajos si se comparan con los obtenidos en el betabel, el cual tiene un rendimiento de 452 ± 5.9 mg /kg pulpa para betacianinas y 285 ± 3.1 mg/kg pulpa para betaxantinas. Mientras que el rendimiento del jugo liofilizado de jiotilla fue de 2.2 ± 0.05 mg betacianinas/g polvo y 3.3 ± 0.1 mg de betaxantinas/g polvo. Los pigmentos de jiotilla y de betabel en jugo natural, jugo estabilizado y sus fracciones fueron también identificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), encontrándose que la fracción amarilla de betabel y de jiotilla estuvo formada al menos por cuatro diferentes betaxantinas. En tanto que la fracción roja del betabel estuvo formada por cuatro diferentes betacianinas y la jiotilla por un solo compuesto. La composición de

pigmentos del tipo betacianinas y betaxantinas del betabel y jiotilla fue distinta. Es necesario continuar con estudios para conocer la estructura química de estos compuestos y así poder clasificarlos con mayor precisión.

ABSTRACT

The chemical and physico-chemical composition of the red pigment from the cactus fruit *Escontria chiotilla* has not been properly studied so far. This cactus, which produces a red pulp fruit, is grown in the southeast arid zone of Mexico called Mixteca Baja Oaxaqueña. Therefore, this work deals with the partial physico-chemical characterization of the red pigment extracted from this fruit. To achieve this goal, the fruit juice was obtained and stabilized with a citrate buffer at pH 5.8. Afterwards the juice was lyophilized and then hermetically closed into vials kept at -20°C for further analysis. The reconstituted juice was partially purified by using a preparative thin layer chromatography on cellulose coated plates. Both the 200-700 nm absorption spectrum and a gradient HPLC analysis were performed by using a C18 reverse phase column for each purified band obtained, and for the crude juice as well. Because there was a strong absorbance at 280 nm, both a crude protein assessment, by the Kjeldahl method, and a gradient HPLC hydrophobic protein analysis, by means of a reverse phase column C18, were carried out. The red pigment was found to be composed by 60% yellow betaxantin and 40% red betacianin, according to the strong absorption at 488 and 536 nm respectively when compared to the retention times of the red pigment from beet root. Apparently betaxantin and betacianin are not linked to the same proteins because of their different HPLC hydrophobicity protein profiles.

CONTENIDO

Contenido.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas y Cuadros.....	vi
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Principales características de la jiotilla.....	2
1.1.2 Distribución geográfica y propagación	4
1.1.3 Comercialización y consumo	6
1.2 Las betalainas y sus propiedades	6
1.2.1 Estructura química	7
1.2.2 Características físicas.....	11
1.2.3 Estabilidad	13
1.2.4 Producción de betalainas de cactáceas.....	17
1.2.5 Comercialización y usos de las betalainas.....	18
1.2.6 Separación, identificación y cuantificación de betalainas.....	20
1.3 Colorantes sintéticos y naturales.....	21
1.3.1 Regulación de colorantes.....	25
1.3.2 Los colorantes naturales.....	32
1.3.3 Comercialización.....	32
2. Justificación.....	34

3.	Objetivos.	35
3.1	Objetivo general	35
3.2	Objetivos específicos	35
4.	Hipótesis.....	36
5.	Materiales y métodos.....	37
5.1	Materia prima.....	37
5.2	Obtención y estabilización del extracto crudo.....	37
5.3	Secado del extracto crudo.....	40
5.3.1	Secado por rotoevaporación.....	40
5.3.2	Secado por liofilización.....	41
5.3.3	Determinación de los espectros de absorción.....	41
5.3.4	Análisis químicos	41
5.3.5	Determinación de humedad.....	41
5.3.6	Determinación de proteína cruda.....	42
5.6	Cromatografía en capa fina (TLC).....	43
5.7	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	45
5.7.1	Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	45
5.7.2	Cromatografía en fase reversa.....	45
5.8	Cuantificación de betacianinas y betaxantinas.....	46
6.	Resultados y discusión.....	48
6.1	Obtención del extracto crudo.....	48
6.2	Secado del extracto crudo.....	48
6.2.1	Secado por rotoevaporación.....	49
6.2.2	Secado por liofilización.....	49
6.3	Espectro de absorción en la región UV-visible.....	49
6.4	Análisis químico.....	54
6.4.1	Determinación de humedad.....	54

6.4.2	Determinación de proteína cruda.....	54
6.5	Cromatografía en capa fina(TLC).....	56
6.6	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	63
6.6.1	Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	63
6.6.2	Cromatografía en fase reversa.....	64
6.7	Cuantificación de betacianinas y betaxantinas.....	70
7.	Conclusiones.....	75
8.	Bibliografía.....	77
ANEXOS		
Anexo 1.	Métodos de secado.....	89
Anexo 2.	Cromatografía.....	93
Anexo 3.	Cuantificación de betacianinas y betaxantinas.....	98

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Escontia chiotilla</i>	3
Figura 2. Frutos de <i>Escontria chiotilla</i>	5
Figura 3. Estructura básica de las betalaínas.....	8
Figura 4. Estructura de resonancia de betalaínas.....	9
Figura 5. Estructura de las betacianinas.....	10
Figura 6. Estructura de las betaxantinas.....	12
Figura 7. Obtención del jugo de jiotilla.....	38
Figura 8. Metodología para la caracterización parcial del pigmento rojo de jiotilla y su comparación con betacianinas de betabel.....	39
Figura 9. Espectros de absorción del jugo de jiotilla.....	51
Figura 10. Espectro de absorción del jugo natural de betabel.....	53
Figura 11. Espectro de absorción del jugo liofilizado de jiotilla.....	54
Figura 12. Espectro de absorción del jugo liofilizado de betabel.....	56
Figura 13. Resultados obtenidos en la selección del sistema de disolventes adecuado para la separación de betalaínas por cromatografía en capa fina (TLC.....	58

Figura 14. Separación de pigmentos del jugo de jiotilla por TLC.....	59
Figura 15. Espectros de absorción del jugo de jiotilla y sus fracciones.....	61
Figura 16. Separación de pigmentos del jugo de betabel por TLC.....	62
Figura 17. Espectros de absorción del jugo de betabel y sus fracciones.....	63
Figura 18. Determinación de los valores de Rf de los pigmentos del jugo de jiotilla y betabel.....	65
Figura 19. Cromatogramas de interacción hidrofóbica en fase reversa para Proteínas asociadas a pigmentos en las fracciones de jiotilla.....	66
Figura 20. Cromatogramas de interacción hidrofóbica en fase reversa para Proteínas asociadas a pigmentos en las fracciones de betabel.....	67
Figura 21. Cromatogramas (HPLC) en fase reversa de pigmentos de jiotilla.....	69
Figura 22. Cromatogramas (HPLC) en fase reversa de pigmentos de betabel....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sistemas de disolventes empleados para la separación del pigmento rojo de jiotilla por cromatografía en capa fina (TLC).....	44
Tabla 2. Tiempos de retención a partir de los perfiles de HIC de proteínas, obtenidos por HPLC para jugo y fracciones de betacianina y betaxantina de betabel y jiotilla purificadas por TLC.....	68
Tabla 3. Tiempos de retención del análisis en cromatografía HPLC en fase reversa del jugo y fracciones purificadas por TLC de betacianina y betaxantina de betabel y jiotilla.....	71
Tabla 4. Análisis cuantitativo de pigmentos del jugo de jiotilla y betabel	72
Tabla 5. Comparación del contenido de betacianinas de diversos frutos.....	74

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de todas las betacianinas encontradas en frutas, flores, hojas, raíces de betabel y cactus.....	14
Cuadro 2. Colorantes sintéticos permitidos.....	27
Cuadro 3. Algunos de los colorantes naturales permitidos.....	28
Cuadro 4. Especificaciones de los colorantes según la Norma Oficial Mexicana..	30
Cuadro 5. Colorantes naturales permitidos en Estados Unidos.....	31

1. INTRODUCCION

Antecedentes

En los últimos años ha habido una gran tendencia a restringir el uso de colorantes sintéticos debido a su posible toxicidad, lo que se refleja en los continuos cambios que se realizan a las legislaciones. Como resultado de tales medidas ha aumentado el interés por los colorantes de origen natural como posibles sustitutos, ya que hasta la fecha no hay evidencia de que su uso sea nocivo a la salud (Ramos, 1983).

Entre los pigmentos naturales se encuentran las clorofilas, carotenoides, flavonoides, antocianinas y betalainas (Tafoya y García, 1993), todos ellos están presentes en una gran diversidad de productos y por consiguiente han sido estudiados desde hace varios años, a excepción de las betalainas, las cuales recientemente han despertado gran interés entre los investigadores ya que solamente se encuentran en diez familias del orden *Centrospermae* (Strack *et al.*, 2003; Mabry, 2001). Las betalainas obtenidas del betabel (*Beta vulgaris*) han sido las más estudiadas y utilizadas como aditivos en alimentos (Villegas *et al.*, 1983; López, 1985), sin embargo, se han iniciado diversos estudios con el propósito de encontrar otras fuentes naturales que contengan este tipo de pigmentos. A la fecha se han reportado algunas fuentes de obtención de pigmentos rojos como el amaranto, especialmente el género *Celosia* (Schliemann *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 1998), flores de bugambilia (*Bougainvillea glabra*; Heuer *et al.*, 1994), hongos del género *Amanita* y *Hygrocybe* (Girod y Zryd, 1991), algunas especies de pitayas

pertenecientes a los géneros *Hylocereus* y *Stenocereus* (Wybraniec *et al.*, 2001; Muy *et al.*, 1998), garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*; Reynoso *et al.*, 1997), flores del cactus de navidad (*Schlumbergera buckleyi*; Kobayashi *et al.*, 2000) y la jiotilla (*Escontria chiotilla*; Ramos, 1983; Pimentel, 1984). Cabe mencionar que la mayoría de estos trabajos se han enfocado a estudiar la estabilidad y uso de estos pigmentos como colorantes en alimentos, pero no al esclarecimiento de la estructura química. Tal es el caso de la jiotilla, de la cual se tienen pocos estudios debido principalmente a que es un fruto regional, poco conocido y explotado. Existe información de que la jiotilla podría ser una fuente viable de obtención de pigmentos rojos, para ser usados como colorantes en la industria alimentaria (Ramos, 1983).

1.1.1 Principales características de la jiotilla

La jiotilla se encuentra taxonómicamente ubicada dentro de la familia *Cactaceae*, perteneciente al orden *Centrospermales* o *Caryophyllales*. Su nombre científico es *Escontria chiotilla* (Weber) Rose (Anderson, 2001). Es una planta arborescente que alcanza de 4 a 7 metros de altura, el tallo principal es corto y grueso (40 cm de diámetro). Las ramificaciones tienen un diámetro de hasta 20 cm de color verde brillante, que se subdividen oblicuamente sobre su punto emergente y fácilmente se desprenden; poseen de 7 a 8 costillas, las areolas son elípticas, de aproximadamente 1 cm de longitud y con lanosidad corta y grisácea. Posee espinas radiales de 10 a 15 rectas y duras; las centrales son de 3 a 5 y tienen hasta 5 cm de largo, rectas y gruesas, de color marrón amarillento y con la punta más oscura. Una de estas últimas tiene una longitud mayor que el resto (Figura 1).



Figura 1. Planta de *Escontria chiotilla*

Las flores son pequeñas, su forma es campanulada y miden 3 ó 4 cm de largo, con pétalos externos de color amarillo parduzco y estambres amarillos. La floración es diurna (Nieto, 1980). Su fruto se reconoce fácilmente por ser globoso, de 3 a 4 cm de diámetro y de color verde grisáceo. Tienen pulpa roja comestible de sabor agridulce, con pequeñas pero abundantes semillas negras (Figura 2). Florece y fructifica de marzo hasta septiembre. Los nombres comunes que se dan a estos frutos son: jiotilla, quiotilla, chiotilla y xuega, y han sido comercializados principalmente en las zonas de producción durante muchos años. La especie es autóctona de Puebla, Oaxaca, Michoacán y Guerrero (Nieto, 1980; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995).

1.1.2 Distribución geográfica y propagación

La jiotilla crece en las zonas áridas y semiáridas, en lugares planos o de poca pendiente. Generalmente, se encuentra asociada con otras cactáceas de gran tamaño y las asociaciones que forman son llamadas “quiotillales” (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995). Se encuentra distribuida principalmente en los estados de Puebla, Oaxaca, Guerrero y Michoacán; ha sido colectada en el valle de Tehuacán, Calipán y Acatlán en el estado de Puebla; en Cuicatlán, Sierra Mixteca y Totolapan en el estado de Oaxaca; en el cañón del zopilote en el estado de Guerrero, y en la zona de la presa del Infiernillo en el estado de Michoacán (Nieto, 1980).

Actualmente la jiotilla no se cultiva ya que crece de forma silvestre en el “monte”, llegando a ser dominante en algunas comunidades vegetales. Se reproduce vegetativamente al desprender un brazo, aunque no siempre son fáciles de



Figura 2. Frutos de *Escontria chiotilla*

enraizar (López *et al.*, 2000). Generalmente, su propagación se realiza a través de semillas. Su crecimiento es lento por lo que su rendimiento no es apreciable a menos que se promueva su cultivo (Nieto, 1980). La época de floración ocurre en los primeros meses del año y la fructificación en los meses de abril, mayo y junio. La producción comienza a los 5 ó 6 años de la planta, a partir de entonces mantiene una producción constante (Nieto, 1980).

1.1.3 Comercialización y consumo

La recolección de la jiotilla ha sido una actividad importante para los habitantes de esas regiones, y su alta productividad hace de ella un recurso de gran interés. Su colecta se realiza durante los meses de junio y julio, y se vende en los mercados regionales.

La jiotilla tiene gran demanda por sus propiedades organolépticas y por lo tanto un alto consumo de la fruta es en fresco. Además se elaboran mermeladas, conservas, aguas frescas, etc. (Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995; Nieto, 1980).

Respecto al consumo per cápita, superficie y producción a nivel nacional no se tienen datos oficiales precisos, destacando entre las principales regiones productoras de jiotilla las ya mencionadas: Puebla, Oaxaca, Michoacán y Guerrero (Nieto, 1980).

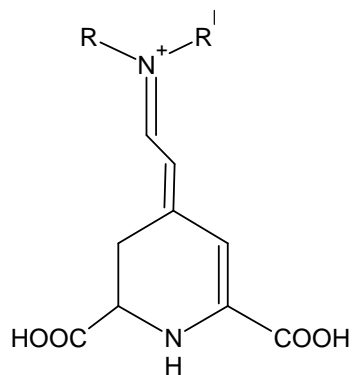
1.2 Las betalainas y sus propiedades

Las plantas que contienen estos pigmentos se limitan a diez familias del orden *Centrospermae* las cuales son: *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Portulacaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolacaceae*, *Stegnospemaceae*, *Arizoaceae*, *Bascallaceae*,

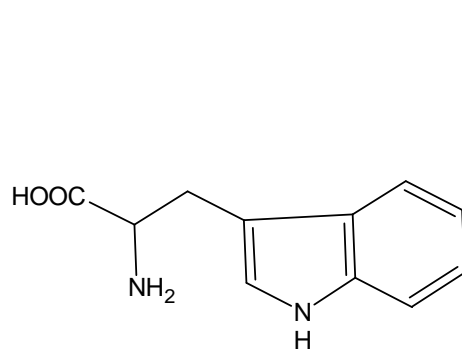
Mesembryanthemaceae, *Cactaceae* y *Didieraceae* (Villegas *et al.*, 1983). La presencia de betalainas en plantas es mutuamente excluyente de la presencia de antocianinas (Fennema, 1995). Entre las hortalizas comunes que contienen betalainas está la remolacha roja (betabel). También se han encontrado en algunas especies de amaranto, flores de bugambilia y en algunas especies de hongos (*Amanita muscaria*); en algunos frutos de cactáceas como la pitaya, el garambullo y en flores del cactus de navidad.

1.2.1 Estructura química

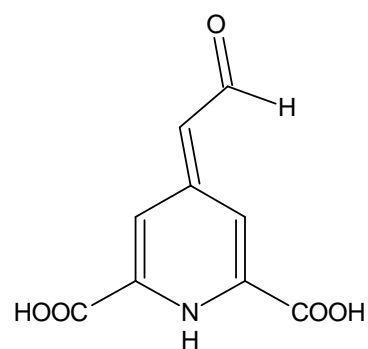
Las betalainas son compuestos orgánicos solubles en agua, con peso molecular entre 400 y 500. La estructura de las betalainas es diferente a la de otros pigmentos encontrados en el reino vegetal, ya que ésta contiene nitrógeno. A la fecha se conocen unas setenta betalainas y todas ellas poseen la misma estructura básica (Figura 3a), formada por la condensación de una amina primaria o secundaria como el triptofano (Figura 3b) y un aldehído llamado ácido betalámico (Figura 3c). Las betalainas están formadas por dos tipos de pigmentos, los rojo-violeta denominados betacianinas y los amarillos denominados betaxantinas (Fennema, 1995). El color de las betalainas se atribuye a sus estructuras en resonancia: si R o R' no proyectan la resonancia, el compuesto es amarillo y se denominan betaxantinas; si R o R' proyectan resonancia, el compuesto es rojo y se llaman betacianinas (Figura 4).



a) fórmula general



b) triptofano



c) ácido betalámico

Figura 3. Estructura básica de las betalainas

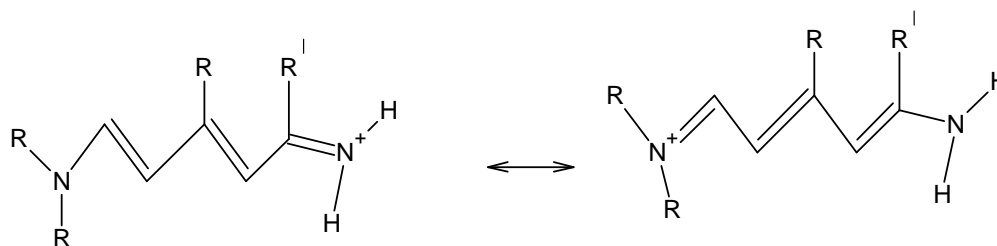
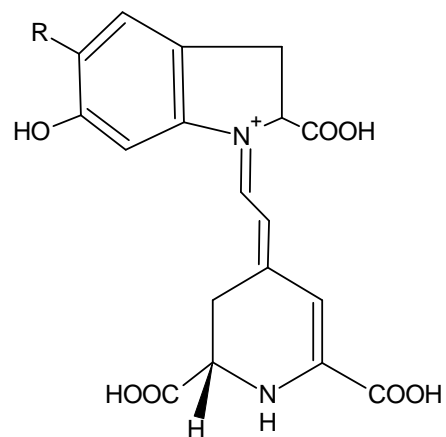
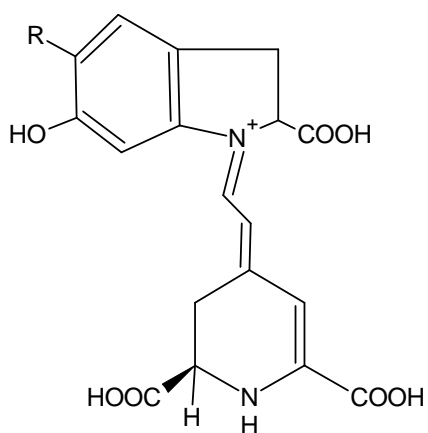


Figura 4. Estructura de resonancia de betalainas

Las betacianinas (pigmentos rojos) tienen como principal componente a la betanina; su naturaleza es altamente iónica al contener tres grupos carboxilo, dos de ellos con un pKa de 3.4 y otro de 2.0; además de un grupo fenólico con pKa de 8.5 y dos carbonos asimétricos en la posición 2 y 15, características que hacen a la betanina difícilmente separable de las betaxantinas. Las betacianinas (Rodríguez, 1985) se pueden hidrolizar con ácidos o enzimas y formar los aglicones llamados betacianidinas y el azúcar respectivo. Los aglicones en todas las betacianinas hasta ahora han sido de dos diferentes tipos, son diastereoisómeros y se les dieron los nombres de betanina e isobetanina en el betabel y amarantina e isoamarantina en el amaranto. Las estructuras de las betacianinas son mostradas en la Figura 5. Las diferencias entre las betacianinas se deben a su residuo glucósido (Nilsson, 1970; Rodríguez, 1985). La betacianina más abundante en el betabel es la betanina y se encuentra en una proporción de 75 a 95 % del total de betalainas y es la más estudiada a la fecha. Fue aislada por primera vez en 1957 del betabel (*Beta vulgaris*) por Wyler y Dreiding e independientemente en ese mismo año por Schmidt y Schönleben (Goodwin, 1976). Otras betacianinas en betabel son: isobetanina, prebetanina, isoprebetanina, betanidina e isobetanidina.



- a) Betanina R= -glucosa
- b) Betanidina R= -OH
- c) Amarantina R= -ácido 2'-glucurónico-glucosa



- d) Isobetanina R= -glucosa
- e) Isobetanidina R= -OH
- f) Isoamarantina R= -ácido 2'glucurónico-glucosa

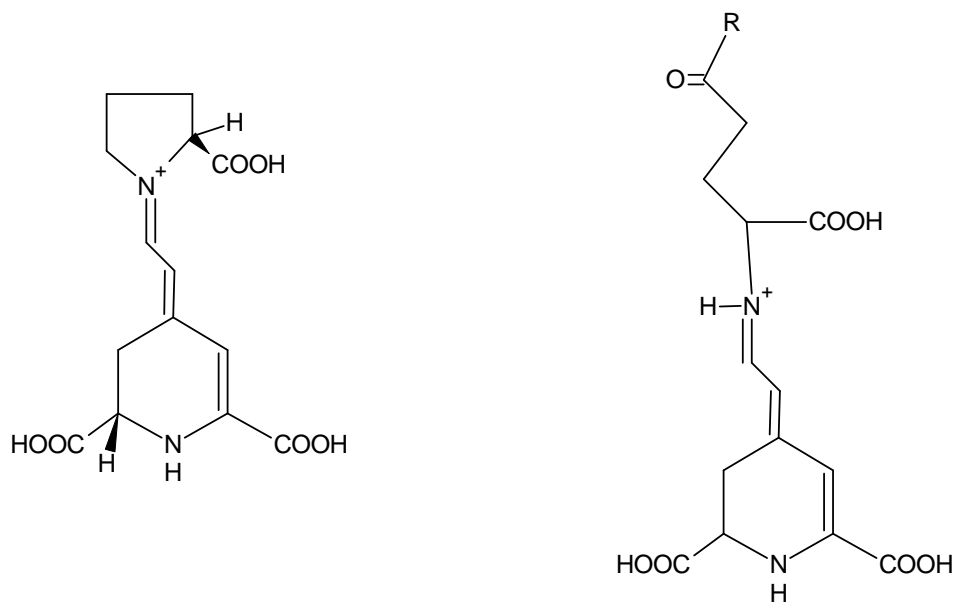
Figura 5. Estructura de las betacianinas

Las estructuras de estos pigmentos fueron establecidas en 1965 por Wilcox y Piatelli. En 1975 Herman y Dreiding los sintetizaron en forma parcial y sólo hasta 1978 fueron sintetizados en forma total por Buchi. En la familia *Cactaceae* la betanina es la betacianina que se encuentra en mayor cantidad. Asimismo, se ha detectado la presencia de filocactina, que se encuentra en menor cantidad (Ramos, 1983).

Con respecto a las betaxantinas (pigmentos amarillos), se tienen pocos datos ya que han sido poco estudiadas, debido principalmente a que son más difíciles de aislar, pero se tienen indicios de que son mucho más lábiles que las betacianinas (Rodríguez, 1985). La primera betaxantina aislada y caracterizada fue la indicaxantina por Piatelli y Minale en 1964 a partir de los frutos del cactus *Opuntia ficus-indica* (Figura 6a). Estructuralmente las betaxantinas son muy semejantes a las betacianinas, solo difieren de ellas en que el grupo indol es sustituido por un aminoácido. En el caso de la indicaxantina el aminoácido es la prolina. Posteriormente de la remolacha se han aislado dos betaxantinas llamadas vulgaxantina I y II (Figura 6b). Ambas difieren en que la prolina ha sido sustituida por glutamina y ácido glutámico, respectivamente. También han sido aisladas varias miraxantinas (Villegas *et al.*, 1983).

1.2.2 Características físicas

Una de las principales características de las betalainas es que absorben fuertemente la luz. Se ha observado que las betacianinas exhiben un máximo de absorción de luz aproximadamente a 537-538 nm y las betaxantinas en 480 nm.



a) indicaxantina

b) Vulgaxantina I, R= -NH₂

c) Vulgaxantina II, R= -OH

Figura 6. Estructura de las betaxantinas

Schwartz y Von Elbe en 1980 determinaron la absorbancia molar de la betanina con un valor de $60\,500 \text{ litro mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; convirtiendo la absorbancia molar, al coeficiente ideal de extinción ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) se obtiene un valor de $1120 \text{ \% mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nilsson, 1970) que se usa para calcular la concentración real de la betanina. Y para la vulgaxantina-I se ha determinado un valor de 750 y $\lambda_{\text{máx.}} = 478 \text{ nm}$ (Piatelli, 1964 y 1969). Estos valores son altos comparados con otras betalainas encontradas en otros productos, lo cual sugiere una fuerte y alta capacidad tintórea en estado puro (Cuadro 1).

1.2.3. Estabilidad

Al igual que otros pigmentos naturales, las betalainas se ven afectadas por diversos factores como la luz, pH, oxígeno, temperatura, metales, actividad de agua, ácidos orgánicos, cationes, antioxidantes y secuestrantes. Las betalainas son muy termolábiles y su velocidad de degradación se incrementa con la temperatura, siendo las betaxantinas mucho más sensibles que las betacianinas. Se ha observado que el efecto de la temperatura sigue una cinética de primer orden, lo cual ha permitido expresar la estabilidad de los pigmentos en términos de su vida media (Rodríguez, 1985; Saguy, 1979).

Las betalainas son estables en el intervalo de pH 3-7 y por lo tanto su uso como colorantes es factible ya que la mayoría de alimentos cae dentro de ese intervalo. Se tienen reportes de que la máxima estabilidad de la betanina está en el rango de pH de 4.0 a 5.0 (Huang y Von Elbe, 1987) y en otros estudios de 4.8 a 5.2 (García *et al.*, 1998). La velocidad de degradación a diferentes temperaturas está fuertemente

Cuadro 1. Clasificación de todas las betacianinas encontradas en frutas, flores, hojas, raíces de betabel y cactus (Piatelli y Minalle, 1964).

Pigmento	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$ *	λ_{max} (nm)	Mobilidad pH 4.5**	electroforética pH 2.4 ***
Amarantina		536	1.6	1.0
Isoamarantina		536	1.16	1.0
Betanina	1120	538	1.0	1.0
Isobetanina	1120	538	0.93	0.93
Iresinina-I		538	1.17	1.0
Iresinina-II		538	1.17	1.0
Filocactina	740	538	1.25	1.0
Celosianina		544-546	1.26	1.11
Isofilocactina	740	538	1.14	0.93
Isocelosianina		542-544	1.26	1.11
Buganvilleina-I		538-540	0.96	0.94
Buganvilleina-II		540-542	0.90	0.92
Gomprenina-I		535-537	1.00	0.96
Betanidina	1290	542-546	1.00	0.70
Buganvilleina-III		540-542	1.00	0.94
Buganvilleina-IV		540-542	0.96	0.81
Isobetanidina	1290	542-546	0.87	0.70
Gomprenina-II		536-538	0.91	0.89
Oleracina-I		534-536	0.80	0.72
Oleracina-II		534-536	0.80	0.72
Gomprenina-III		536-538	0.91	0.89
Buganvilleina-V		540-542	0.84	0.81
Buganvilleina-VI		544-546	0.84	0.81
Buganvilleina-VII		544-546	0.84	0.81
Gomprenina-IV		540-542	0.80	0.72
Prebetanina		540-542	1.34	1.78
Buganvilleina-VIII		544-546	0.84	0.81

Isoprebetanina	540-542	1.21	1.78
Buganvileina-IX	544-546	0.84	0.81
Gomprenina-V	542-544	0.80	0.72
Buganvileina-X	544-546	0.84	0.81
Gomprenina-VI	542-544	0.80	0.72
Rivianina	541-543	1.34	1.78
Buganvileina-XI	544-546	0.84	0.81
Gomprenina-VII	542-544	0.80	0.72
Buganvileina-XII	548-550	0.66	0.052
Gomprenina-VIII	540-542	0.80	0.72
Buganvileina XIII	549-551	0.66	0.052
Buganvileina XIV	550-542	0.66	0.52
Buganvileina XV	544-546	0.51	0.37
Buganvileina XVI	544-546	0.51	0.37
Mesembriantemina I, II y III	540-542	0.48	0.28

* Para los pigmentos cuyo valor de $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ se desconoce se asume que este es de 1000

** Movilidades electroforéticas relativas a betanina con formato de piridina 0.05 M

*** con ácido fórmico 0.1 M

influenciada por el pH y la actividad de agua, observándose que ambos tienen un efecto exponencial en la estabilidad del pigmento (Cohen y Saguy, 1983). Los pigmentos del betabel han mostrado ser inestables a altas actividades de agua, de tal manera que su uso se restringe a alimentos con baja A_w . Se pueden incrementar los tiempos de vida media del producto hasta en un 10 % si la actividad de agua se reduce (a 75 °C) de 1.0 a 0.37 (Cohen y Saguy, 1983). Las betalainas son severamente afectadas por el oxígeno; la reacción entre betalainas y oxígeno molecular parece ser una de las principales causas de la pérdida del pigmento. Se ha observado que el oxígeno causa un oscurecimiento del producto y la pérdida de la capacidad colorante. Su degradación en presencia de oxígeno puede llegar a ser hasta de un 15 % en solo seis días (Attoe y Von Elbe, 1985). La sensibilidad de la betanina al oxígeno sugiere la posibilidad de emplear antioxidantes que mejoren la estabilidad (Pasch y Von Elbe, 1979; Reynoso *et al.*, 1997). Los antioxidantes que contienen azufre y los compuestos fenólicos no son efectivos para estabilizar a las betalainas, y que se obtienen buenos resultados usando ácido ascórbico e isoascórbico (Attoe y Von Elbe, 1985). La mayor preservación del pigmento se obtuvo con la adición de ácido isoascórbico al 0.1% a pH 5.0 y 25 °C después de treinta días de almacenamiento, reteniéndose un 52 % del pigmento bajo luz, y 65 % en oscuridad (Bilyk *et al.*, 1981). El ácido ascórbico al 0.1 % es el mejor estabilizante para pigmentos del garambullo (García *et al.*, 1998). Sin embargo existe controversia en cuanto al comportamiento de las betalainas del betabel en presencia de estos antioxidantes, ya que algunos estudios han demostrado que si se añade ácido ascórbico en pequeña cantidad (menor a 100 ppm) no hay efecto en la estabilidad, pero en una proporción diez veces mayor (1000 ppm) causa un efecto

pro-oxidante. El efecto de ácidos orgánicos ha sido estudiado encontrándose que los ácidos acético y láctico en una concentración de 5.9 % no afectan la estabilidad de las betalainas (Pasch y Von Elbe, 1979).

Cabe señalar que muchos sistemas alimenticios actúan como estabilizantes de colorantes naturales, como consecuencia directa de su composición química. Las mezclas de sacarosa, fructosa y glucosa ejercen un excelente efecto protector sobre el colorante, lo mismo la presencia de algunos aminoácidos como la glicina y el triptofano. Las mezclas de azúcares adicionadas con ácido ascórbico, metasulfito de sodio y butilhidroxianisol (BHA) también ejercen importantes efectos protectores (Rodríguez, 1985).

1.2.4 Producción de betalainas de cactáceas

A la fecha se ha encontrado que la filocactina es el pigmento característico en flores y frutos de cactáceas (Piatelli e Imperato, 1969). Recientemente ha sido aislada de flores del cactus de Navidad (*Schlumbergera buckleyi*) (Kobayashi *et al.*, 2000) y se encontró que tiene como residuo glucósido a la glucosa. Por otra parte, características encontradas a través de datos obtenidos por NMR han confirmado la presencia de betanina en cactáceas (Strack *et al.*, 2003).

La segunda betacianina aislada de flores del cactus de Navidad es la 2'-apiosyl-filocactina, la cual, de acuerdo a estudios realizados sugieren la presencia de un residuo glucósido del tipo apiosa, que la hace diferente a la filocactina (Strack *et al.*, 2003). También se ha encontrado la presencia de betanidina en cactáceas (Kobayashi *et al.*, 2000). Por otro lado, se han detectado en extractos de pétalos de

cactáceas, cantidades muy pequeñas de otras dos betacianinas de menor polaridad con una máxima absorbancia en 330 nm. Una de estas se encontró que era idéntica a una betacianina de *Phytolacca americana* (5'-O-E-feruloyl-2'-O-β-D-apiosylbetanina) (Schliemann *et al.*, 1996).

1.2.5 Comercialización y uso de las betalainas

Desde hace algún tiempo se ha aceptado el uso de las betalainas del betabel como colorantes naturales para alimentos. En los últimos años, dada la prohibición de los colorantes rojos sintéticos, ha aumentado su demanda, lo que motivó que muchas compañías, en diferentes países, se dediquen a la venta de colorantes de betabel.

En general existen tres presentaciones:

- A) Polvo de betabel. Preparado a partir del betabel completo, secado y molido. Estos productos no son completamente solubles por contener la pulpa completa, pero tienen buena capacidad para teñir; esta es la presentación más económica.
- B) Concentrados de colorantes de betabel en forma de un líquido de alta viscosidad que contiene entre 40 y 60 % de sólidos totales. Se obtienen por evaporación al vacío de los extractos acuosos del betabel.
- C) Polvo de colorantes del betabel obtenido por secado por aspersión (spray-dried) de un concentrado del extracto acuoso.

Las presentaciones del tipo B y C son completamente solubles, pero son más caras que la presentación A (Villegas *et al.*, 1983). Por lo general las tres presentaciones contienen entre 0.3 y 1.0 % de colorantes, dependiendo de la

variedad de betabel utilizado y de las condiciones de cultivo y cosecha; el resto de los concentrados está constituido por azúcares (75-80%), proteína cruda (10 %) y cenizas (8-10%). Usualmente se les adiciona ácido ascórbico como estabilizante y propionato de sodio como conservador. Las tres presentaciones están en la lista de colorantes aceptadas para su uso en alimentos en Estados Unidos desde 1960 y no necesitan certificación (Villegas *et al.*, 1983).

A pesar de las limitaciones que presentan las betalainas debido a su estabilidad, las preparaciones de betabel son usadas para dar color a productos que tengan corto tiempo de almacenamiento, empacados en reducida exposición a la luz, oxígeno y alta humedad, no sean sometidos a largos tratamientos térmicos y además, sean vendidos en estado seco.

En diversos estudios se ha encontrado que las betalainas pueden llegar a sustituir a algunos colorantes rojos sintéticos en productos alimentarios (Villegas *et al.*, 1983):

- a) Alimentos secos: sopas secas (tomate), mezclas de especias, aderezos para ensaladas.
- b) Alimentos enlatados: jitomate enlatado, salsa catsup, salsa para pizzas; frutas enlatadas como cerezas, fresas y algunos vegetales.
- c) Alimentos en escabeche.
- d) Productos cárnicos: salchichas, hamburguesas, bologna, etc.
- e) Productos lácteos: helados, yogurt, malteadas y relleno de frutas.
- f) Postres y dulces: jaleas y mermeladas, pasteles de sabor a cereza y cerezas en almíbar.

g) Gelatinas y polvos para refrescos instantáneos.

Para lograr tonos adecuados generalmente se hacen mezcla de pigmentos naturales. No es recomendable su aplicación en alimentos como caramelos duros, productos de panadería y jugos, porque en estos productos presentan inestabilidad (Rodríguez, 1985).

1.2.6 Separación, identificación y cuantificación de betalainas

Ha sido necesario desarrollar procesos para separar los pigmentos debido a la diferencia de estabilidad existente entre betacianinas y betaxantinas, pues puede conducir a una pérdida diferencial de color durante el almacenamiento.

Los métodos comunes de separación y purificación emplean la cromatografía con resinas de intercambio iónico, o bien electroforesis en papel, estos métodos presentan desventajas como altos costos, largos tiempos requeridos y poco prácticos (Stuppner y Egger, 1996). Bilyk en 1981 propuso un método de separación empleando cromatografía en capa fina, con eluyentes polares como agua y etanol, con una acidificación previa de la muestra.

Otra alternativa para separar y purificar es empleando un aparato de difusión, para el cual se recomienda una extracción sólido-líquido, con jugo de betabel de pH 5.2 y temperatura inicial de 85 °C para optimizar la recuperación de betalainas (Wiley *et al.*, 1979). En lo que se refiere a la cuantificación de betalainas se emplean la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual que permite realizar conjuntamente un análisis cualitativo y cuantitativo (Vincent y Scholz, 1978; Schwartz y Von Elbe, 1980); y también la cromatografía en capa fina (Bilyk, 1981). La

cuantificación de betalainas puede ser complementada usando técnicas espectrofotométricas (Nilsson, 1970).

1.3 Colorantes sintéticos y naturales

Se sabe que la aceptación de un producto por parte del consumidor depende en gran medida de su apariencia, y por tanto, también de su color. El color y la apariencia son quizá los atributos de calidad más importantes de los alimentos debido a nuestra capacidad y facilidad para percibir estas características ya que son las primeras evaluadas por el consumidor al adquirir los alimentos (Fennema, 1995).

Los alimentos naturales tienen su propio color y los procesos tecnológicos empleados provocan que el color sea distinto en cada lote de producción o bien que las sustancias colorantes naturales terminen por destruirse por calor, acidez, luz, etc. (Calvo, 1999).

De manera general, los colorantes son adicionados a los alimentos por las siguientes razones (Torres, 1997):

- Asegurar uniformidad en tonos, evitando variaciones naturales en la intensidad de los mismos.
- Intensificar colores en alimentos donde se han visto disminuidos.
- Devolver al producto la apariencia original cuando el color natural ha sido destruido por el procesamiento.
- Conservar la identidad y el carácter de los alimentos.
- Como indicador visual de la calidad del producto.

Con respecto a los colorantes, un aditivo colorido de acuerdo con la FDA (Food and Drug Administration), es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia obtenida por la síntesis o artificio similar o extraída aislada o derivada, con o sin intermediarios del cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente y que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos o cosméticos, al cuerpo humano o cualquier parte, por sí misma es capaz (sola o a través de una reacción con otra sustancia) de impartir color (Tafoya y García, 1993; Hayward, 1992, Marmion, 1984). En México, la Secretaría de Salud enfoca su definición sobre el origen de las sustancias, caracterizándola como aquella obtenida de los vegetales, animales, minerales o por síntesis y que es empleada para impartir o acentuar el color, sin especificar su uso o aplicación (Diario Oficial, 1995).

Del conjunto de los aditivos alimentarios, el grupo de los colorantes es, probablemente, el que mayor polémica ha originado entre los consumidores. Frecuentemente, se les considera aditivos de dudosa utilidad por cuanto no influyen en la calidad del producto respecto a su conservación o calidad nutritiva, sin embargo debe considerarse que algunas sustancias como el β -caroteno o la riboflavina no son solo colorantes, sino también nutrientes. En consecuencia, y para que sean debidamente aceptados, el nivel de riesgo aceptable para un beneficio pequeño ha de ser en concentraciones que no causen toxicidad.

De acuerdo con su origen o procedencia, los colorantes pueden clasificarse en tres grandes grupos: naturales, idénticos a naturales y sintéticos o artificiales. Los colorantes sintéticos son aquellos que no son generados por la naturaleza y son producidos por síntesis química. Por el contrario, los pigmentos naturales son

generados por vegetales o animales, o bien encontrados en minerales. Y los idénticos a naturales los cuales también son producidos por síntesis química pero con características semejantes a los naturales, aunque algunas veces este grupo está incluido en los colorantes sintéticos. Actualmente existe una cierta tendencia a utilizar, cuando es posible, colorantes naturales en lugar de los sintéticos ya que se cree que son inocuos y, por tanto, sin riesgo para la salud humana (Hendry y Houghton, 1996). Las sustancias que se utilizan como aditivos colorantes sintéticos en alimentos deben cumplir con unos requisitos básicos con el fin de prevenir riesgos para la salud de los consumidores. Los requisitos exigidos son: deben ser inocuos; ser una especie química definida y pura; tener gran poder tintóreo con el objeto de utilizar la mínima cantidad posible y ser fácilmente incorporables al producto; tener la mayor estabilidad posible a la luz, calor, a los cambios de pH y a los agentes oxidantes y reductores; poseer compatibilidad con los productos que debe teñir; no poseer olor ni sabor desagradables con el fin de no variar las características del alimento que se colorea; ser lo mas económico posible (Calvo, 1999). Precisamente la preocupación por su seguridad ha hecho que los colorantes artificiales hayan sido estudiados en forma exhaustiva en lo que respecta a su efecto sobre la salud, mucho más que la mayoría de los colorantes naturales. Esto ha llevado a reducir cada vez más el número de colorantes utilizables, aunque existen grandes variaciones de un país a otro (Noonan y Meggos, 1980).

Entre los colorantes rojos sintéticos usados como colorantes en alimentos destacan el FD &C Rojo 2, 4 y 40. El Rojo No. 2 fue aprobado en 1907, pero estudios de toxicidad aguda y crónica efectuados por investigadores rusos suscitaron dudas respecto al efecto de este colorante. Posteriormente, en 1972 la

FDA inició nuevos estudios de toxicidad crónica en ratas preñadas a las cuales se les administraron diferentes dosis, observándose la muerte de fetos en todas las dosis. En 1975 la FDA nombró un Comité Consultivo de Toxicología para analizar estos resultados, pero el comité rechazó el estudio efectuado, argumentado que la dosis de prueba no se mantuvo constante, por lo que no se pudo demostrar en forma concluyente la toxicidad de este colorante (Viades, 1977; Villegas, 1979). En 1980 se rechazó una petición de registro permanente del Rojo 2 debido a que la información disponible era insuficiente para demostrar que el colorante era seguro (FDA, 1980). Sin embargo, la División de Protección de la Salud de Canadá consideró que las investigaciones realizadas por la FDA eran inadecuadas. Como resultado, este país decidió continuar usando el Rojo No. 2. En la misma posición están Suecia, Dinamarca y los países de la Comunidad Económica Europea. Por otra parte, Canadá ha prohibido el uso en alimentos del Rojo No. 40, después de que estudios reportados por la oficina de Salud Pública demostraron que su seguridad era insuficiente. Sin embargo en 1974 Estados Unidos aprobó en forma permanente el Rojo No. 40 y es en la actualidad el único color rojo certificado que se admite en ese país para cualquier uso en alimentos mientras que el Rojo 2 no es permitido en ese país.

En los últimos años la preocupación por la seguridad de los alimentos, y la presión del público, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes artificiales por otros naturales. Por ello, los pigmentos rojos naturales, en los últimos años han aumentado su demanda debido a que muchos colorantes sintéticos han sido prohibidos, por ejemplo el Rojo No. 2 en Estados Unidos, reemplazado por el Rojo

No. 40 el cual no ha sido aprobado por la mayoría de los países. Además, se ha analizado el factor económico, el cual es satisfactorio para los colorantes naturales gracias a las pequeñas cantidades que se utilizan en los alimentos, aunado a la seguridad en relación con la salud de los consumidores. Los pigmentos obtenidos a partir del betabel están permanentemente en la lista de colorantes aceptados para su uso en alimentos en Estados Unidos desde 1960 y no necesitan certificación (Villegas *et al.*, 1983). En cuanto a los pigmentos rojos naturales utilizados en México, se puede considerar que el betabel es la principal materia prima para la fabricación de colorantes rojos para su uso en alimentos (Villegas *et al.*, 1983).

1.3.1 Regulación de colorantes

Los colorantes se añaden a los alimentos en muchos países del mundo pero, el tipo de colorantes cuyo uso está permitido varía notablemente de unos países a otros. De cualquier manera, el comercio internacional es cada día más importante, por lo que la regulación sobre colorantes actualmente es una preocupación internacional. Desgraciadamente, no existe una lista mundial de todos los aditivos colorantes permitidos; por tanto, los aditivos colorantes en algunos casos representan una barrera al comercio. Sin embargo, los principios que rigen la legislación en alimentos son similares en todo el mundo. La Unión Europea se basa en tres principios importantes: 1) protección de la salud del consumidor, 2) prevención de fraudes, 3) eliminar barreras de comercialización. Las autoridades legislativas de la antes Comunidad Económica Europea (CEE) intentaron uniformizar la legislación para aditivos colorantes de los países del Mercado Común y a cada colorante permitido se ha asignado un número E (Francis, 1999).

En Estados Unidos a partir de 1938, el uso de colorantes está controlado por la FDA y se refiere a dos categorías de colorantes: colorantes certificados y colorantes exentos de certificación. Los colorantes certificados son productos sintéticos FD&C y el proceso de certificación consiste en realizarles análisis químicos bioquímicos, toxicológicos y médicos, los cuales deben garantizar la salud de los consumidores. Los colorantes certificados se clasifican como listados permanentemente o provisionalmente. Un colorante certificado aprobado “provisionalmente” puede utilizarse legalmente a la espera de completar toda la investigación científica necesaria para determinar en pro o en contra de su aprobación permanente.

Dependiendo del país, se permite el uso de determinados colorantes. En el Cuadro 2 se muestran los colorantes sintéticos permitidos tanto en la Comunidad Económica Europea como por la FDA de Estados Unidos y su estatus regulador en varios países (Fennema, 1995; Francis, 1999).

Los colorantes exentos de certificación o son pigmentos naturales o colorantes sintéticos específicos que son idénticos a los naturales; un ejemplo de estos últimos es el β caroteno que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pero que también ha sido sintetizado para alcanzar la condición de sustancia idéntica a la natural. Los colorantes exentos de certificación se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 2. Colorantes sintéticos permitidos (Fennema, 1995)

Nombre	No. de la CEE	No. de la FDA	Estatus legal regulador ^{a,b}			
			CEE	E.E.U.U.	Canadá	Japón
Eritrosina	E123	FD&C Rojo No. 3	+	+	+	+
Azul brillante FCF	---	FD&C Azul No. 1	-- ^c	+	+	+
Indigotina	E132	FD&C Azul No. 2	+	+	+	+
Tartrazina	E102	FD&C Amarillo No. 5	+ ^d	+	+	+
Amarillo quinolina	E104	FD&C Amarillo No. 6	+ ^e	--	--	--
Allura roja	---	FD&C Rojo No. 40	--	+	+	--
Amarillo 2G	E107	----	+ ^f	--	--	--
Ponceau 4R	E124	----	+ ^d	--	--	+
Carmoisina	E122	----	+ ^{d,e,g}	--	--	--
Amaranto	E123	FD&C Rojo No. 2	+ ^d	--	+	--
Rojo 2G	E128	----	+ ^f	--	--	--
Azul patentado	E131	----	+ ^d	--	--	--
Verde S	E142	----	+ ^{d,e,g}	--	--	--
Pardo FK	E154	----	+ ^f	--	--	--
Pardo chocolate HT	E155	----	+ ^h	--	--	--
Negro PN	E151	----	+ ^{d,e}	--	--	--

^a+

Permitido para uso en alimentos

- ^b En Noruega están prohibidos todos los colorantes sintéticos
- ^c Permitido en Dinamarca, Irlanda y Holanda
- ^d Prohibido en Finlandia
- ^e Prohibido en Portugal
- ^f Permitido solo en Irlanda
- ^g Prohibido en Suecia
- ^h Permitido en Holanda e Irlanda

Cuadro 3. Algunos de los colorantes naturales permitidos (Fennema, 1995)

Nombre	No. CEE	Estatus legal regulador ^a			
		CEE	E.E.U.U.	Canadá	Japón
Antocianina, zumo concentrado	E163	+	+	+	+
Pigmento de remolacha (rojo remolacha)	E162	+	+	+	+
Negro carbón	E153	+	--	+	+
β -apo-8'-Carotenal	E160e	+ ^b	+	+	--
Ester etílico del ácido β -apo-8'-carotenico	E160f	+ ^b	--	+	--
Extracto de bija	E160b	+	+	+	+
β caroteno	E160a	+	+	+	+
Cantaxantina	E161	+	--	+	+
Clorofila	E140	+ ^d	--	+	+
Complejos de cobre de la clorofila	E141	+	--	--	+
Caramelo	E150	+	+	+	+
Cochinilla	E120	+ ^{d,e}	+	+	+
Oxido de hierro	E172	+ ^{b,d}	--	+	+
Dióxido de titanio	E171	+ ^{b,b}	+	+	+
Riboflavina	E101	+	+	+	+
Cucumina	E100	+	+	+	+

a+

Permitido su uso en los alimentos en algunos países; limitado a alimentos específicos, -, prohibido para uso en alimentos

- ^b Prohibido en Portugal
- ^c Prohibido en Austria y Noruega
- ^d Prohibido en Finlandia
- ^e Prohibido en Suecia

Las regulaciones para los aditivos alimentarios permitidos en México se encuentran en el Reglamento de Aditivos para alimentos, emitido por la Secretaría de Salud y publicado en el Diario Oficial; por lo general adopta varias de las disposiciones de la FDA. En dicho reglamento se mencionan los colorantes órgano-sintéticos permitidos para ser utilizados en alimentos. Los usos que se les da a los colorantes sintéticos y naturales dentro de la Norma Oficial Mexicana se muestran en el Cuadro 4.

Sin embargo, con respecto a los colorantes naturales, la Secretaría de Salud refiere que aunque estos no requieren de certificación, deben cumplir con ciertas especificaciones químicas y toxicológicas como son:

- No debe tener más de 3 mg de arsénico/kg.
- No más de 10 mg de plomo/kg.
- Máximo contenido de mercurio de 1 mg/kg.
- En su desecación debe haber menos de 0.2% de pérdidas.
- Sea determinable por espectrofotometría de absorción.
- Sea determinable por medio de cromatografía.

En el Cuadro 5 se muestran los colorantes naturales permitidos en Estados Unidos. Como se puede observar existe gran semejanza entre los pigmentos naturales utilizados en México y Estados Unidos.

Cuadro 4. Especificaciones de los colorantes según la Norma Oficial Mexicana NOM-038-SSA1-1993 y NOM-119-SSA1-1994 respectivamente

Colorantes sintéticos		
Nombre oficial	Clasificación	Productos
Rojo No. 3 Eritrosina	Rojo-azul	Salsas, bebidas carbonatadas, pan y cereales, emulsiones aceite-agua
Rojo No. 40	Rojo-azul	Gelatinas, salsas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite-agua
Amarillo No. 5 tartrazina	Verde-amarillo	Gelatinas, bebidas secas, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite-agua
Azul No. 1	Verde-azul	Bebidas carbonatadas, bebidas secas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite-agua
Azul No. 5	Azul intenso	Confitería, gelatinas, emulsiones aceite-agua
Verde No. 3	Verde-azul	Gelatinas, bebidas secas, bebidas carbonatadas, confitería, pan y cereales, emulsiones aceite-agua.
Naranja B	Rojo-amarillo	Helados
Colorantes naturales		
Nombre oficial		
Aceite de zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	Color caramelo	Jugos de frutas
Achiote, annato (extracto de semilla de <i>Bixa orellana</i>).	Clorofila	Jugos de vegetales
Azafrán (estigmas de <i>Crocus sativus</i> , L.)	Cochinilla (extracto de <i>Coccus cacti</i> , L o carmín	Pimentón en polvo
Beta-apo-8'-carotenal	Curcuma (polvo y oleoresina del rizoma de <i>Curcuma longa</i> , L.)	Oleoresina de pimentón
Betabel deshidratado	Extracto de color uva (uva concord) (antocianina)	Riboflavina
Beta-caroteno	Extracto de tegumento de uva (enocianina)	Riboflavina-5-fostato
Cantaxantina	Harina de semilla de algodón, cocida, tostada y parcialmente desgrasada	Ester apocarotenoico

Cuadro 5. Colorantes naturales permitidos en Estados Unidos (Francis, 1999)

Nombre oficial	
Aceite de zanahoria	Extracto de cáscara de uva (enocianina)
Aceite de endospermo de maíz	Glutamato de hierro
Annato (extracto)	Harina de semilla de algodón (parcialmente tostada)
Azafrán	Harina de algas secas
Azul ultramarino	Jugo de frutas
Betabel deshidratado (polvo)	Jugo de vegetales
β -apo-8-carotenol	Oleoresina de paprika
β -apo-8-carotenol	Paprika
β -caroteno	Oxido de hierro sintético
Cantaxantina	Oleoresina turmérica
Caramelo	Riboflavina
Cochinilla (carmín)	Turmérico
Dióxido de titanio	

1.3.2 Los colorantes naturales

Hacer una distinción real entre los colorantes naturales y artificiales es difícil, porque al final lo natural debe ser tratado químicamente para que sea estable, identificable, uniforme en el tono. La idea de natural se aplica a la consideración general de ser inocuo para la salud y permitido su uso sin restricciones.

Aunque el término colorante natural pudiera prestarse a confusión, normalmente se aplica a aquellos productos de origen vegetal, animal o incluso mineral, en los cuales se encuentra de forma también natural. Por extensión, se consideran también naturales los colorantes obtenidos de materiales biológicos como algunos insectos o incluso los que se forman espontáneamente al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo (Rodríguez, 2002). En este sentido y aunque pudieran tener composición y potencial de tinción idénticos, se contraponen a los artificiales que son, en esencia, los obtenidos por síntesis química. Actualmente hay un considerable interés mundial en el desarrollo de los colorantes naturales, lo cual se ve reflejado en el incremento de patentes en los últimos años (Francis, 1986).

1.3.3 Comercialización

Los colorantes naturales se comercializan en forma de polvo seco o bien en fase líquida. Algunos colorantes se encuentran en las dos presentaciones como las betaninas. Los colorantes en polvo tienen la ventaja de economizar costos de transporte y almacenamiento, además de garantizar una mejor conservación de sus componentes.

En la industria alimentaria los colorantes naturales pueden emplearse directamente en forma de polvo o en su fase líquida. En algunos casos, el polvo puede prepararse como aceite esencial o como oleorresina. Ejemplo de ellos es la cúrcuma (Calvo, 1999).

Con el énfasis de hoy en incrementar la producción de alimentos para una población que crece día con día y la necesidad de hacer alimentos atractivos y aceptables, los colorantes usados en alimentos continuarán siendo un tema de gran interés. Los colorantes son una parte importante de la economía. Se ha estimado que el mercado mundial de colorantes en 1994 era alrededor de 265 millones de dólares, de éstos, los colorantes naturales representaron el 65 % (Francis, 1999). En México, el mercado estimado para los colorantes naturales está cubierto por el amarillo-naranja (55 %), rojos (25%) y colorantes de otro tipo (20%). Nuestro país se puede convertir en productor-exportador de colorantes naturales si se explotan las fuentes potenciales de estos pigmentos (Tafoya y García, 1993).

2. JUSTIFICACIÓN

Los colorantes sintéticos han sido ampliamente utilizados sobre los pigmentos naturales por su gran capacidad tintórea, estabilidad y producción así como su bajo costo. Sin embargo, también se conoce su toxicidad para el humano entre los que se encuentran trastornos hepáticos, alteraciones de conducta y aprendizaje, entre otros. Lo anterior ha restringido su uso en la industria alimentaria (Derache, 1990; Lindner, 1991; Giusti y Wrolstad, 1996). Actualmente, se han realizado esfuerzos en el desarrollo tecnológico para la obtención de pigmentos a partir de fuentes naturales como los carotenos de la flor de cempasúchil que se utilizan en la industria avícola para la tinción de yema de huevo y carne de aves. El pigmento rojo de betabel que se aplica ampliamente en los alimentos, es otro ejemplo de esta naturaleza.

En la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se ha integrado un grupo de investigación multidisciplinario con el fin de incentivar el aprovechamiento integral de ciertos productos agrícolas propios de la región de la Mixteca Baja Oaxaqueña, que son aprovechados parcialmente. Entre estos se encuentra el fruto de la jiotilla que se consume localmente como fruto fresco o en mermelada o aguas frescas. Este fruto tiene un atractivo color rojo lo que hace considerarlo como una fuente de pigmento rojo para su posible aplicación en la industria de los alimentos principalmente. De tal manera, que el presente trabajo se enfocó al estudio de caracterización del pigmento rojo del fruto de jiotilla para evaluar su posible explotación y aplicación en alimentos, así como iniciar estudios de ciencia básica para la identificación química de estos compuestos, que a la fecha son desconocidos. Estos estudios ayudarán a propuestas útiles de explotación de este fruto para contribuir al desarrollo económico de la región.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar una caracterización fisicoquímica parcial del pigmento rojo del fruto de jiotilla (*Escontria chiotilla*).

3.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Extraer y cuantificar el pigmento rojo del fruto de jiotilla en los extractos crudos.
- Evaluar la rotoevaporación y liofilización como métodos de secado del jugo de jiotilla.
- Realizar la caracterización fisicoquímica parcial del pigmento rojo utilizando espectrofotometría en la región UV-visible, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Cuantificar los componentes purificados parcialmente del pigmento rojo de jiotilla.

4. HIPOTESIS

Una fuerte absorbancia en las longitudes de onda de 537 y 480 nm en un extracto acuoso del fruto de jiotilla indicará la presencia de betacianinas y betaxantinas de colores rojo y amarillo respectivamente, que pertenecen al grupo de pigmentos conocido como betalainas. Asimismo, una comparación de éstos pigmentos con los pigmentos similares del betabel a través de técnicas como la cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución permitirán conocer las semejanzas y diferencias fisicoquímicas entre ambos pigmentos.

Por otra parte, un rendimiento de estos pigmentos comparables al del betabel, permitirá considerar al fruto de jiotilla como una fuente potencial de pigmentos.

5. MATERIALES Y METODOS

En la Figuras 7 y 8 se muestra un esquema de la metodología que se siguió para la caracterización del pigmento rojo de jiotilla y su comparación con el de betabel. Durante el desarrollo de este trabajo, todos los análisis se efectuaron por triplicado y los resultados fueron expresados como valores promedio.

5.1 Materia prima

Los frutos de jiotilla se colectaron en la región de la Mixteca Baja Oaxaqueña, en la comunidad de San Juan Joluxtla, Municipio de Huajuapán de León, Oaxaca, en estado de madurez comercial a criterio de los nativos del lugar. Esta recolección se realizó aproximadamente a los 90 días después de la floración en julio de 2002. Las muestras fueron transportadas en refrigeración al laboratorio. Posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Asimismo se utilizó betabel (*Beta vulgaris*) de variedad no clasificada, obtenido en un mercado urbano.

5.2 Obtención y estabilización del extracto crudo

Una vez descongelados los frutos de jiotilla a temperatura ambiente, se procedió a separar la cáscara de la pulpa y posteriormente a la extracción de jugo usando una prensa manual. El jugo obtenido se filtró a través de varias capas de manta de cielo y algodón para eliminar las semillas y sólidos en suspensión, obteniéndose un jugo cristalino. Los extractos obtenidos se juntaron y se les adicionó ácido ascórbico en

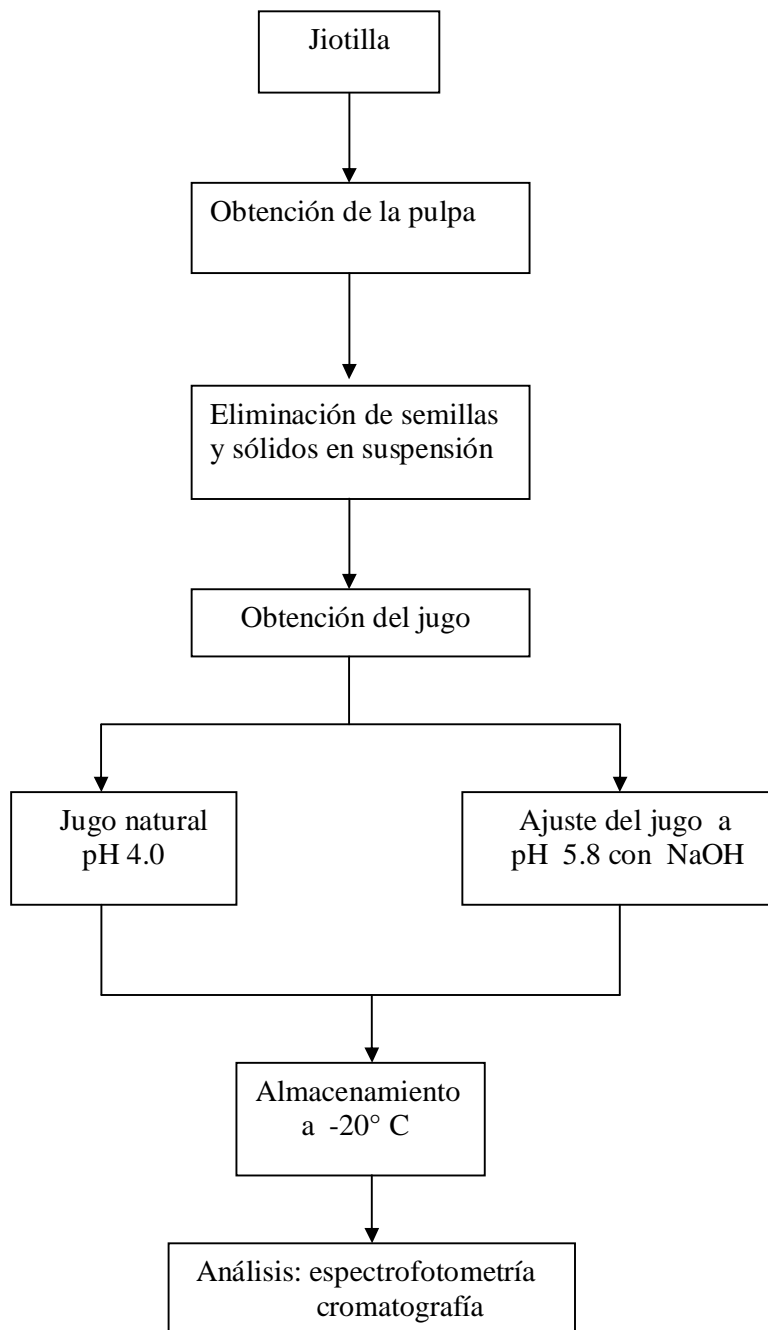


Figura 7. Obtención del jugo de jiotilla

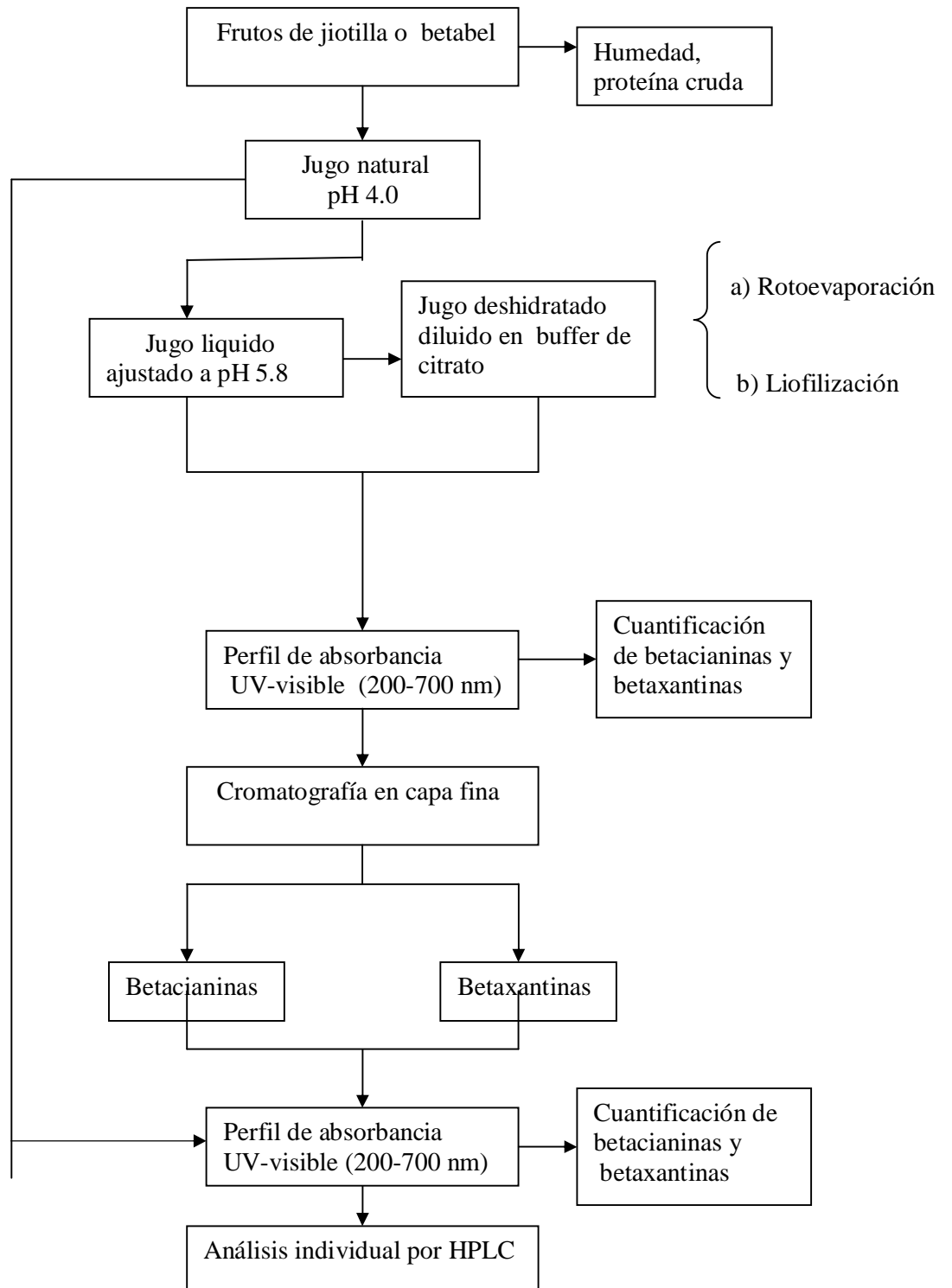


Figura 8. Metodología para la caracterización parcial del pigmento rojo de jiotilla y su comparación con betacianinas de betabel.

una concentración de 100 ppm (Bilyk *et al.*, 1981). Posteriormente, el jugo mezclado se separó en tres porciones iguales. La primera se guardó como jugo natural con un pH de 4.0 a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las otras dos porciones restantes se ajustaron con NaOH 1.0 y 0.1 N hasta alcanzar un pH de 5.8, ya que a ese valor de pH se ha reportado la mayor estabilidad de los pigmentos (García *et al.*, 1998) y por ello, a estas dos porciones se le denominó jugo ajustado. Este jugo también se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

En el caso del betabel, la extracción del jugo se realizó usando un extractor Moulinex y el jugo obtenido se dividió en dos porciones iguales, una se guardó como reserva y la otra se utilizó en los análisis. Ambas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3 Secado del extracto crudo

Siguiendo la metodología propuesta por Bilyk (1979), el jugo de jiotilla ajustado se sometió a un secado. Y con el propósito de establecer el método más adecuado para la obtención del jugo deshidratado se probaron los métodos de rotoevaporación y liofilización.

5.3.1 Secado por rotoevaporación

El secado por rotoevaporación del jugo de jiotilla ajustado se realizó en un rotoevaporador Büchi RE 111 (Suecia) a 180 rpm a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 horas. El jugo deshidratado se almacenó en viales cerrados, protegidos de la humedad y de la luz, a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.2 Secado por liofilización

Con la finalidad de optimizar el proceso, las muestras se congelaron previamente con hielo seco. Posteriormente, el secado se realizó utilizando un Liofilizador Labconco, modelo LYPH-LOCK 4.5 (USA), después de 6 horas se almacenó en viales cerrados, para protegerlos de la humedad y de la luz, a una temperatura de -20 °C. Para el jugo de betabel se siguieron los procedimientos anteriores.

5.4 Determinación de los espectros de absorción

Con el propósito de caracterizar el grupo químico al cual pertenece el pigmento rojo del jugo de jiotilla, se determinaron los espectros de absorción tanto del jugo natural como del jugo ajustado de jiotilla líquido y deshidratado, para ello se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-1601 (USA), con celdas de cuarzo de un centímetro de paso óptico. El jugo deshidratado que fue obtenido en el intervalo de 200 a 700 nm. Se utilizaron muestras diluidas convenientemente con buffer de citrato a pH 5.8. El mismo procedimiento se siguió para el jugo de betabel.

5.5. Análisis químicos

5.5.1 Determinación de humedad

Se determinó el contenido de humedad de la pulpa de jiotilla y de betabel de acuerdo al método descrito en la AOAC (2000). Se tomó una muestra de 2.0 g, la cual se colocó en un pesafiltro previamente puesto a peso constante, se secaron las muestras en un horno Ríos-Rocha S. A modelo HS 41 a 100 °C, hasta que ya no hubo variaciones en el peso, se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron

nuevamente. Las determinaciones se hicieron por triplicado y se calculó el porcentaje de humedad por diferencia de peso.

5.5.2 Determinación de proteína cruda

Se realizaron determinaciones de proteína cruda a la pulpa de jiotilla y de betabel por el método de Kjeldahl (AOAC, 2000) con la siguiente modificación. Se colocaron 0.2 g de pulpa con 0.8 g de catalizador (mezcla $\text{CuSO}_4\text{-K}_2\text{SO}_4$, en proporción 1:9) y 3 ml de H_2SO_4 en un matraz Kjeldahl. Una vez terminada la digestión, la muestra se diluyó con 5 ml de agua destilada y se le agregaron 15 ml de NaOH al 40%. Se destiló el amoniaco que fue recibido en 10 ml de H_3BO_3 al 2% con 3 gotas de indicador (solución alcohólica de rojo de metilo 0.2% y solución acuosa de azul de metileno 0.1% en partes iguales). Se tituló con HCl 0.1 N hasta el vire del indicador. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

El contenido de proteína cruda se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ N} = \frac{(V_m - V_{\text{bco.}}) \times N \times \text{meq} \times 100}{W}$$

V_m = Volumen de HCl consumido en la titulación de la muestra
 $V_{\text{bco.}}$ = Volumen de HCl consumido en la titulación del blanco.
 N = Normalidad del HCl
 W = Peso de la muestra en g
 meq = mili equivalente del nitrógeno (0.014)

El contenido de proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por un factor igual a 6.25

$$\% \text{ proteína cruda} = \% \text{ N} * \text{factor.}$$

5.6 Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina es una técnica comúnmente usada cuando un solo disolvente es incapaz de separar alguno de los compuestos presentes en una solución. Es posible separar los componentes eluyendo primero con una mezcla de disolventes y después con otra, y cada componente es separado a diferentes longitudes en la placa. Para la separación de pigmentos presentes en el extracto seco de jiotilla se siguió el método propuesto por Bilyk (1981) con las siguientes modificaciones: 100 mg del extracto deshidratado de jiotilla se disolvieron en 1 ml de solución buffer de citrato a pH 5.8 y fueron aplicados por medio de una micropipeta en placas de celulosa microcristalina K2F (Whatman, USA) de 20x20 cm y 250 μ de espesor. Con el propósito de encontrar el sistema más adecuado para la separación de pigmentos de la jiotilla se probaron tres sistemas de disolventes denominados A, B y C, como se muestra en la Tabla 1. Todos los reactivos fueron grado analítico (Baker, USA). Las mezclas de los diferentes sistemas de disolventes fueron denominadas con números romanos: I para el sistema menos polar y II para el más polar, eluyendo la muestra en dos fases, primero con el sistema II y posteriormente con el I.

Tabla 1. Sistemas de disolventes empleados para la separación del pigmento rojo de jiotilla por cromatografía en capa fina (TLC)

Solventes	Sistema de disolventes					
	A (%)		B (%)		C (%)	
	I	II	I	II	I	II
Isopropanol	55	30	50	25	45	20
Etanol	20	35	20	35	20	35
Agua destilada	20	30	25	35	30	40
Ácido acético	5	5	5	5	5	5

Después que la fase móvil alcanzó 9 cm, las placas fueron retiradas y secadas bajo una corriente de nitrógeno y protegidas de la luz con papel aluminio. Una vez separados los pigmentos rojos y amarillos se rasparon de las placas y se disolvieron con buffer de citrato pH 5.8, se centrifugó y el sobrenadante conteniendo los pigmentos se guardó en viales en oscuridad, atmósfera de nitrógeno y a -20 °C. Posteriormente a las fracciones individuales obtenidas se les determinaron los espectros de absorción con el propósito de identificar el grupo químico al cual pertenecen (betacianinas o betaxantinas).

Asimismo se determinaron los valores de R_f (factor de referencia) para el jugo de jiotilla y de betabel.

5.7 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

5.7.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

En los espectros de barrido de las fracciones de betacianinas y betaxantinas de la jiotilla y del betabel aparecieron picos de absorbancia a 280 nm posiblemente proteínas, por lo que se procedió a realizar su análisis por el método de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC; Franks, 1988), utilizando una columna de fase reversa PRP-infinity (Hamilton) de 30 x 4.1 mm y tamaño de partícula de 4 μ . La columna se acopló a un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Thermo Separations Products (USA). Para la elusión se preparó una solución A, que consistió de agua grado HPLC ajustada a pH 2 con ácido trifluoroacético y una solución B que consistió de ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo. Se utilizó un gradiente lineal de 0-50 % B en 20 min a una velocidad de flujo de 1 ml/min, temperatura ambiente y la detección se fijó a 215 nm.

5.7.2 Cromatografía en fase reversa (HPLC)

Se analizaron los pigmentos del extracto líquido crudo y extracto seco de jiotilla disueltos en solución buffer de citrato pH 5.8, así como de las fracciones separadas por cromatografía en capa fina (TLC). Se inyectaron volúmenes de 20 μ L en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Thermo Separation Products (USA), formado por un sonicador para degasificar, bomba Spectra SYSTEM P 4000, un inyector automático Spectra SYSTEM-AS 3500, acoplado a un detector Spectra SYSTEM UV-1000 y un registrador Spectra SYSTEM-SN 4000 integrado a un software PC 1000 versión Windows 98. Se utilizó una columna Nucleosil 100 (C₁₈ 5 μ , 250 mm x 4.6 mm, Alltech, USA). Para la elusión en gradiente se preparó una

solución A que contenía metanol/ KH_2PO_4 0.05 M (18:82 v/v) ajustado a pH 2.75 con ácido fosfórico y para el disolvente B se utilizó metanol puro. El gradiente lineal se inició con 100 % de la solución A hasta llegar a una mezcla del 80 % de la solución A y 20 % del disolvente B en 20 minutos, a una velocidad de flujo de 1ml/min (Cai *et al.*, 1998).

5.8 Cuantificación de betacianinas y betaxantinas

El contenido de pigmentos del jugo líquido y jugo deshidratado se determinó empleando el método espectrofotométrico desarrollado por Nilsson (1970) para pigmentos rojos (betacianinas) y pigmentos amarillos (betaxantinas) (para mayor información, ver el desglose de fórmulas en el anexo 3). En este método se consideró que la betanina presenta una absorción máxima entre 536-538 nm y un coeficiente de absortividad ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$) de 1120. Se tomaron alícuotas de 1ml del jugo líquido natural, jugo ajustado y 100 mg de jugo deshidratado y se hicieron diluciones convenientes en buffer de citrato pH 5.8, posteriormente se determinaron los valores de absorbancia a tres longitudes de onda: 480, 538 y 600 nm.

Las ecuaciones que se utilizaron fueron las siguientes:

BETACIANINAS (λ_{max} 538 nm).

$$A = (D.O._{538 \text{ nm}} - D.O._{600\text{nm}}) 1.095$$

$$B = A \times 0.009018$$

$$C \text{ (g/l)} = B \times \text{factor de dilución}$$

$$D \text{ (g)} = C \text{ (g/l)} \times \text{volumen del extracto}$$

$$\frac{\text{g de betacianinas}}{\text{kg de jiotilla}} = \frac{D (\text{g colorante}) \times 1000 (\text{g jiotilla/ kg jiotilla})}{\text{Peso de la muestra (g jiotilla)}}$$

BETAXANTINAS (λ_{max} 480 nm)

$$A = (D.O._{538 \text{ nm}} - D.O._{600 \text{ nm}}) \times 1.095$$

$$Z = D.O._{538 \text{ nm}} - A$$

$$Y = D.O._{478 \text{ nm}} - Z - \frac{A}{3.1}$$

$$T = Y \times 0.01333$$

$$V (\text{g/l}) = T \times \text{factor de dilución}$$

$$U (\text{g}) = V (\text{g/l}) \times \text{volumen del extracto}$$

$$\frac{\text{g de betaxantinas}}{\text{kg jiotilla}} = \frac{U (\text{g colorante}) \times 1000 (\text{g jiotilla/ kg jiotilla})}{\text{Peso de la muestra (g de jiotilla)}}$$

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Obtención del extracto crudo.

En la obtención de la pulpa de jiotilla se tuvo un rendimiento expresado como g/100 g de fruto de 54.71 ± 1.08 de pulpa y semillas; 35.92 ± 2.83 de cáscara y una merma de 9.37 ± 1.53 . En la extracción del jugo se obtuvo un rendimiento de 11.21 ± 1.14 ml de jugo/100 g de fruto y 20.51 ± 2.11 ml de jugo/100 g de pulpa. Los extractos de jugo obtenidos individualmente se juntaron dando un volumen total de 517 ml. Posteriormente, fueron guardados en viales cerrados con atmósfera de nitrógeno y cubiertos con papel aluminio, para protegerlos de la luz y oxígeno, y almacenados bajo condiciones óptimas de temperatura ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), hasta que fueron utilizados para su análisis. En la extracción del jugo de betabel se obtuvo un rendimiento de 56.1 ml de jugo/100 g de fruto. No se calculó el rendimiento de cáscara y pulpa debido a que la extracción del jugo se realizó directamente sin eliminar la cáscara, siendo este procedimiento más práctico y sencillo.

6.2 Secado del jugo de jiotilla

6.2.1 Secado por rotoevaporación

En el secado del jugo por rotoevaporación se obtuvo un producto con una apariencia caramelizada y un color anaranjado, al ser evaporado a una temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esto pudo ser debido a la reacción de los grupos aldehído y amino de los azúcares y proteínas, que puede dar lugar al oscurecimiento no enzimático o reacciones de Maillard, además de oxidación que puede propiciar cambios de color.

Asimismo, este resultado indicó que el pigmento rojo del jugo de jiotilla es termolábil, como lo son la mayoría de los pigmentos naturales, por lo que este método no fue adecuado para el secado del jugo.

6.2.2 Secado por liofilización

En el secado del jugo por liofilización se obtuvo un producto en polvo de color rojizo, semejante al color original del jugo, con un rendimiento de 124 mg de polvo/ml de jugo de jiotilla. Este método resultó ser el más apropiado debido a que no se observaron cambios en el color, y la textura del polvo fue adecuada. La liofilización es utilizada para la deshidratación de productos termolábiles como son los pigmentos naturales, aunque debido a su precio elevado se emplea poco en la industria alimentaria. Asimismo se utiliza en productos delicados y caros en los cuales es importante conservar en lo posible la calidad organoléptica, principalmente el color, sabor y la textura, que no puede lograrse mediante ningún otro método de secado. Por otra parte, es importante realizar este secado debido a que se reduce la actividad microbiana y las reacciones químicas y enzimáticas que pueden producir alteraciones en el producto. Además, otra finalidad importante es que se reduce el peso y algunas veces el volumen lo cual constituye una importante ventaja para el transporte y almacenamiento. También otra característica muy buscada es la comodidad en la forma de emplearlo.

Es importante señalar que el producto en polvo obtenido es muy higroscópico, por lo que resulta conveniente tener cuidado durante su manejo y almacenamiento.

En el secado de jugo de betabel por liofilización se obtuvo un producto en polvo con características semejantes al obtenido de la jiotilla. El polvo obtenido también presentó un color rojizo semejante al color original del jugo de betabel, por lo que este método también resultó adecuado para obtener el jugo seco de betabel, coincidiendo con los resultados obtenidos por Bilyk (1979). En este caso se tuvo un rendimiento de 86.5 mg polvo/ ml de jugo de betabel. También en otros estudios se ha reportado que para la obtención de presentaciones comerciales de colorantes a base de betabel, se efectúa una extracción con un disolvente y posteriormente se realiza un secado, el cual rinde un polvo rojo-rosáceo (Rodríguez, 1985).

6.3 Espectros de absorción en la región UV-visible

Jugo natural y ajustado

Como se muestra en la Figura 9, en el jugo natural de jiotilla se identificaron dos longitudes de máxima absorbancia, una a 535.8 nm y la otra a 488 nm y en el jugo ajustado a pH 5.8 a 535.7 y 487.8 nm. Haciendo una comparación de los espectros de absorción obtenidos en ambos jugos, podemos observar que fueron semejantes, encontrándose los mismos valores de longitud de onda de máxima absorbancia. Estos valores de máxima absorbancia fueron semejantes a los encontrados en otros estudios realizados en la jiotilla (Ramos, 1983; Pimentel, 1984) y correspondieron a betacianinas (536 nm) y betaxantinas (488nm) encontradas en el betabel (Bilyk, 1979; Villegas *et al.*, 1983; López, 1985). También se observó en ambos casos un pico de absorción a 280 nm, similar al reportado por Cai *et al.*, (1998) quienes lo asociaron con la presencia de proteínas acompañantes de la betacianina.

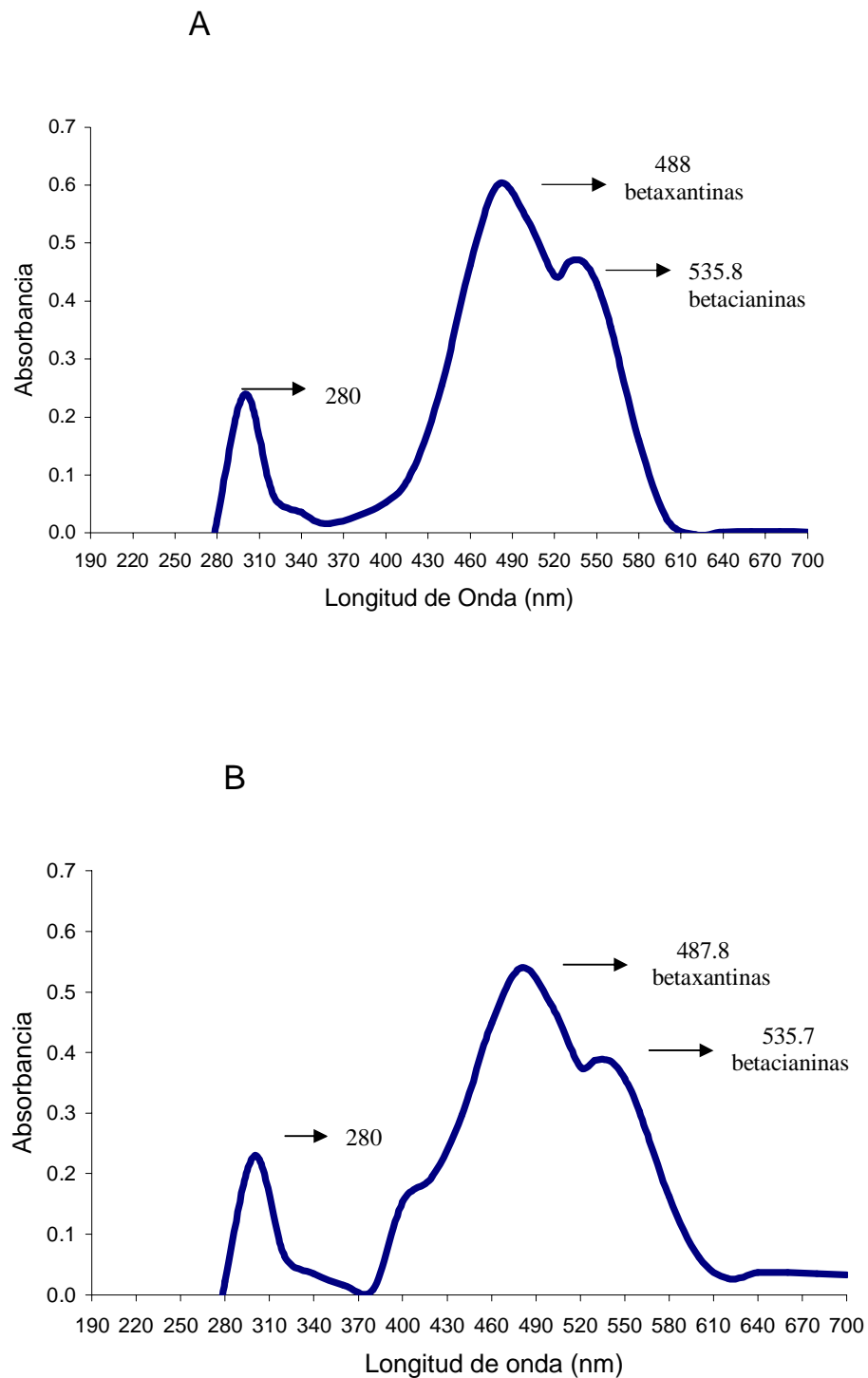


Figura 9. Espectros de absorción del jugo de jiotilla. Jugo natural pH 4.0 (A), Jugo estabilizado pH 5.8 (B)

En la Figura 10 se muestra el espectro de absorción del jugo natural de betabel, en donde se observaron dos longitudes de máxima absorbancia, una a 536 nm y la otra a 487 nm. Estos dos valores de máxima absorbancia se ha reportado que son característicos de betacianinas y betaxantinas, respectivamente (Bilyk, 1979 y 1981), y fueron muy semejantes a los encontrados en el jugo de jiotilla. También se encontró un pico de máxima absorbancia a 280 nm, observándose la posible presencia de proteínas.

Jugo liofilizado

El espectro de absorción del jugo de jiotilla secado por liofilización mostró que se siguió manteniendo la presencia de dos picos con máxima absorbancia a 536.0 y 479.0 nm (Figura 11), observándose que los valores de máxima absorbancia para pigmentos rojos fueron semejantes a los valores obtenidos para el jugo ajustado a pH 5.8.

En el espectro de absorción del jugo de betabel secado por liofilización se observó el mismo comportamiento que en la jiotilla, manteniéndose la presencia de dos longitudes de máxima absorbancia a 536.0 y 483.0 nm (Figura 12), siendo estos valores muy semejantes a los obtenidos en el jugo natural. Con base en estos resultados podemos decir que los pigmentos presentes en el jugo de jiotilla y de betabel durante este proceso no sufrieron cambios.

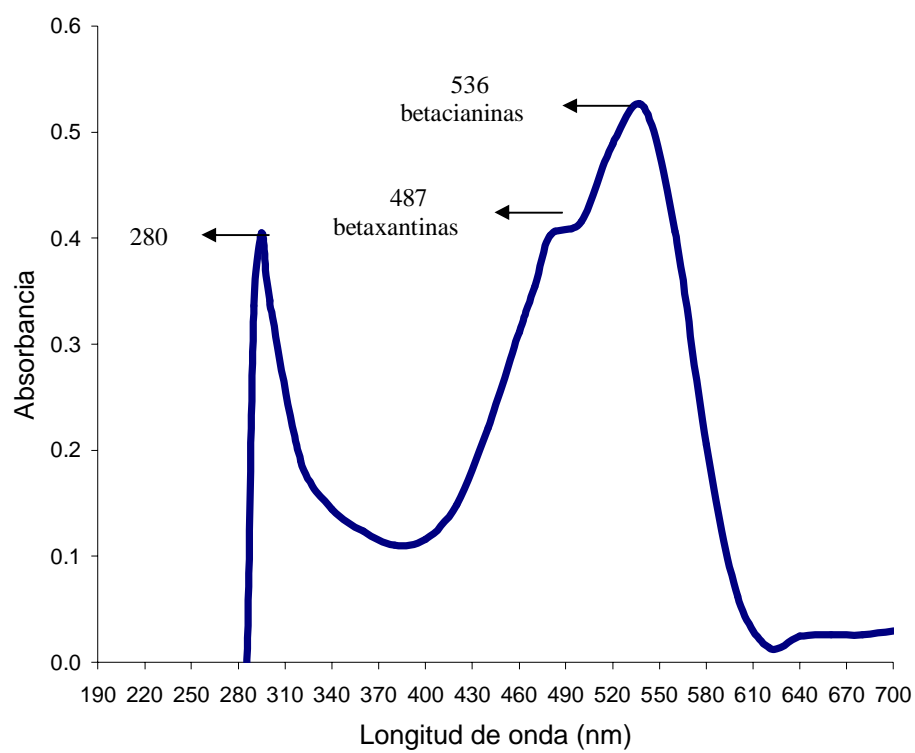


Figura 10. Espectro de absorción del jugo natural de betabel

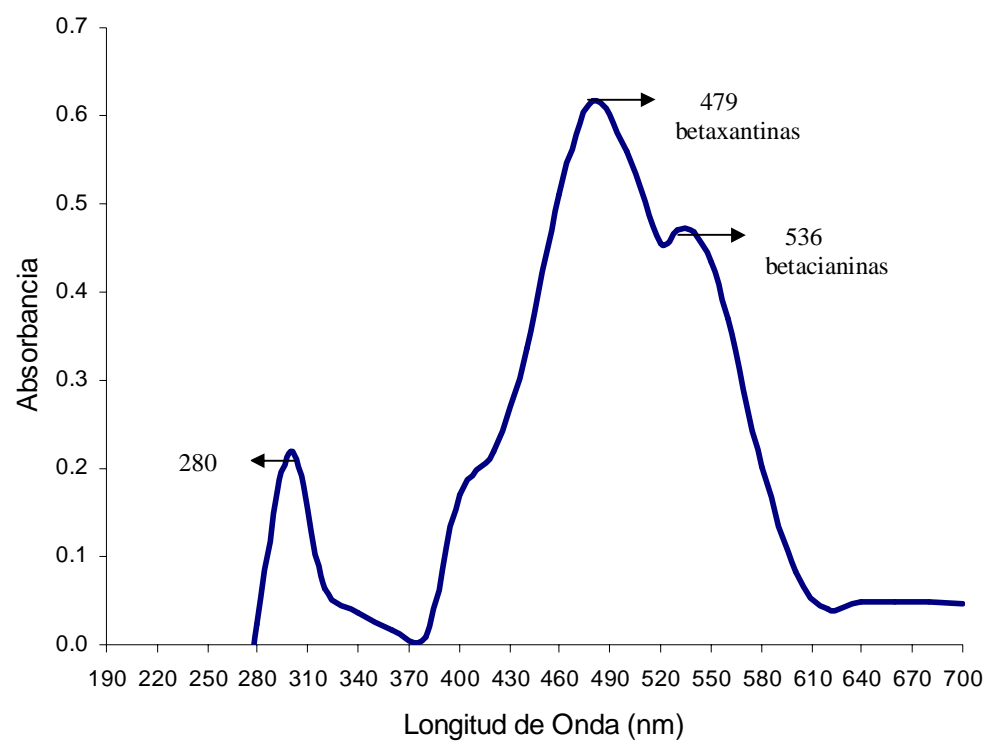


Figura 11. Espectro de absorción del jugo liofilizado de jiotilla

6.4 Análisis químicos

6.4.1 Determinación de humedad

El contenido de humedad encontrado en la pulpa de la jiotilla y del betabel fue semejante mostrando valores promedio de $84.48 \% \pm 0.65$ y de $83.09 \% \pm 0.66$ respectivamente. Estos resultados son semejantes con los valores reportados en la bibliografía (Ramos, 1983; López, 1985), indicando que el agua es el componente mayoritario en la porción comestible del fruto de jiotilla y del betabel, como sucede en la mayoría de las frutas y hortalizas. Cabe señalar, que el contenido de humedad en ambos pudiera variar debido a ciertos factores como el grado de madurez, edad de la planta, % humedad relativa, etc. (López, 1985).

6.4.2 Determinación de proteína cruda

El contenido de proteína cruda de la jiotilla y el betabel fue similar, reportando valores promedio del $3.76 \% \pm 0.15$ de proteína para la jiotilla y del $4.01 \% \pm 0.19$ para el betabel. De acuerdo a los resultados obtenidos por espectrofotometría, parte de esta fracción proteica parece estar estrechamente ligada a los pigmentos presentes en la jiotilla y el betabel. Los porcentajes indicados de proteína en jiotilla y betabel resultaron bastante altos comparados con los valores promedio reportados para frutas y hortalizas (1-2 %; Wills *et al.*, 1981).

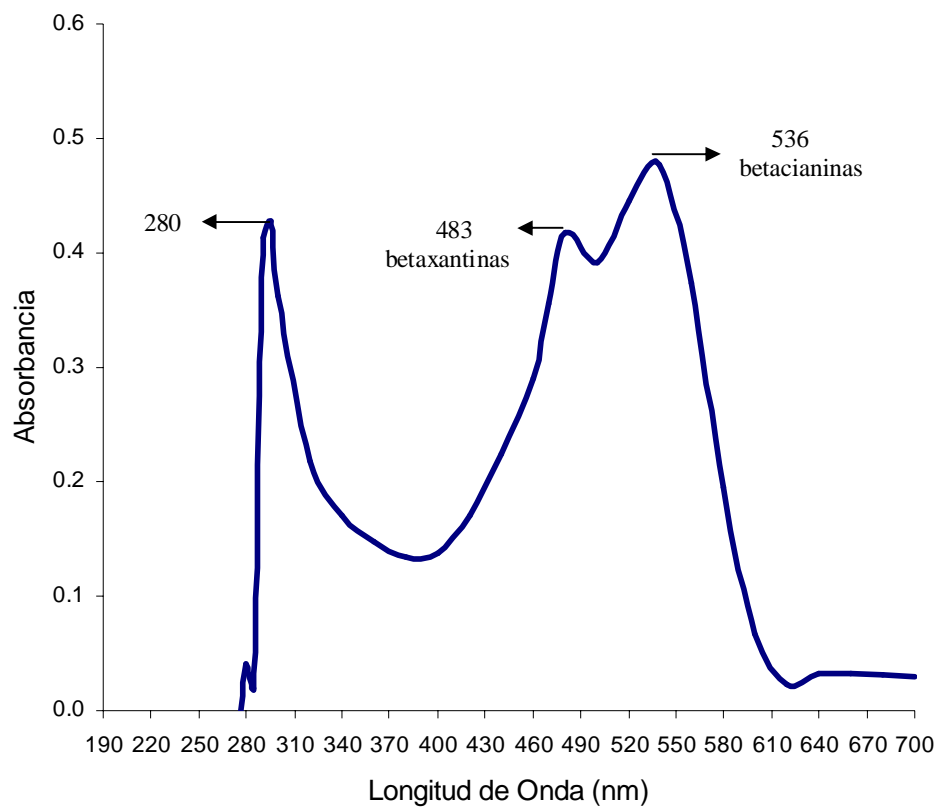


Figura 12. Espectro de absorción del jugo liofilizado de betabel.

6.5 Cromatografía en capa fina (TLC)

Durante el desarrollo de la técnica se tuvo especial cuidado en cubrir la cámara cromatográfica con papel aluminio para proteger las placas de la luz, lo cual podría causar degradación del pigmento. Asimismo, la adecuada separación por cromatografía en capa fina, estuvo influenciada por la apropiada aplicación de los pigmentos en la placa, a fin de evitar bandas irregulares.

Después de realizar pruebas con los tres sistemas de disolventes en diferentes proporciones y utilizando placas de 5x10 cm, se encontró que el sistema denominado C (ver materiales y métodos) dio la mejor separación de las fracciones, utilizando como soporte celulosa microcristalina. Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos por Bilyk (1981), quien utilizó el sistema denominado A para la separación de pigmentos del betabel. Las placas se desarrollaron en la mezcla con mayor polaridad, lo cual mostró que las betacianinas y betaxantinas de la jiotilla presentaron mayor polaridad con respecto a las del betabel. Los resultados obtenidos en los tres sistemas son mostrados en la Figura 13.

La separación de los componentes individuales por cromatografía en capa fina se muestra en la Figura 14. No fue necesario usar un indicador para la visualización de los pigmentos separados, ya que se observó claramente la presencia de dos bandas localizadas a diferentes longitudes en la placa: una de color rojo en la parte inferior, y la otra de color amarillo en la parte superior. Cabe mencionar que en las placas, después de 12 horas, los pigmentos amarillos no se decoloraron, pero los pigmentos rojos sí, indicando que en la jiotilla, las betaxantinas son más estables que las betacianinas.

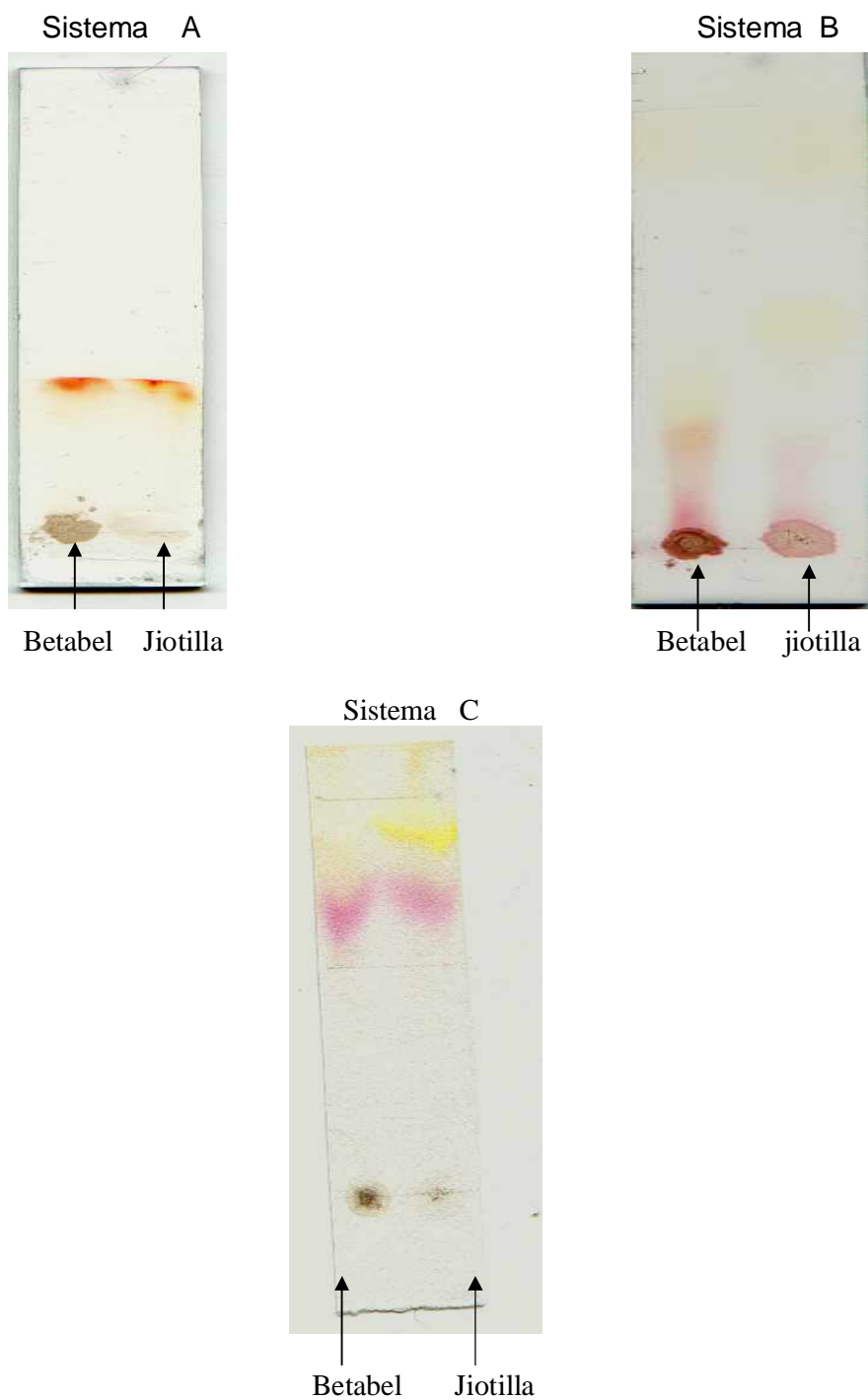


Figura 13. Resultados obtenidos en la selección del sistema de disolventes adecuado para la separación de betalinas por cromatografía en capa fina (TLC). Para las pruebas se utilizaron placas de celulosa microcristalina de 5x10 cm

- Para la separación de pigmentos se utilizaron placas de celulosa microcristalina de 20x20 cm
- Eluyente: 2-propanol-etanol-agua-ácido acético (20:35:40:5)

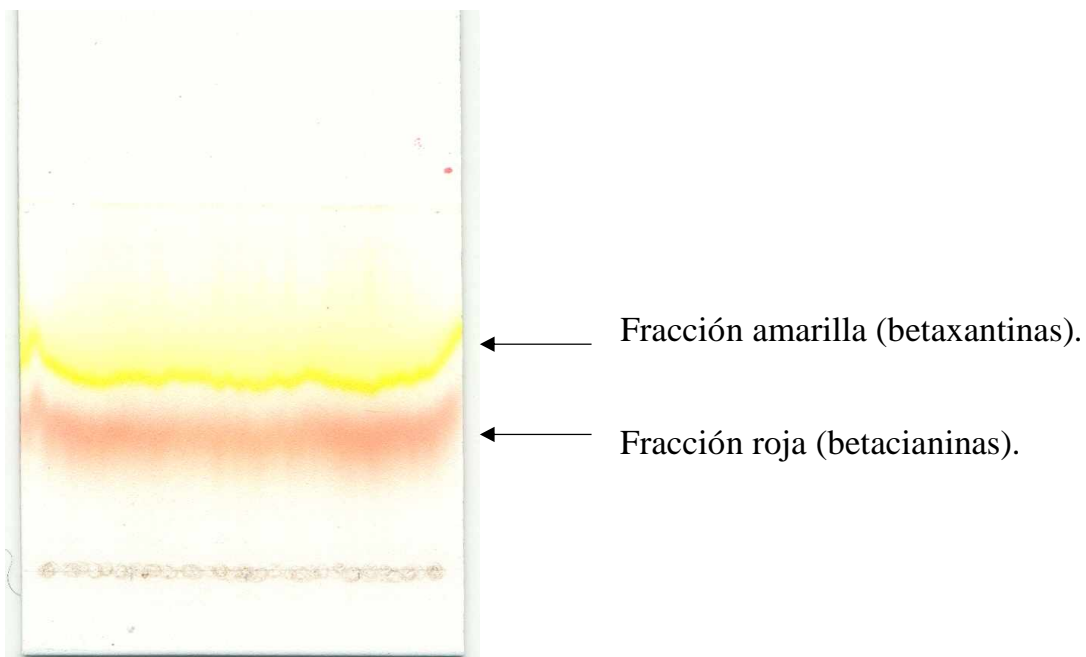


Figura 14. Separación de pigmentos del jugo de jiotilla por TLC

Los espectros de absorción de las fracciones obtenidas individualmente mostraron que los pigmentos rojos tuvieron su máxima absorbancia en 536 nm y los pigmentos amarillos en 480.2 nm (Figura 15); estos valores indicaron que los pigmentos separados siguieron manteniéndose en los mismos valores de máxima absorbancia sin modificarse. Con base en lo anterior, podemos decir que en el jugo de jiotilla y en sus fracciones separadas por TLC, se identificaron dos tipos de pigmentos que al ser comparados con los obtenidos en trabajos realizados sobre este fruto (Ramos, 1983; Pimentel, 1984) y con el betabel (Bilyk, 1981, López, 1985) correspondieron a betacianinas (pigmento rojo) y betaxantinas (pigmento amarillo), respectivamente.

Con respecto al betabel, se aplicó el mismo sistema de disolventes utilizado en la jiotilla. Los resultados obtenidos fueron semejantes a los encontrados en la jiotilla como se muestra en la Figura 16, observándose igualmente la presencia de dos bandas: una de color rojo y otra de color amarillo. De igual forma se purificaron las fracciones obtenidas individualmente y se determinaron los espectros de absorción. Los resultados mostraron que la máxima absorción para los pigmentos rojos fue en 537 nm y para los pigmentos amarillos en 477.5 nm, coincidiendo con los resultados reportados por Bilyk (1981) en betabel, y que son característicos de betacianinas y betaxantinas, respectivamente (Figura 17). Al efectuar el corrimiento de las placas con el mismo sistema de disolventes se encontró que los pigmentos rojos de la jiotilla y del betabel mostraron valores semejantes de $R_f = 0.4 \pm .01$, mientras que los pigmentos amarillos tuvieron valores diferentes $R_f = 0.5 \pm 0.02$

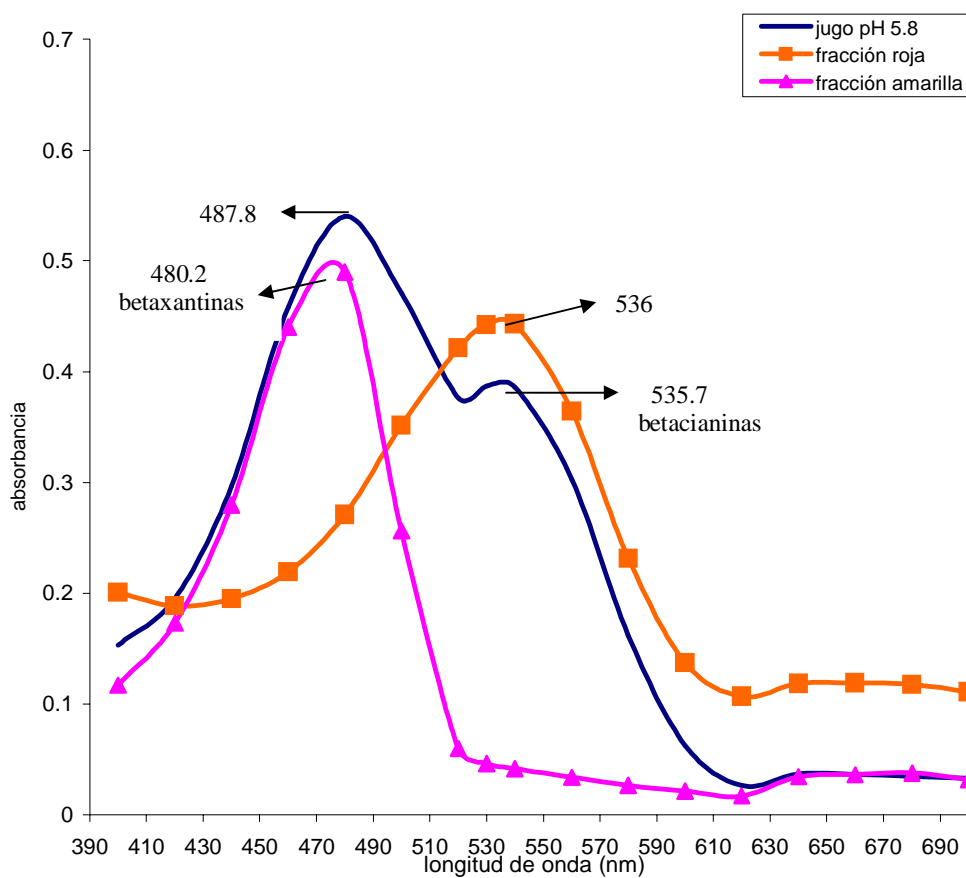


Figura 15. Espectros de absorción del jugo de jiotilla y sus fracciones

Placa de celulosa microcristalina (20x20)

Eluyente: 2-propanol-etanol-agua- ácido acético (20:35:40:5)

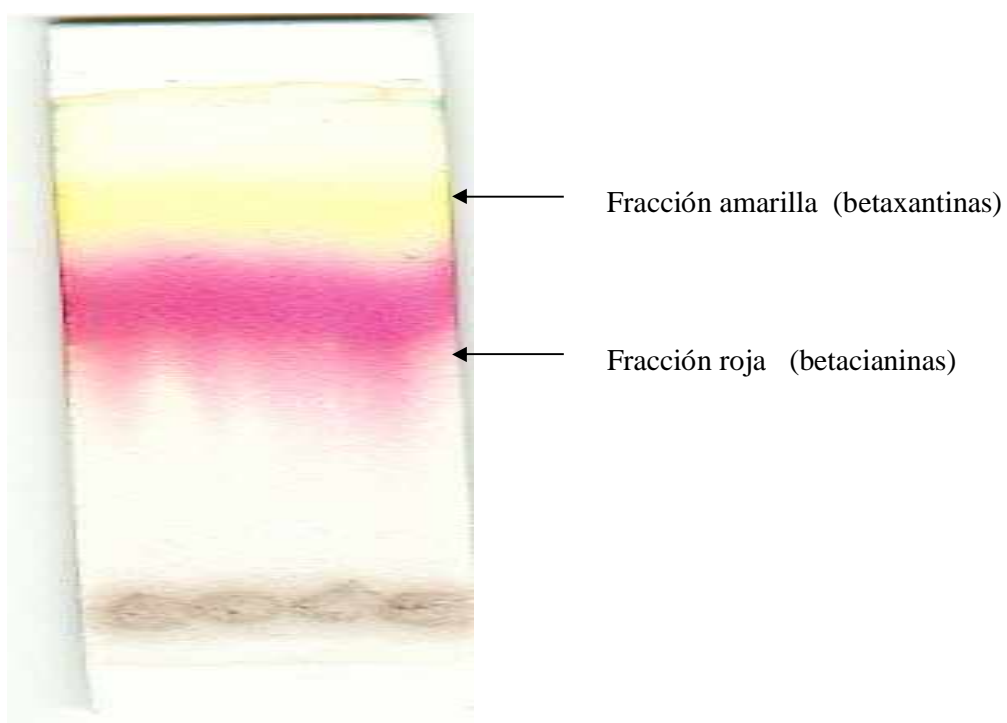


Figura 16. Separación de pigmentos de jugo de betabel por TLC

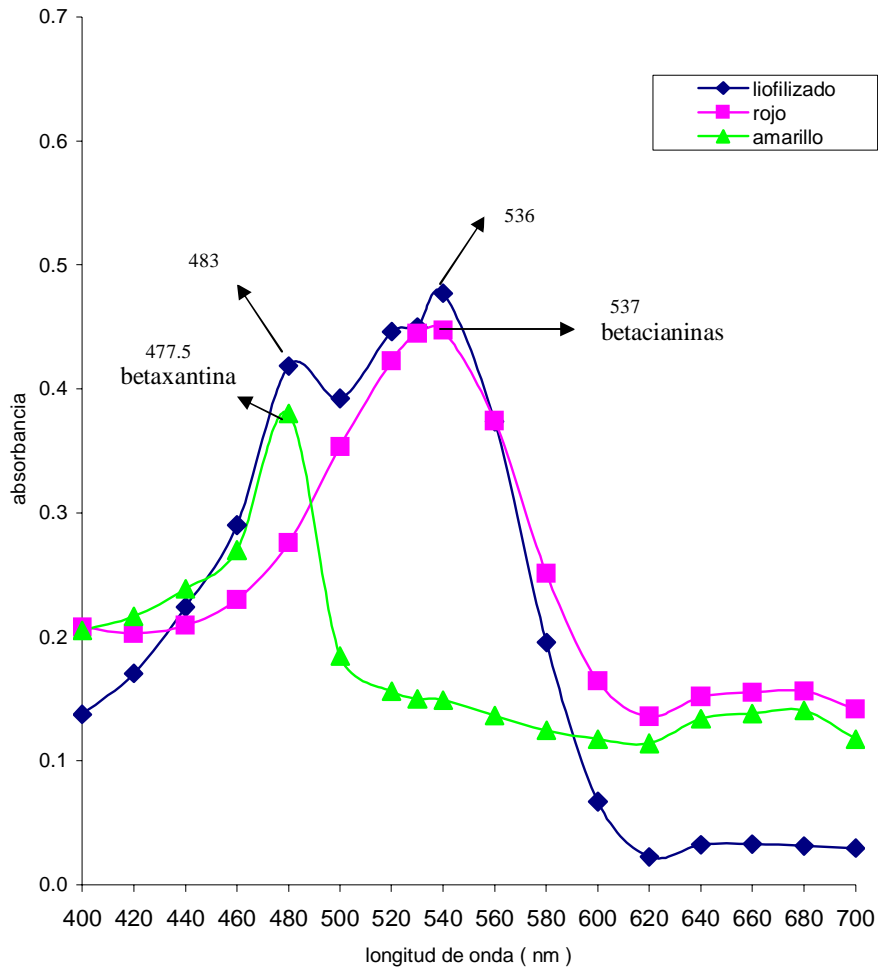


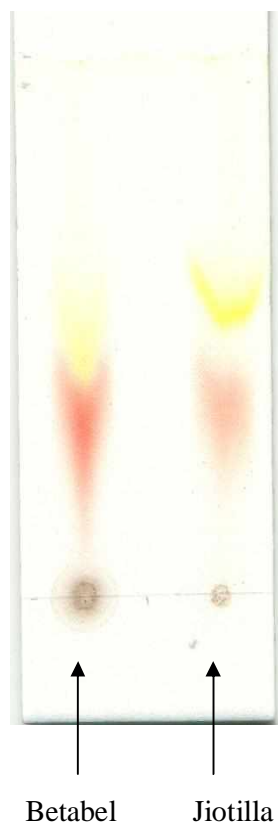
Figura 17. Espectros de absorción del jugo de betabel y sus fracciones

para el betabel y de 0.6 ± 0.02 para la jiotilla (Figura 18). Estos resultados indicaron que los pigmentos rojos de betabel y jiotilla tienen más semejanzas en cuanto a su comportamiento sobre la placa en capa fina con el sistema de disolventes empleado, que el mostrado por los pigmentos amarillos.

6.6 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

6.6.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

En los cromatogramas que se obtuvieron de HIC (Figuras 19 y 20) podemos observar que al comparar los tiempos de retención de las proteínas que se encuentran asociadas a betacianinas y betaxantinas en el caso del betabel parecen ser las mismas (Tabla 2), y que la proteína hidrofóbica ($tr=3.78$) es una asociación de al menos dos proteínas. La proteína ($tr=6.86$) no aparece en los extractos purificados. En el caso de la jiotilla las proteínas asociadas a betacianinas y betaxantinas son distintas dado que los perfiles cromatográficos son diferentes. Las proteínas asociadas al pigmento rojo en betabel y jiotilla también son diferentes, ya que los perfiles cromatográficos y valores de tiempos de retención son totalmente distintos. Las proteínas asociadas a pigmentos en la jiotilla son en términos generales más hidrofóbicas puesto que hay proteínas con $tr > 4$. Aunque la proteína ($tr=6.86$) del betabel es la más hidrofóbica, aparece apenas en el cromatograma. No fue posible comparar estos resultados con trabajos de otros autores debido a que hasta donde se sabe, no existen reportes precisos acerca de la composición de proteínas asociadas a betalainas.



Fracción roja (betacianinas)

Rf Betabel = 0.4 ± 0.01

Rf Jiotilla = 0.4 ± 0.01

Fracción amarilla (betaxantinas)

Rf Betabel = 0.50 ± 0.02

Rf Jiotilla = 0.60 ± 0.02

Figura 18. Determinación de los valores de Rf de los pigmentos del jugo de jiotilla y betabel

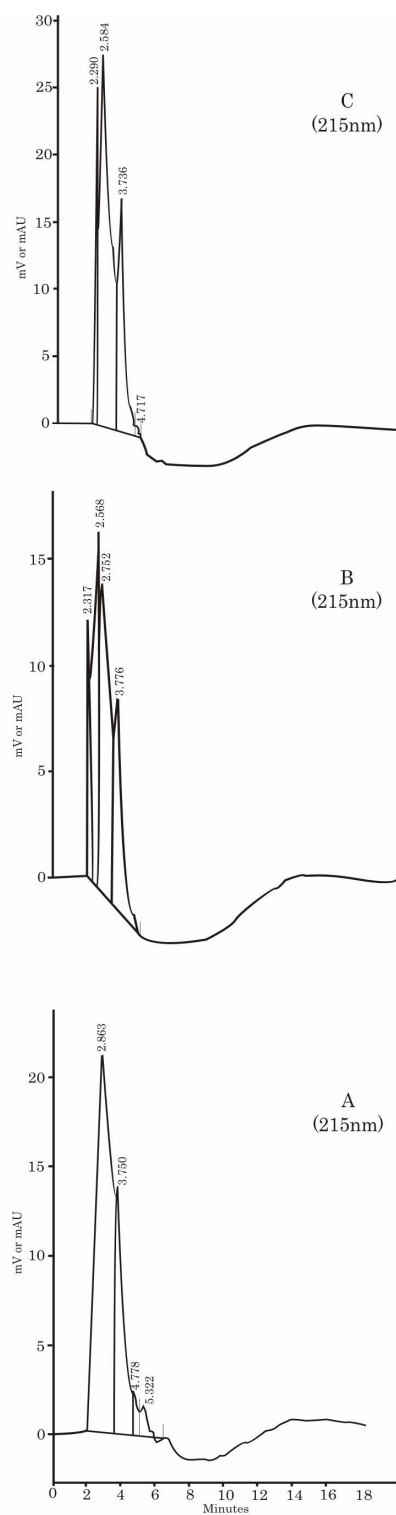


Fig. 19. Cromatogramas de interacción hidrofóbica en fase reversa (HIC) para proteínas asociadas a pigmentos en diferentes fracciones de jiotilla (*Escontria chiotilla*). A) jugo, B) betacianina y C) betaxantinas

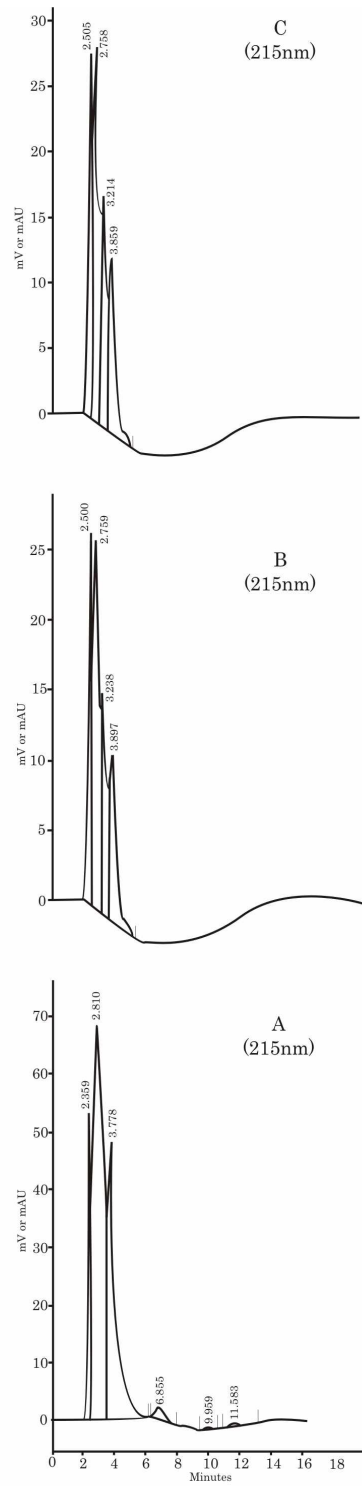


Fig. 20. Cromatogramas de interacción hidrofóbica en fase reversa (HIC) para proteínas asociadas a pigmentos en diferentes fracciones de betabel (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*). A) jugo, B) betacyaninas y C) betaxantinas.

Tabla 2. Tiempos de retención (tr) a partir de los perfiles de HIC de proteínas, obtenidos por HPLC para jugo, y fracciones de betacianina y betaxantina de betabel y jiotilla purificadas por cromatografía en capa fina (TLC)

	Betabel (tr min)	Jiotilla (tr min)
Jugo	2.36; 2.81; 3.78; 6.86	2.86; 3.75; 4.78; 5.32
Betacianina	2.50; 2.76; 3.24; 3.90	2.32; 2.57; 2.76; 3.78
Betaxantinas	2.56; 2.76; 3.21; 3.86	2.29; 2.59; 3.74; 4.72

6.6.2 Cromatografía en fase reversa (HPLC) de los pigmentos de jiotilla y betabel

En la cromatografía en fase reversa (Figuras 21 y 22), se puede apreciar que la composición de la fracción amarilla (betaxantinas) tanto de betabel como de jiotilla estuvo formada al menos por cuatro diferentes compuestos. En el caso del betabel, podrían corresponder a vulgaxantinas I y II, y miraxantinas II y IV (Schwartz and Von Elbe, 1980) que son los pigmentos que se han encontrado en mayor proporción, cuando se utilizan diferentes sistemas de elusión. Mientras que la composición de la fracción roja (betacianinas) del betabel, podrían corresponder de mayor a menor polaridad y en orden creciente a sus tr a betanina, isobetanina (ambos glucósidos) y betanidina e isobetanidina (ambos aglicones). En el caso de la jiotilla, se obtuvo un compuesto único, cuando se purificó por cromatografía en capa fina (Tabla 3). De acuerdo con los reportes en la literatura, las betacianinas de jiotilla estarían más asociadas a la filocactina y a 2'-Apiosyl-filocatina, que se han encontrado en flores y en frutas de cactáceas (Piattelli e Imperato, 1969).

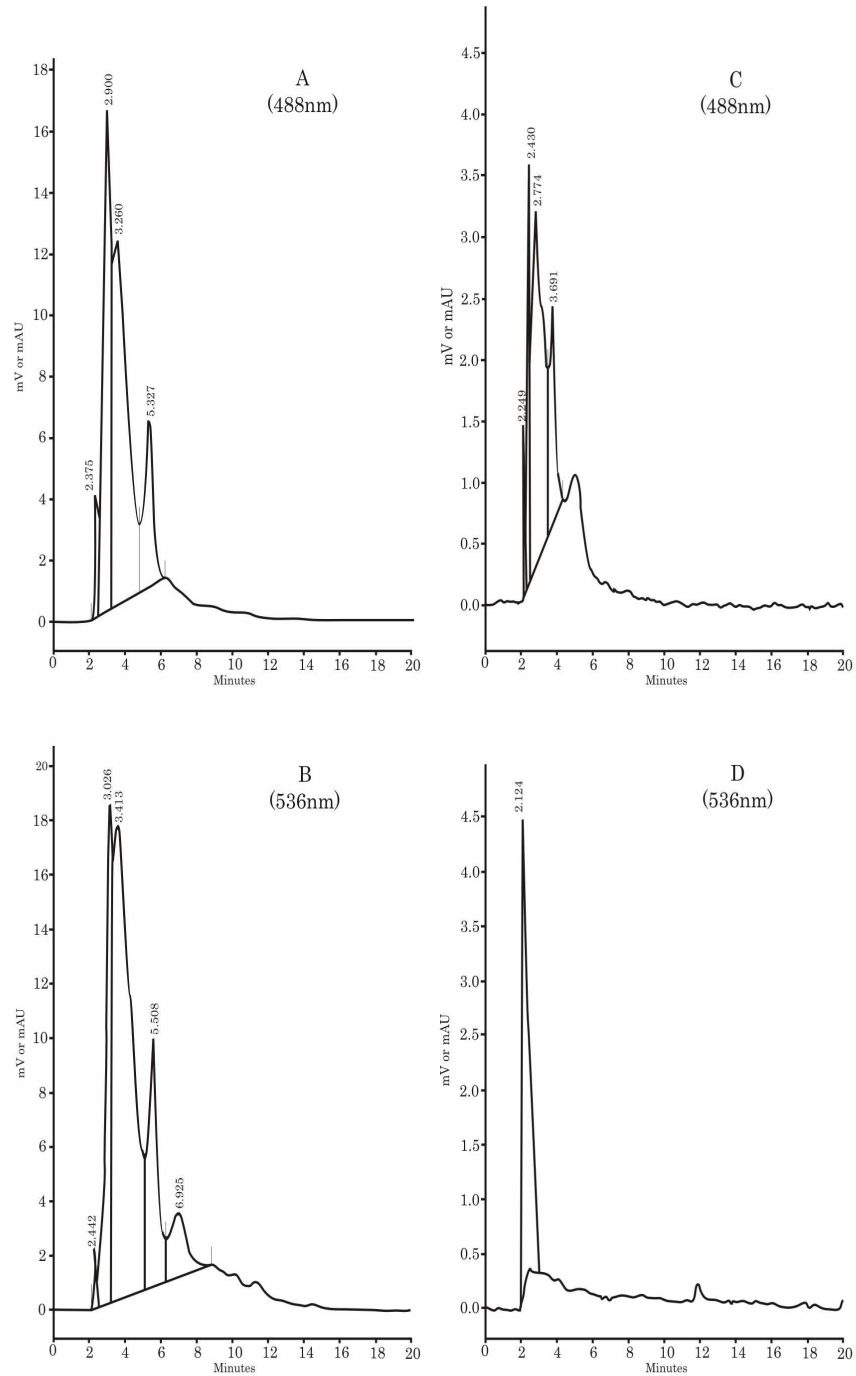


Fig. 21. Cromatografía en fase reversa (HPLC) de pigmentos de jiotilla (*Escrotria chiotilla*). A) betaxantina en jugo, B) betacianina en jugo, C) betaxantina purificada y D) betacianina purificada

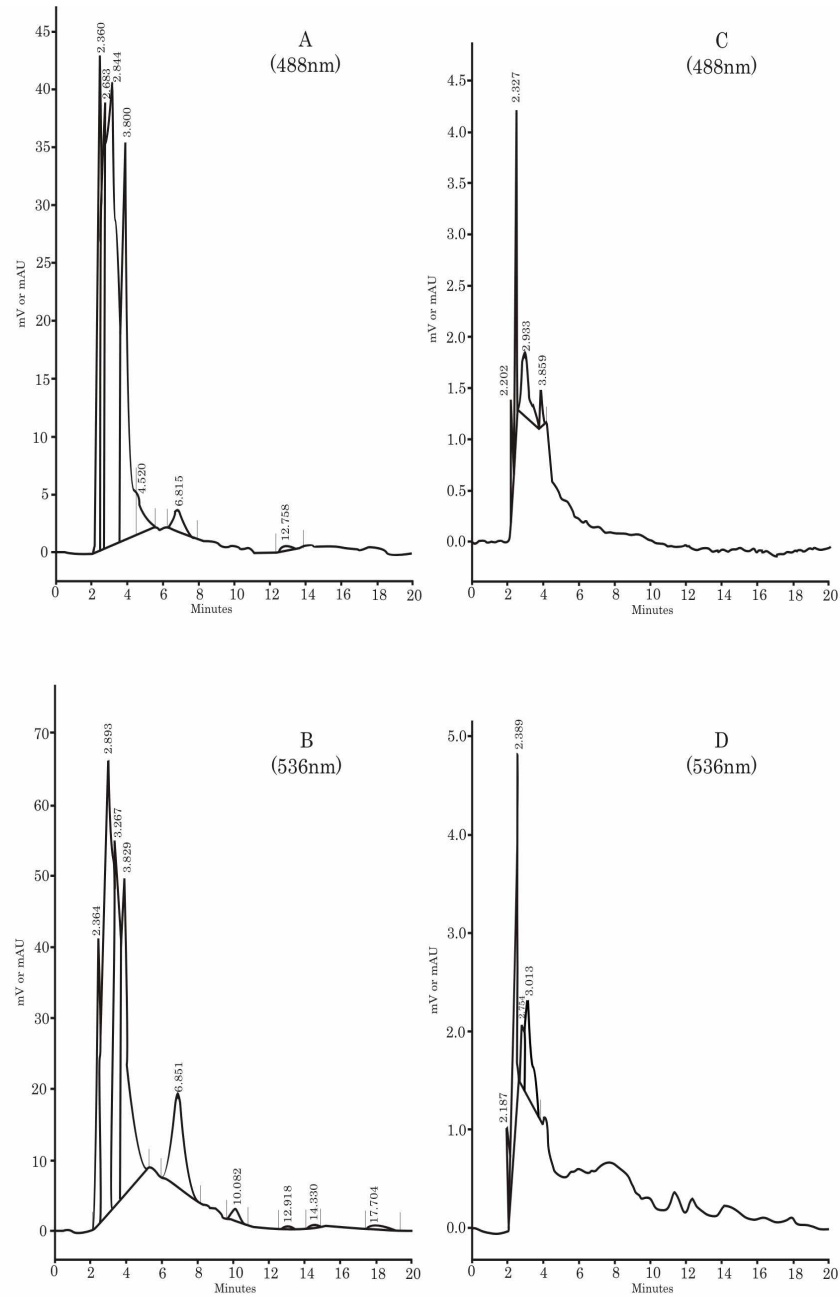


Fig. 22. Cromatografía en fase reversa (HPLC) de pigmentos de betabel (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*). A) betaxantina en jugo, B) betacianina en jugo, C) betaxantina purificada y D) betacianina purificada.

Tabla 3. Tiempos de retención (tr) del análisis en cromatografía (HPLC) en fase reversa del jugo y fracciones purificadas por TLC de betacianina y betaxantina de betabel y jiotilla

	Betabel (tr min)	Jiotilla (tr min)
Jugo 488 nm	2.36; 2.69; 2.84; 3.80; 4.52; 6.81	2.37; 2.90; 3.26; 5.32
Jugo 536 nm	2.36; 2.89; 3.26; 3.89; 6.85; 10.08	2.44; 3.02; 3.41; 5.50; 6.92
Betaxantina	2.20; 2.33; 2.93; 3.86	2.25; 2.43; 2.77; 3.70
Betacianina	2.19; 2.39; 2.75; 3.01	2.12

6.7 Cuantificación de betacianinas y betaxantinas

En el jugo natural de jiotilla se obtuvieron 89.4 ± 6.5 mg de betacianinas/kg pulpa y 119.2 ± 3.1 mg de betaxantina/kg pulpa, y en el jugo ajustado 85.6 ± 1.4 mg de betacianinas/kg pulpa y 118.4 ± 2.7 mg de betaxantinas/kg pulpa. Es decir, que al efectuar el ajuste de pH del jugo, los pigmentos mostraron una recuperación del 95 % de pigmentos rojos y 99 % para pigmentos amarillos (Tabla 4), lo cual indicó que durante este proceso no se afectó el contenido de pigmentos.

Con respecto al betabel, en el jugo natural se obtuvieron 452.4 ± 5.9 mg de betacianinas/kg pulpa y 285.2 ± 3.1 mg de betaxantinas/kg pulpa. Se tienen reportes que indican que la distribución de betalainas en la raíz del betabel es mayor en las regiones epidérmicas que en las centrales; del mismo modo, al cuantificar los pigmentos en distintas variedades se han encontrado diferencias notorias (Sapers y Hornstein, 1979; Pimentel 1984). Aún con estas variaciones, el betabel por su alto contenido de betalainas, es actualmente la principal fuente de obtención de estos pigmentos.

Tabla 4. Análisis cuantitativo de pigmentos del jugo de jiotilla y betabel

Características del jugo	Pigmentos del extracto crudo		Pigmentos del extracto seco	
	Betacianinas ng/kg pulpa	Betaxantinas ng/kg pulpa	Betacianinas mg/ g polvo	Betaxantinas mg/ g polvo
Jugos de Jiotilla				
Jugo natural pH 4.0	89.4 ± 6.5	119.2 ± 3.1		
Jugo ajustado a pH 5.8	85.6 ± 1.4	118.4 ± 2.7		
Jugo secado por liofilización			2.2 ± 0.05	3.3 ± 0.1
Jugos de Betabel				
Jugo natural	452.4 ± 5.9	285.2 ± 0.6		
Jugo liofilizado			4.8 ± 0.6	3.9 ± 0.15

Al comparar los valores obtenidos en la cuantificación de pigmentos de jiotilla y de betabel se observó que los pigmentos rojos de la jiotilla representaron solamente el 20% de la cantidad presente en betabel, mientras que los pigmentos amarillos representaron el 42%. Estos valores podrían ser un factor limitante para la posible explotación de pigmentos a partir de jiotilla. Cabe mencionar que el bajo rendimiento obtenido en la jiotilla, pudiera estar condicionado por el método de extracción utilizado en este estudio, por lo que convendría evaluar otros métodos de extracción.

En el jugo liofilizado de jiotilla se tuvo un rendimiento de 2.2 ± 0.05 mg betacianinas/g polvo y 3.3 ± 0.1 mg betaxantinas/g polvo, mientras que en el betabel se tuvieron valores más altos siendo de 4.8 ± 0.6 mg betaxantinas/g polvo y 3.9 ± 0.15 mg betaxantinas/g polvo, lo cual indicó que el betabel sigue teniendo el mayor contenido de betalainas después de la liofilización (Tabla 4).

Con el propósito de saber si la jiotilla pudiera ser viable para la obtención de pigmentos rojos (betacianinas) se comparó con otras fuentes de obtención de betacianinas como el betabel (betanina) y amaranto (amarantina). Los valores reportados en la bibliografía (Tabla 5), para el betabel van desde 1180 a 1410 mg de betacianinas/kg de extracto crudo y en el amaranto entre 460 y 1440 mg de betacianinas/kg de extracto crudo (Cai *et al.*, 1998); como se puede apreciar, ambos productos presentan un alto contenido de betacianinas. En el presente estudio, la jiotilla, dio un rendimiento de 89 mg betacianinas/kg de pulpa el cual comparado con los valores reportados representó el 6.8 % del total de pigmentos rojos en betabel y el 8% del total de pigmentos en amaranto.

Tabla 5. Comparación del contenido de betacianinas de diversos frutos

Especie/variedad	Parte de la planta	Pigmentos de extracto crudo	Pigmentos de extracto seco
		Betacianinas (mg/ kg)	Betacianinas (mg/g)
Amarantus.caudatus ^a Sheng07	Flor	1440 ± 5.4	28
A.tricolor ^a Tr010	Hojas	1430 ± 4.5	33
A. cruentus ^a Cr 015	Flor	1340 ± 5.6	29
A. hybridus ^a Sheng 12	Flor	820 ± 3.8	17
A. lividus ^a Lv 001	Semilla	460 ± 3.5	19

Betabel (Cardenal) ^b	Raíz	1410	S/referencia
Betabel (Detroit) ^b	Raíz	1330	S/referencia
Betabel (Ruby Queen) ^b	Raíz	1180	S/referencia
Jiotilla ^c a pH 4.0	Pulpa	89.4 ± 6.5	2.2 ± 0.05
Jiotilla ^c a pH 5.8	Pulpa	85.6 ± 1.4	3.3 ± 0.1

a. Cai et al. (1998)

b. Lopez (1985)

c. Resultados del presente trabajo.

Cabe mencionar, que aunque el porcentaje es bajo, debe tomarse en cuenta el poder tintóreo y la estabilidad que pudieran presentar los pigmentos de la jiotilla (estables entre pH 4 a 7). Asimismo debe tomarse en cuenta que los valores reportados en la bibliografía fueron obtenidos por diferentes métodos de extracción, por lo que estos resultados pueden tener variaciones. El valor que obtuvimos en la jiotilla quizá pudiera ser incrementado optimizando la técnica de extracción del jugo, ya que la viscosidad que presentó el jugo de jiotilla afectó el rendimiento del mismo, por lo que sería conveniente controlar este factor, quizá utilizando algún tipo de enzima. Asimismo, el rendimiento de pigmentos rojos y amarillos de la jiotilla pudiera ser incrementado probando otros métodos de extracción en donde se pudieran utilizar disolventes tales como metanol, etanol, agua, acetona, isopropanol, butanol (Villegas *et al.*, 1983), aunque se han obtenido buenos resultados utilizando mezclas de metanol-agua al 5 % (Rivera *et al.*, 1993).

Por otra parte, cabe destacar que se tienen pocos datos a cerca del contenido de pigmentos rojos en otras cactáceas. Para la pitaya (*Stenocereus thurberi*) se encontró un contenido de 125 mg betacianinas/kg pulpa y 233 mg betaxantinas/kg de pulpa (Muy *et al.*, 1998), que comparados con los resultados obtenidos en este estudio para la jiotilla son 28 y 48 % más altos, respectivamente.

PERSPECTIVAS

Los resultados de la presente tesis mostraron que el pigmento rojo del fruto de jiotilla pertenece a la familia química de las betalaínas, en el que el componente principal fueron los pigmentos amarillos y no los rojos como se había esperado. De tal manera que se requiere continuar con estudios de caracterización química para la plena identificación de los compuestos componentes de las betacianinas y betaxantinas presentes en el pigmento rojo, por métodos de espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc.

Es necesario obtener los compuestos purificados para la completa identificación química, obtención de estándares que permitan su cuantificación por diversos métodos. Asimismo, son necesarios estudios de estabilidad de los compuestos a diferentes agentes como oxígeno, luz, presencia de metales, pH, etc. También será necesaria la evaluación del pigmento amarillo en su incorporación en formulaciones de diferentes alimentos, así como evaluar su capacidad antioxidante.

El desarrollo de una tecnología sencilla y accesible para la obtención de pigmentos a partir de jiotilla, podrían contribuir al desarrollo económico de la región de la Mixteca Baja Oaxaqueña

7. CONCLUSIONES

1. El secado del jugo de jiotilla por liofilización se prefirió sobre el de rotoevaporación debido a que la rotoevaporación cambió el color original del producto de rojo a casi anaranjado. En el jugo de jiotilla secado por liofilización se observaron los máximos de absorbancia a los mismos valores de 536 nm para pigmento rojo y 488 nm para pigmento amarillo.
2. El barrido del jugo de jiotilla presentó valores de máxima absorbancia a 536 y 488 nm que corresponden a betacianinas (pigmento rojo) y betaxantinas (pigmento amarillo), respectivamente.
3. La separación de los pigmentos del jugo de jiotilla se logró por la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), utilizando como soporte celulosa microcristalina y un sistema polar de disolventes compuesto por 2-propanol-etanol- agua- ácido acético (20:35:40:5).
4. Los espectros de absorción de los pigmentos separados por TLC fueron semejantes a los del jugo natural y jugo ajustado a pH 5.8, es decir betacianinas a 536 nm y betaxantinas a 482 nm.
5. Con el método de extracción utilizado en este trabajo, se encontró que el extracto rojo del jugo de jiotilla está formado por el 40 % de pigmentos

rojos (betacianinas) y 60 % de pigmentos amarillos (betaxantinas).

La jiotilla es por lo tanto una buena fuente de pigmentos amarillos.

6. El rendimiento obtenido de pigmentos del jugo de jiotilla fue de 89 mg betacianinas/kg pulpa y 119.2 mg betaxantinas/kg pulpa siendo valores bajos si se comparan con los obtenidos en el betabel.

7. En la jiotilla, las proteínas asociadas a betacianinas y betaxantinas parecen ser de naturaleza química distinta.

8. La composición de la fracción amarilla (betaxantinas) de jiotilla estuvo formada al menos por cuatro diferentes compuestos de diferente polaridad. Mientras que para las betacianinas se observó un compuesto único fuertemente polar cuando se purificó por cromatografía en capa fina y se analizó por HPLC

8 BIBLIOGRAFÍA

Anderson E.F. 2001. The cactus family. The Timber Press. New York.

Association of Official Analytical Chemist. 2000. Official Methods of Analysis. 14 Edition. A.O.A.C. Herrick K. Editor. Washington, D.C. Volume I, Chapter 3.

Attoe L.E. y Von Elbe J.H. 1985. Oxygen involvement in betanine degradation: Effect of antioxidants. Journal of Food Science. 50: 106-110.

Baublis A., Spomer A., Berber-Jimenez M. D. 1994. Anthocyanin pigments: Comparison of extract stability. Journal of Food Science. 59 (6): 1219-1221.

Bilyk A. 1979. Extractive fractionation of betalaines. Journal of Food Science. 44 (4): 1249-1251.

Bilyk A. 1981. Thin-layer chromatographic separation of beet pigments. Journal of Food Science. 46 (1): 298-299.

Bilyk A., Myron A., Kolodi A., Sapers M. G. 1981. Stabilization of Red Beet Pigments with isoascorbic acid. Journal of Food Science. 16: 1616-1617.

Bravo-Hollis H. y Scheinvar L. 1995. El interesante mundo de las cactáceas.

Segunda Edición. Fondo de Cultura Económica. México.

Buchi G., Filiri H., Shapiro R. 1978. Synthesis of betalains. Journal Organic

Chemistry. 43 (25): 4765- 4769.

Cai Y., Sun M., Wu H., Huang R., Corke H. 1998. Characterization and

quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46 (6): 2074-2070.

Calvo C. 1999. Uso de los colorantes en el campo de la alimentación.

Alimentación, Equipos y Tecnología. Rev. 3: 79-88.

Cohen E. y Saguy, I. 1983. Effect of water activity and moisture content on the

stability of Beet powder pigments. Journal of Food Science. 48: 703-707.

Derache R. 1990. Toxicología y Seguridad de Alimentos. Primera edición.

Editorial Acribia. Zaragoza, España. p.p. 420.

Diario Oficial de la Federación, 1995. Gobierno Federal. México.

FDA 1980. FD&C Red # 2, Denial of petition for permanent listing, Final decisión.

Food and Drug Administration. Federal Register. January 25, p 6252 (citado en Ramos, 1983).

Fennema O.R. 1995. Química de los alimentos. Segunda edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Capítulo 10. pp. 773-849.

Francis F.J. 1986. Handbook of Food Colorant Patents. Food and Nutrition Press Inc. Westport, Connecticut EUA. p 181.

Francis F.J. 1999. Colorants: Betalains. Practical Guides for the Food Industry. Eagan Press Handbook Series. American Association of Color Chemist, St. Paul, Minnesota. pp. 61-65.

Franks F. 1988. Characterization of proteins. Chapter 11: Analytical liquid chromatography. The Humana Press Inc. USA. pp. 285-296.

García B. F., Reynoso R. C., González de Mejía E. 1998. Estabilidad de las betalaínas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Journal of Food Science and Technology International. 4: 115-120.

Girod P.A. y Zryd J.P. 1991. Biogenesis of betalains: purification and partial characterization of DOPA 4,5-dioxygenase from Amanita. Phytochemistry. 30 (1): 169-174.

Giusti M. y Wrolstad R.E. 1996. Characterization of Red Radish Anthocyanins. *Journal of Food Science*. 61 (2): 322-326.

Goodwin T.W. 1976. *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Academic Press. New York. Volume I. (citado en Ramos, 1983, Facultad de Química, UNAM).

Hayward P. M. Colorantes. 1992. *Tecnología de Alimentos*. 27 (4, 5 y 6): 34-43.

Hendry G.A. y Houghton J. D. 1996. *Natural Food Colorants*. Eds. Blackie Publishers. Glasgow, Scotland. pp 1-141.

Herman K. y Dreiding A. S. 1975. *Helv. Chim. Acta* 58: 1805.

Heuer S., Richter S., Metzger J. W., Wray V., Nimtz M., Strack D. 1994. Betacyanins from bracts of *Bougainvillea glabra*. *Phytochemistry*. 37: 761767.

Huang S. A., von Elbe J. H. 1987. Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science*. 52: 1689-1693.

[http:// www.salud.gob.mx/nom/038ssa13.html](http://www.salud.gob.mx/nom/038ssa13.html). Norma Oficial Mexicana. NOM-001-SSA1. Bienes y Servicios. Colorantes orgánicos sintéticos. Especificaciones sanitarias generales. Publicado en el Diario Oficial el 15 de Agosto de 1994.

[http:// www.economia_noms.gob.mx/nom/119ssa13.html](http://www.economia.noms.gob.mx/nom/119ssa13.html). Norma Oficial Mexicana.

NOM-001-SSA1. Bienes y Servicios. Colorantes organicos naturales.

Especificaciones sanitarias. Publicado en el Diario Oficial el 20 de Octubre de 1995.

Kanner J., Harel S., Granit R. 1996. Pharmaceutical compositions containing antioxidants betalains and a method for their preparation. Patent 119872. Israel.

Kanner J., Harel S., Granit R. 2001. Betalains: A new class of Dietary Cationized Antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49: 5178-5185.

Kobayashi N., Schmidt J., Nimtz M., Wray V., Schliemann W. 2000. Betalains from Christmas cactus. *Phytochemistry*. 54: 419-426.

Lindner E. 1991. *Toxicología de Alimentos*. Primera edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. p.p. 138.

López B.G. 1985. Obtención de colorantes rojos de origen natural a partir del betabel, estudio agroquímico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.

López R., Díaz P.J., Martínez F.G. 2000. Vegetative propagation of three species

- of cacti: pitaya (*Stenocereus griseus*), tunillo (*Stenocereus stellatus*) and jiotilla (*Escontria chiotilla*). *Agrociencia*. 4 (3): 363-367.
- Marmion D. 1984. Handbook of U.S. colorants for foods, drugs and cosmetics. 2a. edition. New York. John Willey and Sons. p.p. 322.
- Mabry T. J., 2001. Selected topics from forty years of natural products research: Betalains to Flavonoids, antiviral proteins, and neurotoxic nonprotein aminoacid. *Journal of Natural Products*. 64: 1596-1604.
- Muy R. D, Baez S. R, González León A., Troncoso R.R., Pacheco A. R. 1998. Comportamiento fisiológico y caracterización de pigmentos del fruto del pitayo (*Stenocereus thurberi*) durante su desarrollo. *Revista de Tecnología Alimentaria*. México. 26 (6): 6-12.
- Nieto P. C. 1980. La jiotilla.. Recursos bióticos potenciales del país. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Comunicado No. 41.
- Nilsson T. 1970. Studies into the pigments in beet-root. *Lantbrukshogskolans Annaker*. 36: 179- 219.
- Noonan J. E. y Meggos H. 1980. Synthetic food colours, en *CRC Handbook of*

Food Additives, 2^a. Edition . Editorial Furia T. E. Editores. C. R. C. Press.
Vol II: 339-383.

Pasch, J. H. y Von Elbe J. H. 1979. Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants or sequestrants. Journal of Food Science. 44: 72-75.

Piatelli M. y Minalle L. 1964. Pigments of *Centrospermae* I. Betacyanins from *Phyllocactus hybridus* and *Opuntia ficus-indica*. Phytochemistry. 3: 307-311.

Piatelli M. y Minalle L. 1964. Pigments of *Centrospermae*-II Distribution of betacyanins. Phytochemistry. 3:547-557.

Piatelli M. 1965. Ann. Chim. 54: 955-962.

Piatelli M. e Imperato F. 1969. Betacyanins of the family *Cactaceae*. Phytochemistry. 8: 1503-1507.

Pimentel G.S. 1984. Caracterización del pigmento rojo de la jiotilla *Escontria chiotilla* . Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México

- Ramos B. R. 1983. Utilización de pigmentos rojos de *Escontria chiotilla* como colorante en alimentos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- Reynoso R., García F. A., Morales D. Y, González de Mejía R. 1997. Stability of betalain pigments from a cactacea fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 2884-2889.
- Rodríguez P. F. 1985. Las betalainas como colorantes naturales en alimentos. Revista de la Industria Alimentaria. Vol. 7, 4 : 9-13.
- Rodríguez M. M. 2002. El color en los alimentos. Diario de la Seguridad Alimentaria, En:
http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2002/10/09/3639_print.php
- Saguy I. 1979. Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin I):Influence of pH and temperature. Journal of Food Science. 44: 1554- 1555.
- Sapers G. M. y Hornstein J.F. 1979. Varietal differences in colorant properties and stability of Red Beet pigments. Journal of Food Science. 44 (4): 1245-1248.
- Schiliemann W., Joy I.V., R.W., Komamine I., Metzger J.W., Nimitz M., Wray V., Strack D. 1996. Betacuanins from plants and cell cultures of *Phytolacca Americana*. Phytochemistry. 42: 1039-1046

- Schliemann W., Cai Y., Degenkolb T., Schmidt J., Corke H. 2001. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry* . 58 (1): 159-165.
- Schwartz S. J. y Von Elbe J.H. 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 28, 540-543.
- Strack D., Vogt T., Schliemann W. 2003. Recent advances in betalain research :review. *Phytochemistry*. 62 (3): 247-269.
- Stuppner H. y Egger R. 1996. Application of capillary zone electrophoresis to the analysis of betalains from *Beta vulgaris* . *Journal of Chromatography A*. 735 (1-2): 409-413.
- Tafoya A. y García H. A. 1993. Colorantes, En: *Biotecnología Alimentaria*. 1ª edición. Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores. México D.F. Capitulo 15: 486-492.
- Torres O. J. 1997. De la vista nace. *Tecnología de alimentos, Industria y Mercado*. México. 32 (2): 26-34.
- Viades J. 1977. Colorantes que se consideran nocivos a la salud humana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México (citado en Pimentel.1984

- Villegas L. 1979. Estudio de los colorantes del betabel (*Beta vulgaris*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.
- Villegas R. L., García H. F., Caballero A. Y., Santos de Flores E. 1983. Estudio de los colorantes del betabel (*Beta vulgaris* L.). Revista de la Sociedad Química de México. 27 (4) jul-ag.: 175-183.
- Vincent K.R. y Scholz R.G. 1978. Separation and quantification of red beet betacyanins and betaxanthins by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26 (4), 812-816.
- Wilcox M. E. 1965. Helv. Chim. Acta. 48 (1) 252-258
- Wiley R.C., Lee Y., Saladini J.J. Wyss C.R., Topalian H.H. 1979. Efficiency studies of a continuous diffusion apparatus for the recovery of betalaines from the red table beet. Journal of Food Science. 44 (1): 208-212.
- Wills R.H.H., Lee T.H., Graham D., Mc Glasson M.B., Hall E.G. 1981. Postharvest and introduction to the physiology and handling of fruits and vegetables. 1a. edition. Editorial AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut USA.
- p 11

Wybraniec S., Platzner I., Geresh S., Gottlieb H.E., Haimberg M., Mogilnitzki M.,
Mizrahi Y. 2001. Betacyanins from vine cactus *Hylocereus polyrhi*
Phytochemistry. 58: 1209-1212.

A N E X O S

ANEXO 1. METODOS DE SECADO

El secado o desecación, es uno de los procesos más antiguos de preservación de alimentos. En los alimentos deshidratados, debido a la mínima actividad de agua, los microorganismos no pueden proliferar y quedan detenidas la mayoría de las reacciones químicas y enzimáticas. Los métodos modernos de secado buscan otros fines que la simple preservación: en los alimentos, la reducción de peso y algunas veces de volumen, constituye una importante ventaja para el transporte y el almacenamiento; la comodidad de empleo es también una característica muy buscada. No se debe confundir el secado con la pérdida de agua, que incluso muchas veces no es deseable. Generalmente se considera como deshidratación (un ejemplo es la liofilización) un procedimiento que permite eliminar por vaporización o sublimación la mayor parte del agua de un alimento líquido o sólido. Por el contrario, la concentración (por ejemplo la evaporación, congelación, filtración a través de una membrana, concentración osmótica, centrifugación, prensado mecánico, extracción de agua por disolventes) solo retira cierta proporción de esa agua y generalmente no resulta suficiente para asegurar, por si sola, la preservación del alimento. La concentración se emplea especialmente para los alimentos líquidos y constituye, a veces, una fase previa a la deshidratación. Existen varios métodos básicos de secado, sin embargo el método escogido depende del tipo de alimento que se va a secar, el nivel de calidad que hay que alcanzar y el costo que se puede justificar.

Liofilización (o criodesecación: en inglés “freeze-drying”)

En años recientes la liofilización ha alcanzado un desarrollo muy notable. Pueden emplearse para deshidratar alimentos líquidos sensibles y caros, como el café y los

jugos, pero comúnmente se emplea para secar alimentos sólidos costosos como fresas, camarones, champiñones. La liofilización consiste en una transformación directa (sublimación) del hielo de un alimento congelado en vapor de agua, sin pasar por el estado de agua líquida, bajo ciertas condiciones de baja presión de vapor, es decir, que el agua se evapora del hielo sin que éste se derrita. El agua congelada se sublima si la temperatura está a 0 °C o más abajo, y el agua congelada se coloca en una cámara al vacío con una presión de 4.7 mm o menos. Bajo estas condiciones, el agua permanece congelada y la rapidez con que las moléculas de agua salen del bloque de hielo es mayor que la de las moléculas del ambiente que vuelven a incorporarse al bloque congelado. Dentro de la cámara al vacío se aplica calor al alimento congelado a fin de acelerar la sublimación, y si se mantiene el vacío suficientemente alto, y se controla el calor de manera que su intensidad sea un poco menor que la que se requiere para derretir el hielo, se alcanzará la velocidad máxima de sublimación del vapor de agua. La sublimación tiene lugar desde la superficie del hielo hacia el centro del alimento, es decir, que el alimento se deshidrata desde la superficie hacia el interior. Finalmente, el último resto de hielo se sublima y la humedad del alimento queda reducida a menos del 5%. Ya que el alimento congelado permanece rígido durante la sublimación, las moléculas de agua que se escapan dejan huecos, lo cual da lugar a una estructura seca, porosa y esponjosa. Por eso los alimentos liofilizados se reconstituyen rápidamente pero tienen que ser protegidos mediante un envase adecuado contra la absorción de humedad atmosférica y el oxígeno.

Rotoevaporación

La evaporación es utilizada principalmente en la industria alimentaria a fin de concentrar alimentos por la eliminación de agua. También se emplea para recuperar volátiles deseables en los alimentos y para eliminar los indeseables. El procedimiento más sencillo de evaporación consiste en hervir el alimento para eliminar el agua y así concentrarla, pero esto requiere de calor durante un tiempo bastante largo, y en algunos casos causaría daños al alimento. Todos los líquidos hierven a temperaturas más bajas cuando se reduce la presión y esta es la clase del sistema moderno de evaporación. Un equipo sencillo puede ser adaptado utilizando una cámara cerrada, la cual es calentada a determinada temperatura, y conectada a una bomba de vacío. Cualquiera que sea el diseño, uno de los objetivos principales de los evaporadores de vacío es la eliminación del agua a una temperatura relativamente baja a fin de que el alimento no se dañe por el calor. Generalmente, la evaporación deja el alimento dos o tres veces más concentrado que en su estado original.

Referencias bibliográficas:

Badui D.S. 1981. Química de los Alimentos. Editorial Alhambra. Madrid España.

1ª edición. Cap.3 p. 61-67.

Cheftel J.C, Cheftel H., Besancon P. 1979. Introducción a la bioquímica y

tecnología de los Alimentos Vol II. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Cap. 7 p. 202.

Potter N.N. 1980. La ciencia de los alimentos. Editorial Edutex S.A. 1a. Edición.

México. Cap. 10 p 261-265.

ANEXO 2. CROMATOGRAFIA

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diversos de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas o un líquido. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativamente y/o cuantitativamente.

Cromatografía en capa fina. (Thin Layer Chromatography)

Se puede considerar como una optimización de la cromatografía en papel. Es una cromatografía de reparto líquido-líquido en la que se hace avanzar la fase móvil a través de la fase estacionaria por capilaridad, a veces ayudada por la gravedad, o por la aplicación de un potencial eléctrico. Las separaciones en capa fina se realizan en placas de vidrio o plástico que se recubren con una capa delgada y adherente de partículas finamente divididas, esta capa constituye la fase estacionaria. El soporte de la fase estacionaria puede ser gel de sílice, celulosa, poliaminas, gel de óxido de aluminio, gel de silicato.. El agua retenida en la capa fina actúa como fase

estacionaria y diversas mezclas de disolventes orgánicos actúan como fase móvil. La cromatografía en capa fina es más rápida y más sensible que la cromatografía en papel. Se aplica a la separación de azúcares, aminoácidos, repetidos, lípidos, nucleótidos y en general a sustancias de bajo peso molecular. La aplicación de la muestra es tal vez el aspecto más crítico de la cromatografía en capa fina. Generalmente se aplica la muestra como una mancha a 1 o 2 cm del extremo de la placa. La aplicación de la muestra y el desarrollo cromatográfico es similar a la cromatografía en papel, con la diferencia de que la TLC siempre se desarrolla en sentido ascendente y también puede realizarse en dos dimensiones combinando dos sistemas diferentes de disolventes. Las sustancias se localizan en la placa, una vez desarrollada, mediante su color, absorción ultravioleta o el revelado específico con un reactivo que produzca un compuesto coloreado. Las sustancias una vez separadas en la placa, pueden eluirse raspando el soporte y extrayéndolas con los disolventes adecuados. Para la utilización de la TLC con fines preparativos suele ser deseable aplicar un volumen de muestra mayor (aprox. 200 μ l) al que se utiliza en aplicaciones analíticas. (1-10 μ l). En este caso es necesario trabajar con capas más gruesas, así como aplicar la muestra en bandas en lugar de puntos o manchas.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de muestras no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, como aminoácidos, proteínas, hidrocarburos,

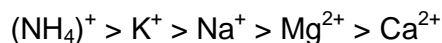
carbohidratos, plaguicidas, fármacos, etc. Lo que caracteriza a este tipo de cromatografía, es su elevada eficiencia debido a las elevadas presiones que se manejan, y la fase móvil es un líquido. En HPLC una muestra líquida o una muestra sólida disuelta en un disolvente adecuado se hacen pasar por una columna cromatográfica junto con una fase móvil líquida. La separación se efectúa debido a las interacciones de las fases soluble y estacionaria, tales como la adsorción líquido-sólido, el reparto líquido-líquido, el intercambio de iones u la exclusión por tamaño, y por las interacciones entre las fases soluto y móvil. Sin embargo, en todos los casos, los instrumentos básicos son esencialmente los mismos. HPLC consta de una columna analítica responsable de la separación. Las columnas de HPLC más utilizadas se fabrican con acero inoxidable y tienen diámetros internos de 2.1 a 4.6 mm y las longitudes oscilan entre 30 y 300 mm aproximadamente. Estas columnas se empaquetan con partículas de sílice porosa de forma irregular o esférica. En cromatografía líquido-líquido, la fase estacionaria es una película líquida que recubre el material empaquetado. Cuando la fase estacionaria es polar, la fase móvil es un disolvente no polar y recibe el nombre de **cromatografía de fase normal**. Por el contrario, en la **cromatografía de fase reversa**, que es la forma más habitual de HPLC, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. El orden de elusión de los solutos en HPLC depende de la polaridad. En una separación de fase normal, el soluto menos polar pasa proporcionalmente menos tiempo en la fase estacionaria polar y es el primero que eluye de la columna. Los tiempos de retención se controlan seleccionando la fase móvil, de forma que las fases móviles menos polares producen tiempos de retenciones mayores. En la separación de fase reversa, el orden de elusión es el inverso, y el soluto que primero sale, es el más polar. Si se

aumenta la polaridad de la fase móvil, se prolongará el tiempo de retención, mientras que las fases móviles con polaridades menores acortan los tiempos de retención. Cuando en una separación se usa una sola fase móvil de composición fija se dice que la elusión es isocrática. Sin embargo, es difícil encontrar una composición de fase móvil única que sea adecuada para todos los solutos, por lo que puede utilizarse un cambio en la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo. En una separación de fase reversa, la composición inicial de la fase móvil es relativamente polar, pero su polaridad se va haciendo cada vez menor a medida que la separación progresa, estas separaciones se llaman elusiones en gradiente, y en este caso se requiere de varios depósitos de disolvente. Por ello, el control de la polaridad de la fase móvil desempeña un papel importante en el proceso de la separación cromatográfica. Para las separaciones cromatográficas en HPLC se han desarrollado varios detectores. Los más utilizados son los detectores espectroscópicos y electroquímicos. Los primeros se basan en medidas espectroscópicas tales como la absorción UV/vis y la fluorescencia. En cuanto al segundo tipo, son los que utilizan medidas electroquímicas tales como amperometría, voltamperometría y conductividad.

Interacción hidrofóbica (HIC)

La interacción hidrofóbica no es una interacción en si misma, sino el resultado de la asociación entre regiones apolares promovida por entornos acuosos. Esta agregación hidrofóbica esta favorecida termodinámicamente por el aumento de entropía. La solvatación de las superficies hidrofóbicas requiere que las moléculas de agua implicadas adopten un orden estricto. Al interaccionar las regiones

hidrofóbicas entre si, su superficie expuesta disminuye, y con ello el número de moléculas de agua ordenadas; en suma, disminuye el orden global. En una columna de interacción hidrofóbica las muestras que se apliquen han de contener iones en suficiente cantidad para favorecer la retención de los solutos. Aunque, no todos los iones favorecen por igual las interacciones hidrofóbicas, incluso, determinados iones las desfavorecen. A continuación se listan diferentes aniones y cationes en orden decreciente de su capacidad favorecedora de las interacciones hidrofóbicas:



En esta serie, los iones a la izquierda (anticaotrópicos) son los que mayor orden inducen en la estructura del agua, mientras que los de la derecha (caotrópicos) provocan desorden. Cuanto menos caotrópicos sea un ion mas favorece las interacciones hidrofóbicas, como forma de disminuir el orden molecular global de la disolución. En el caso de las proteínas, su hidrofobicidad vendrá determinada por el número de aminoácidos apolares que tengan. Para una proteína plegada en su conformación nativa, la mayor parte de estos aminoácidos se encontrarán interaccionando hidrofóticamente en el interior del glóbulo proteico. Sin embargo, siempre pueden quedar aminoácidos hidrofóbicos en la superficie, expuestos al medio acuoso. La hidrofobicidad de estos aminoácidos expuestos es la que da la interacción en cromatografía hidrofóbica. Es decir, se trata de una cromatografía no desnaturalizante, en la que se preservan las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas. La cromatografía de interacción hidrofóbica es realizada usando una columna fase reversa idéntica a las usadas en separaciones en fase reversa. El

eluyente consiste de soluciones acuosas salina, la retención en HIC es inversamente proporcional a la concentración de sal, y la naturaleza de la sal usada puede cambiar la selectividad de la separación. Además, el pH de la fase móvil es generalmente en niveles fisiológicos.

Referencias bibliográficas:

Franks F. 1988. Characterization of proteins. Chapter 11: Analytical liquid chromatography. The Humana Press Inc. USA. pp. 285-296.

González de Buitrago J.M., Fernández J.B., Lizarde I.M., Fresno M.A., Rodríguez

G.R. 1979. Conceptos, Técnicas y Problemas de Bioquímica Básica. Editorial Alhambra. Madrid. España. Cap. 4 p. 61.

Harvey D. 2002. Química Analítica Moderna. Editorial McGraw Hill. España. Cap. 12 p. 402.

Skoog D. , Holler J.F., Nieman T.A. 2000. Principios de Análisis Instrumental. Editorial McGraw Hill. 1 edición. España. Cap. 28 p. 786, 824.

ANEXO 3. CUANTIFICACION DE BETACIANINAS Y BETAXANTINAS

Debido a que la betanina puede tener absorbancia en 476-478 nm (λ_{\max} vulgaxantina-I), aunque esta absorbancia no es constante y puede variar con la concentración, el coeficiente A_{536} / A_{478} debe ser calculado para medir todas las concentraciones. La vulgaxantina I, sin embargo, no absorbe en 538 nm (λ_{\max} para betanina), lo cual significa que la absorción de la mezcla en esta longitud de onda solo depende de la cantidad de betanina. También debe considerarse que cuando se extraen los pigmentos del betabel con agua, las sustancias que permanecen en el extracto, después de centrifugar, aunque no tienen color dan un aumento en la absorción en el rango visual del espectro. Una corrección de estas impurezas es por lo tanto esencial. El cálculo de la absorción de los diferentes pigmentos en el jugo de betabel puede realizarse con la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned}
 x &= a - z \\
 (1) \quad y &= b - z - \frac{x}{A_{536} / A_{478}} \\
 z &= c - \frac{x}{A_{536} / A_{600}}
 \end{aligned}$$

Donde a, b y c son la absorción de los extracto a 538, 478 y 600 nm, x es la absorción de la betanina, y de la vulgaxantina-I y z es la absorción de las impurezas (vulgaxantina-I no absorben a 600 nm).

Después x y y han sido obtenidas del sistema de ecuaciones sobre la concentración de betanina y vulgaxantina-I obtenidas experimentalmente y pueden

ser calculadas como $E^{1\%}_{cm} = 1120$ para betanina y $E^{1\%}_{cm} = 750$ para vulgaxantina-I .

La absorción de la betanina en 476 y 600 nm en relación a la absorbancia máxima en 538 fue determinada después de varias mediciones en diferentes densidades ópticas. El coeficiente A_{536}/A_{478} parece no estar influenciado por la concentración y fue determinado experimentalmente con un valor promedio de $A_{536}/A_{478} = 3.1$ y $A_{536}/A_{600} = 11.5$ los cuales son introducidos en la ecuación (1) y se tiene:

$$x = (a - c) 1.095$$

$$y = b - z - \frac{x}{3.1}$$

$$z = a - x$$

Aplicando estas fórmulas y considerando el valor $E^{1\%}_{cm} = 1120$ para betanina y $E^{1\%}_{cm} = 750$ para vulgaxantina-I, se deducen las fórmulas que son mostradas a continuación:

BETACIANINAS (λ_{max} 538 nm)

$$A = (D.O._{538\text{ nm}} - D.O._{600\text{ nm}}) 1.095$$

$$B = A \times 0.009018$$

$$C \text{ (g/l)} = B \times \text{factor de dilución}$$

$$D \text{ (g)} = C \text{ (g/l)} \times \text{volumen del extracto}$$

$$\frac{\text{g de betacianinas}}{\text{kg de jiotilla}} = \frac{D (\text{g colorante}) \times 1000 (\text{g jiotilla/ kg jiotilla})}{\text{Peso de la muestra (g jiotilla)}}$$

BETAXANTINAS (λ_{max} 478 nm)

$$A = (D.O._{538 \text{ nm}} - D.O._{600 \text{ nm}}) \times 1.095$$

$$Z = D.O._{538 \text{ nm}} - A$$

$$Y = D.O._{478 \text{ nm}} - Z - \frac{A}{3.1}$$

$$T = Y \times 0.01333$$

$$V (\text{g/l}) = T \times \text{factor de dilución}$$

$$U (\text{g}) = V (\text{g/l}) \times \text{volumen del extracto}$$

$$\frac{\text{g de betaxantinas}}{\text{kg jiotilla}} = \frac{U (\text{g colorante}) \times 1000 (\text{g jiotilla/ kg jiotilla})}{\text{Peso de la muestra (g de jiotilla)}}$$

Referencias bibliográficas:

Nilsson T. 1970. Studies into the pigments in beet-root. Lantbrukshogskolans

Annaker. 36: p. 212.

