

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**BIOTRANSFORMACION Y ESTUDIOS DE TOXICIDAD DE
PIGMENTOS BETALAINICOS EXTRAIDOS DEL FRUTO DE
GARAMBULLO (*Myrtillocactus geometrizans*)**

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MARIA TERESA GINER VILCHIS

DÍRIGIDA POR

M. en C. ROSALIA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., MÉXICO

1998

No. Adq. 158862

No. Título _____

Clas. 574.1921

6492b

A DIOS POR PERMITIRME EXISTIR.

A MIS PADRES: JUAN Y TERE, POR EL EJEMPLO DE LUCHA, DE SUPERACIÓN, DE AMOR, POR SU APOYO Y SOBRE TODO, POR DARMER LA VIDA.

A MIS HERMANOS: ESPECIALMENTE JUAN POR ENSEÑARME QUE A LA VIDA HAY QUE DISFRUTARLA Y QUERERLA.

A MI ESPOSO: RICARDO POR LAS SONRISAS, POR EL APOYO, POR LA PACIENCIA, POR LA AMISTAD, POR EL AMOR, POR LA FELICIDAD.

A MIS SUEGROS: SRS. LYDIA Y FERNANDO Y MIS CUÑADOS: FER Y OSCAR POR SU IMPULSO Y SUS MUESTRAS DE CARÍÑO.

AGRADEZCO INFINITAMENTE A:

M. en C. ROSALIA REYNOSO CAMACHO POR SU PACIENCIA Y AYUDA EN TODO MOMENTO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

DRA. ELVIRA GONZÁLEZ DE MEJÍA POR LAS FACILIDADES PRESTADAS EN LOS LABORATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE POSGRADO DE ALIMENTOS.

GABY, GEORGINA, MARY SIERRA, HELEN POR HABER COMPARTIDO UNA NIÑEZ Y ADOLESCENCIA QUE HAN INFLUÍDO EN MI VIDA.

CÉSAR, CHIO, TOÑO, ELSA, EDUARDO Y TODOS MIS COMPAÑEROS CON LOS CUALES COMPARTÍ SUEÑOS Y AVENTURAS VETERINARIAS.

FLOR, LOLITA, LORENA, MINERVA, TERE POR HACER LA CARGA DE LA TESIS MENOS PESADA AYUDÁNDOME FÍSICA Y MORALMENTE.

MIS MAESTROS DE LA CARRERA DE MEDICINA

A LOS PROFESORES DEL COMITÉ EVALUADOR, POR EL VALIOSO TIEMPO EMPLEADO PARA LA CORRECCIÓN DE ESTA TESIS.

TODOS LOS QUE EN ALGUN MOMENTO DE MI VIDA ME HAN ANIMADO PARA SEGUIR ADELANTE CON MIS PROYECTOS E ILUSIONES.

LAS INSTITUCIONES:

ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

FACULTAD DE MEDICINA.

DEPARTAMENTO DE POSGRADO E INVESTIGACION DE ALIMENTOS.

MI ALMA MATER: LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.

A LOS ANIMALES QUE SE SACRIFICARON EN POS DE MI APRENDIZAJE.

INDICE GENERAL

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE CUADROS	ii
I. RESUMEN	iii
II. INTRODUCCION	1
III. REVISION DE LITERATURA	4
A. ZONAS ARIDAS Y SEMIARIDAS DEL PAIS	4
1. Localización	4
2. Vegetación	5
B. GARAMBULLO	6
1. Distribución	6
2. Características Morfológicas	6
3. Características Fisiológicas	6
4. Comportamiento Postcosecha	8
C. COLORANTES	8
1. Clasificación de colorantes	10
a. Colorantes sintéticos	10
b. Colorantes idénticos al natural	10
c. Colorantes naturales	11
D. BETALAINAS	11
1. Estructura química	11
2. Clasificación	12
3. Estabilidad	14
a. Factores físicos	14
b. Factores químicos	15
4. Usos	15
a. Helados	15
b. Yoghurt	16
c. Embutidos	16
E. EFECTOS TOXICOLOGICOS DE LOS COLORANTES SINTETICOS	16
1. Pruebas toxicológicas	16
a. Pruebas agudas	16
b. Pruebas subagudas	17
c. Pruebas subcrónicas	17
d. Pruebas crónicas	17
e. Pruebas teratológicas	17

f. Pruebas reproductivas	17
g. Pruebas mutagénicas	18
h. Pruebas toxicocinéticas	18
2. Estudios toxicológicos de colorantes	18
F. TOXICIDAD DE LAS BETALAINAS	21
IV. HIPOTESIS	23
V. OBJETIVOS	24
A. OBJETIVO GENERAL	24
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
VI. MATERIALES Y METODOS	25
A. MATERIALES	25
B. METODOS	25
1. Extracción del Pigmento	25
2. Pruebas agudas	25
3. Cinética de eliminación	27
4. Estudios de digestibilidad	29
5. Metabolismo hepático	31
6. Efectos cardiovasculares	31
7. Análisis de datos	34
VII. RESULTADOS Y DISCUSION	35
A. EXTRACCION DEL PIGMENTO	35
B. PRUEBAS AGUDAS	39
C. ESTUDIOS DE DIGESTIBILIDAD	48
D. METABOLISMO HEPATICO	52
E. CINETICA DE ELIMINACION	55
F. EFECTOS CARDIOVASCULARES	59
VIII. CONCLUSIONES	62
IX. BIBLIOGRAFIA	64

LISTA DE FIGURAS

No.	Página
1	7
2	13
3	26
4	28
5	30
6	32
7	33
9	38
10	40
11	41
12	43
13	44
14	46
15	47
16	54
17	56
18	57
19	58
20	60

LISTA DE CUADROS

No.		Página
1	Concentración de betalaínas durante el proceso de extracción.	37
2	Degradación gastrointestinal del pigmento de garambullo en Machos	50
3	Degradación gastrointestinal del pigmento de garambullo en Hembras	51

I. RESUMEN

El garambullo es un recurso natural que ha sido pobremente explotado. Su fruto contiene pigmentos tipo betalaínicos, con un 99% de betacianinas. Las betalaínas pertenecen a los cinco aditivos de color de origen natural más ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Por ser compuestos hidrosolubles, al ser consumidos son fácilmente eliminadas por orina, teniendo un tiempo de vida media muy corto en el organismo. Sin embargo, no existen antecedentes sobre los efectos adversos ocasionados por el pigmento de garambullo. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar los efectos toxicológicos y toxicocinéticos del pigmento del fruto de garambullo. El pigmento fué extraído del fruto con una solución acuosa, seguido de una fermentación con *Saccharomyces cereviciae*. El licor fue posteriormente concentrado en un rotaevaporador. Para las pruebas agudas se administraron a ratas Wistar machos y hembras mediante intubación oral, dosis de 0.5, 2.5, 5.0 g de betalaínas/ Kg de peso, con sus respectivos controles a los cuales se les administró el vehículo utilizado (agua). Se siguieron las cinéticas de eliminación del pigmento en orina por HPLC y espectroscopía. Se evaluó diariamente durante quince días el peso corporal y consumo de alimento, al finalizar el tratamiento los animales eran sacrificados para determinar el peso relativo de órganos como: hígado, bazo, riñón, pulmón y corazón. Los estudios metabólicos se llevaron a cabo empleando pruebas de digestibilidad en el tracto gastrointestinal, utilizando contenido estomacal, contenido del intestino delgado y del intestino grueso, así como secciones de dichos órganos, para observar el efecto del pH se prepararon soluciones con pigmento ajustadas al pH de los contenidos antes mencionados. El metabolismo en hígado se evaluó utilizando la técnica de perfusión hepática, incubando las células en suspensión hasta por siete horas. Para evaluar los efectos cardiovasculares se utilizaron ratas anestesiadas a las cuales se les administró por vía oral el pigmento en concentraciones de 0.5, 2.5 y 5 g/Kg, empleando un polígrafo en el cual se registró el ritmo cardíaco por 45 min para cada concentración. El pigmento no causó muerte a ninguna de las dosis administradas, mostrando una ganancia en peso al final del tratamiento hasta de

96 g para los machos control, 89 g para la dosis de 0.5g/Kg, 87 g para la dosis de 2.5g/Kg y 80 g para la dosis de 5.0g/Kg, mientras que la ganancia obtenida para las hembras control fue de 61g/Kg, 78g/Kg para la dosis de 0.5g/Kg, 69g para la dosis 2.5g/Kg y 61g para la de 5.0g/Kg. No se observó diferencia para ambos sexos entre los controles y los animales tratados en cuanto al consumo de alimento ($P < 0.05$). En cuanto al peso relativo de órganos no se observó diferencia significativa entre los animales control y los tratados. El pigmento fue eliminado en orina como betalaínas en un 3-5% y la concentración fue directamente proporcional a la dosis administrada. En los estudios de digestibilidad se observó una degradación del pigmento de 24-29% en el contenido estomacal, 20-26% en contenido del intestino delgado y 20-26% en intestino grueso, este efecto estuvo fuertemente influenciado por el pH. No hubo degradación del pigmento a nivel hepático, obteniéndose el mismo valor de absorbancia para betalaínas al inicio de la incubación 0.83 ($9.5\mu\text{g/Kg}$), 0.42 ($2.3\mu\text{g/Kg}$) y 0.24 ($50\mu\text{g/Kg}$) y a las siete horas (0.82, 0.41 y 0.23 respectivamente). Por lo tanto, el pigmento absorbido a través del tracto gastrointestinal, no es metabolizado en hígado y es eliminado por los riñones. No se registró un aumento en el ritmo cardiaco después de la administración del pigmento, incluso para la concentración más alta (5g/Kg). El pigmento del fruto de garambullo no causa efectos adversos en los animales tratados, teniendo un potencial para ser usado como sustituto de colorantes sintéticos de la gama de los rojos.

II. INTRODUCCION

Los colorantes tienen una gran importancia en el área de alimentos, puesto que es el primer contacto que tiene el consumidor con este tipo de producto y de esto depende en gran medida su aceptabilidad o rechazo. Los colorantes pueden ser de origen natural o sintéticos. Sin embargo, ante la perspectiva de problemas toxicológicos con colorantes sintéticos, existe una necesidad de explorar algunas fuentes de pigmentos naturales que puedan ser utilizados a nivel industrial y así sustituir a los colorantes sintéticos que han sido eliminados de la legislación.

México cuenta con un total de 92 millones de hectáreas de las cuales las zonas áridas abarcan una superficie de 964,894.44 km, perteneciendo 11,769 km al Estado de Querétaro, predominando el clima semiárido que comprende el 65% de la superficie total, donde se dispone de 700,000 hectáreas de matorrales y pastizales (Nieto, 1986).

La superficie laborable en las zonas áridas es relativamente pequeña si se compara con toda la extensión de montañas, llanuras y lomeríos pedregosos (Anónimo, 1976).

El uso de tecnologías alternativas para el aprovechamiento de recursos no convencionales es importante no solo como una vía para elaborar y conocer nuevos productos sino como un elemento de orden económico para zonas marginadas, como es el caso de las zonas áridas donde uno de los principales problemas es la baja productividad en el sector agropecuario y la escasa explotación de los recursos naturales, lo cual trae como consecuencia bajo nivel

de vida de los habitantes de esta zona, donde de manera natural existen una gran variedad de recursos silvestres susceptibles de ser aprovechados para la producción de alimentos, dichos recursos tienen la ventaja de no requerir insumos para su desarrollo agrícola, de aquí que surge como una alternativa el aprovechamiento de las cactáceas, como es el caso del fruto de garambullo (Coronado y Vega, 1991).

El garambullo es una cactácea que se ubica en zonas áridas y semiáridas del país. Produce pequeños frutos comestibles color púrpura de aproximadamente 2 cm de diámetro, el cual debe ser consumido hasta 2 días después de su cosecha, debido a su rápida fermentación. En las comunidades productoras el fruto es cosechado a mano y se vende a nivel de mercado local, la inexistencia de canales de comercialización y baja capacidad de consumo del fruto fresco por parte de la población conduce a grandes pérdidas de este recurso. Aunado a ello la transformación, como medio de conservación, ocurre como hecho aislado en comunidades productoras.

El fruto del garambullo contiene pigmentos de tipo betaláinicos, los cuales son aminoácidos con un grupo amino cuaternario, de peso molecular entre 400-500. Cuenta con un 98-99% de betacianinas y 1-2% de betaxantinas, las primeras de color violáceo y las segundas de color amarillo. Dichos pigmentos pueden ser utilizados como aditivos de alimentos (Jackman y Smith, 1992).

Todos los aditivos aún cuando sean de origen natural deben de someterse a evaluaciones toxicológicas, por medio de las cuales se afirmará o negará que el producto se considere un riesgo para la salud. Además se deben de llevar a cabo

estudios de biotransformación donde los resultados proporcionarán características cualitativas y cuantitativas de dichos productos (Klaassen, 1986).

A pesar de que el fruto del garambullo ha sido consumido desde hace muchos años, no se puede asumir que su pigmento sea totalmente seguro al consumidor, incluso se han detectado casos de alergias en algunos colorantes como clorofilas, carotenoides y betalaínas, por lo que el presente estudio pretende proporcionar información sobre las características toxicológicas y farmacocinéticas del pigmento de garambullo y, así proponerlo como una alternativa para su aplicación como aditivo en alimentos (Hallagan et al., 1995).

III. REVISION DE LITERATURA

A. ZONAS ARIDAS Y SEMIARIDAS DEL PAIS

1. Localización

Del total de las zonas áridas mundiales, 964,894,44 km pertenecen a nuestro país, representando un 49% con relación a la superficie total del país, siendo 19 estados con 534 municipios los que tienen terrenos áridos y en los cuales se ubica el 30% de la población (Anónimo, 1976). Querétaro cuenta con una superficie de 11,769 km cuadrados, los cuales están distribuidos en 18 municipios, considerándose como semidesérticos Cadereyta, Colon, Peña Miller y Tolimán contando con una superficie de 3415.6 km cuadrados y como municipios de valles Corregidora, Ezequiel Montes, El Marqués, San Juan del Río y Tequisquiapan contando estos con 3485.9 km cuadrados. El clima semiárido comprende el 65% de la superficie total del Estado de Querétaro (Nieto, 1986).

Solamente el 15% del país recibe el 60% de las lluvias, lo que provoca que la mayoría del territorio nacional esté constituido por grandes extensiones áridas ubicadas principalmente en la zona norte extendiéndose hasta el altiplano meridional donde se encuentra Querétaro.

Debido a la baja precipitación pluvial y el clima extremo de dichas áreas, existe poca disponibilidad de forraje y agua, lo que provoca que las zonas no sean aptas para la ganadería. Además, las tierras no son susceptibles de aprovecharse para el cultivo intenso, dada la poca profundidad de la capa arable, originándose erosión y pérdida de este recurso. Los matorrales son arrasados y

utilizados como fuente alterna de combustible. Las laderas y los cerros son utilizados para la agricultura de temporal, destruyendo la flora natural que requirió miles de años para su desarrollo. En muchos casos la tecnología no se aplica y se carece de infraestructura, originando una pobreza extrema, bajo nivel cultural y grandes necesidades de alimento (Nieto, 1986).

2. Vegetación

En las zonas áridas y semiáridas crecen plantas de clima seco, como son los cactus, las palmas, la lechuguilla (*Agave lechuguilla*), el maguey pulquero (*Agave atrovians*), los mezquites (*Proposisis justiflora*), el huizache (*Acacia shaffrieri*) y algunos pastos (Anónimo, 1976).

Las cactáceas crecen en regiones soleadas en donde hayan períodos de sequedad que alternen con períodos de lluvia. Son muy resistentes al ataque de insectos, enfermedades, altas temperaturas y frío y no requiere de abonos (Fici, 1980). El agua constituye el principal componente químico. Su contenido varía mucho entre los diferentes géneros y entre cada especie dependiendo de la humedad del suelo y de la disponibilidad de agua (Bravo, 1978).

Los principales pigmentos contenidos en las cactáceas pertenecen a los clorofiloides y carotenoides. En las flores y frutos, existen betacianinas y betaxantinas (Bravo, 1978).

B. GARAMBULLO

1. Distribución

El garambullo es una cactácea que se distribuye desde Tamaulipas hasta Oaxaca, abunda en los mezquiales del centro de México, especialmente en Querétaro, Hidalgo, Guanajuato, San Luis Potosí, llegando hasta el sur de Tamaulipas, Guerrero y Oaxaca (Bravo, 1978). Su desarrollo es satisfactorio en las laderas de los cerros o partes bajas de éstos donde los suelos son de mejor calidad.

2. Características Morfológicas

Las plantas de garambullo son arborescentes, llegando a medir más de 4 m de altura. Tienen un tronco bien definido, corto, con ramificación abundante formando una copa bastante amplia como de 5 m. Las flores se desarrollan en la parte superior de las areolas. Su fruto es pequeño, de 1-2 cm de diámetro, globoso hasta elipsoide, moreno purpúreo, sin espinas, comestible, con un peso que fluctúa entre 0.4 y 2 g, al cual se le denomina garambullo (Fig.1) (Ballester, 1978).

3. Características Fisiológicas

La floración se lleva a cabo en primavera, teniendo la planta un crecimiento lento. Puede resistir algo de frío, siendo la temperatura mas adecuada durante el invierno de 10°C. El garambullo es una planta que almacena agua para su subsistencia de la manera más eficiente soportando la escasez y abundancia que provoca la lluvia, ya sea por su rápida evaporación o por provocar la erosión



**Fig.1 Planta y fruto del garambullo
(*Myrtillocactus geometrizans*) .**

en la superficie del suelo con poca penetración a la tierra, esta especie requiere una menor cantidad de agua respecto a la mayoría. La época anual de riego debe comenzar mas tarde y terminar un poco antes que para la media de los cactus (Ballester, 1978; Coronado y Vega, 1991).

Las plantas de garambullo comienzan a producir a los 4 ó 5 años. Generando de 25000 a 30000 frutos por temporada, bajo condiciones naturales se pueden encontrar hasta 70 plantas por hectárea. Se estima que la producción de fruto es de 7 a 20 kg por arbusto, por lo que el rendimiento por hectárea en la zona de Hidalgo se ha reportado que fluctua de 133 a 960 kg (Coronado y Vega, 1991)

4.Comportamiento Postcosecha

Se ha observado que si el fruto se cosecha en madurez de consumo y se mantiene a temperaturas de 22°C en recipiente cerrado, en menos de 6 horas ocurre una fermentación rápida, si el fruto se mantiene en recipientes abiertos, a los 2 días se observa una invasión fúngica.

Por otra parte, si se utiliza refrigeración (4°C) el fruto se mantiene en buen estado por unos 50 días o congelación (2°C) se puede observar al descongelarse después de los 50 días ciertos daños físicos y disminución de aroma y sabor.

C.COLORANTES

Un aditivo colorante es cualquier material que es un tinte,

pigmento u otra sustancia hecha por un proceso de síntesis que puede ser extraído, aislado o derivado, con o sin cambios finales o intermedios de identidad, de un vegetal, animal, mineral u otra fuente y que, al ser adicionado o agregado a alimentos, cosmético y drogas, es capaz de impartir un color (Meggos, 1984).

El consumidor juzga la calidad del producto, primero por su color. De hecho se ha demostrado que un alimento no sabe de manera correcta cuando no tiene el color adecuado. La apariencia del alimento afecta nuestras percepciones del olor, sabor y textura.

Los colorantes deben su color a la capacidad de poder absorber una parte de la luz que reciben y reflejar el resto. Para que un material actúe como colorante, deberá tener un grupo de átomos que recibe el nombre de cromóforo, y que es la principal unidad estructural de un colorante. Dicho cromóforo, consiste en un núcleo que tiene átomos unidos por dobles enlaces, atribuyéndose a esto el poder colorante, ya que las reacciones que originan el desdoblamiento de estos dobles enlaces, transforman al colorante en un cuerpo incoloro. Un solo grupo cromóforo no basta para producir color, pues la banda de absorción puede quedar en la zona del ultravioleta, de ahí que resulte necesario sumar los efectos de varios cromóforos en una misma molécula para obtener la coloración deseada (Santos, 1989).

1. Clasificación de colorantes

Los colorantes para alimentos se pueden dividir por su origen o fuente de la siguiente manera:

a. Colorantes Sintéticos

Los colorantes sintéticos que se usan con permiso gubernamental, se conocen como colorantes certificados y son compuestos de estructura conocida que no se dan en la naturaleza y son producidos por síntesis química. El proceso de certificación consiste en realizar análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos, los cuales deben garantizar que no se afectará la salud de los consumidores (Rosetta, 1986; Meggos, 1984).

Existen dos tipos de colorantes certificados, los tintes y las lacas. Los tintes son compuestos hidrosolubles que manifiestan su poder colorante disolviéndose en los productos. Las lacas son sustancias no solubles que colorean por dispersión (Dziezak, 1987).

b. Colorantes Idénticos al Natural

Los colorantes idénticos al natural son aquellos colorantes producidos en forma sintética y que son de identidad química semejante a los pigmentos que se encuentran en forma natural. Dentro de este grupo se encuentran los carotenoides, la cantaxantina y el B caroteno.

c. Colorantes Naturales

Son aquellos colorantes libres de certificación, los cuales son obtenidos de fuentes vegetales, animales o minerales. Dentro de estos colorantes se encuentran las antocianinas, betalaínas, clorofilas y flavonoides (Furia, 1990; Rosetta, 1986).

Tomando en cuenta el riesgo que implica el uso de colorantes sintéticos y la tendencia del consumidor a que lo natural es sano, los industriales han vuelto la mirada a los colorantes naturales, los cuales no presentan las mismas restricciones que los sintéticos. De aquí que en los últimos años se han elaborado más patentes en el campo de los colorantes naturales que en el de los artificiales, existen hoy en día alrededor de 356 patentes de colorantes naturales frente a 71 de artificiales (Rodríguez, 1985).

D. BETALAINAS

Las betalaínas se encuentran en los miembros de la familia Centrospermae, en plantas como la remolacha o betabel, frutas cactáceas, bugambilia y flores del amaranto, aunque también existen betalaínas de origen fungal. Se acumulan en las vacuolas celulares de las flores, frutas y hojas de las plantas que las sintetizan (Czygan, 1980).

1. Estructura Química

Las betalaínas son aminoácidos con un grupo amino cuaternario. El cromóforo responsable del color es un catión descrito como un sistema 1,7

diazoheptametino protonado. Los grupos R y R' específicos en la estructura dihidropiridina son sustituidos por las betaxantinas y las betacianinas. Las betaxantinas amarillas se caracterizan por tener grupos R y R' que no extienden la conjugación del 1,7 diazoheptametino, sin embargo, si la conjugación se extiende comprendiendo anillos aromáticos, el cromóforo es rojo y caracterizado como betacianinas (Fig.2) (Jackman y Smith, 1992; Czygan, 1980).

2. Clasificación

Las betalainas se dividen en dos tipos de pigmentos, que son las betacianinas y las betaxantinas.

Las betacianinas son los pigmentos de color violáceo. Más de 50 betacianinas han sido identificadas, todas derivadas de la betanidina e isobetanidina. La betacianina más común es la betanina. Poseen una naturaleza altamente iónica y su absorción es a los 535-540 nm (Nilsson, 1970).

El segundo grupo de pigmentos es el de las betaxantinas, el cual se subdivide en vulgaxantinas I, vulgaxantinas II, indicaxantina y miraxantina. Estos poseen un color amarillo y absorben a 470 y 486 nm (Santos, 1989).

El color que puede llegar a tener el pigmento, amarillo o rojo violáceo, dependerá de la propiedad de los grupos R y R' unidos a la estructura general. Si el grupo R ó R' contiene enlaces conjugados permitirá que se

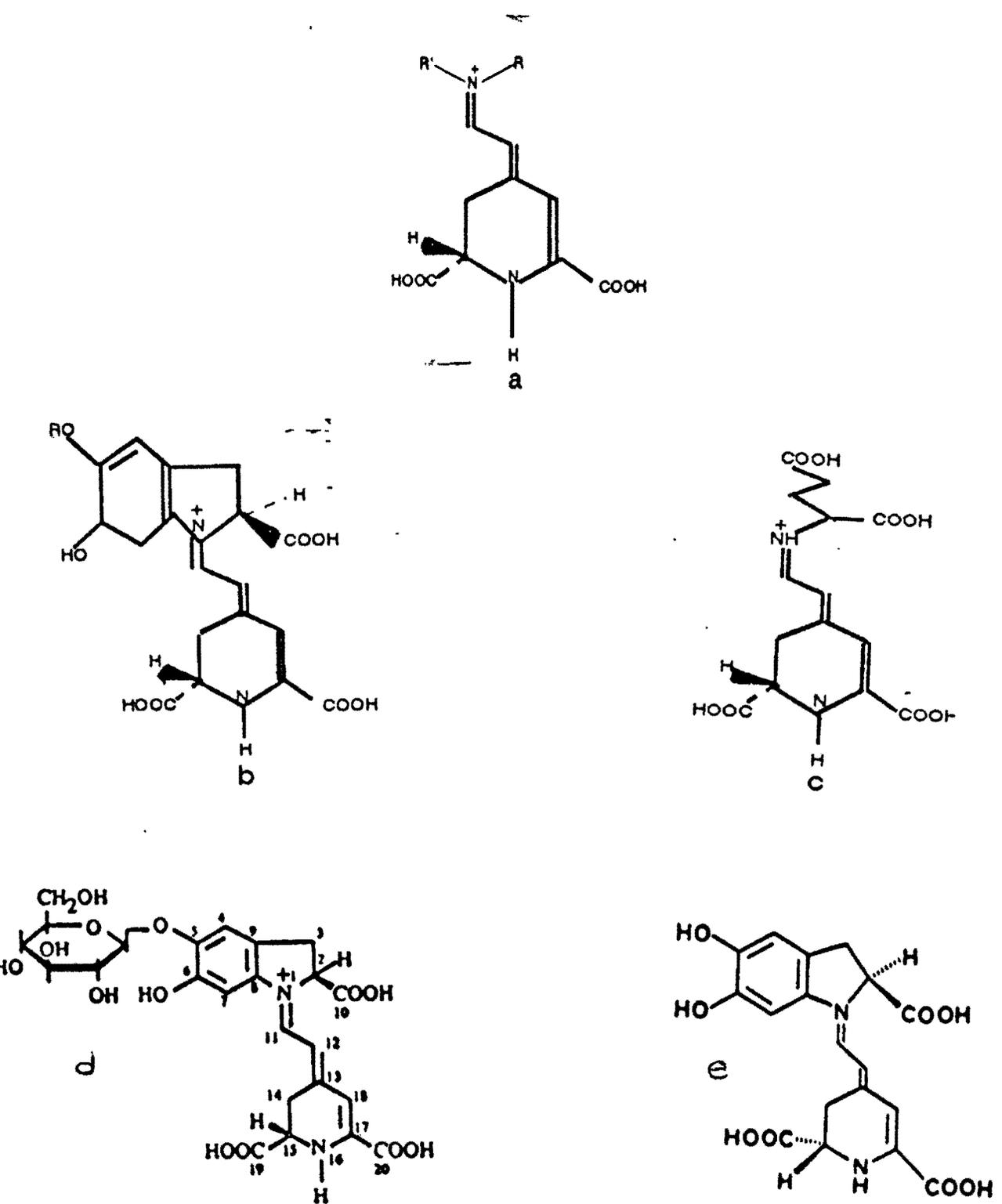


Fig. 2 Estructura química de las a)betalaínas, b)betacianina, c)betaxantina, d)betanina y e)betanidina.

manifieste la resonancia, el color del pigmento será rojo violáceo; de no favorecerse la resonancia, el color del pigmento será amarillo.

3. Estabilidad

Se ha visto que las betalaínas presentan inestabilidad tanto a factores físicos como a factores químicos a los cuales pueden estar expuestos.

a. Factores Físicos

Temperatura. Las betalaínas son altamente termolábiles, siendo la temperatura más eficaz durante el proceso de extracción de 25°C. Las betacianinas del garambullo presentan mayor estabilidad a la temperatura que las betaxantinas. (Reynoso, 1995). La velocidad de degradación de un pigmento a diferentes temperaturas, también depende del pH y de la actividad del agua (Altamirano et al., 1993).

pH. Las betalaínas del garambullo presentan una gran estabilidad en el intervalo de pH 4 a 6, no existiendo variación de color. Bajo condiciones ácidas la tonalidad es azul violeta y en condiciones alcalinas, el color llega a ser amarillo oscuro por la pérdida de betanina (Reynoso, 1995).

Luz. Las betalaínas del garambullo son altamente fotolábiles. Se ha demostrado que la presencia de luz disminuye en un 23% el tiempo de vida media del pigmento (Reynoso, 1995). El colorante debe ser almacenado en frasco color ámbar, y se debe de tener cuidados especiales en aquellos productos en los

que se utilicen los pigmentos. Además presentan inestabilidad frente a la luz ultravioleta.

b. Factores Químicos

Acido. El ácido ascórbico en niveles de 0.1% prolongó la vida media del pigmento aún en presencia de metales, mientras que el ácido cítrico al 1% fomentó la pérdida de coloración (Reynoso, 1995).

Metales. El hierro a 15 ppm y el cromo a 2 ppm disminuyeron la vida de anaquel en un 65%, debido a la destrucción del cromóforo y la consecuente pérdida del color.

Esterilización. Las condiciones de autoclave afectan la estabilidad del pigmento, el cual no se recomienda su aplicación para alimentos que necesiten del proceso de esterilización (Reynoso, 1995).

4. Usos

Estos están enfocados a productos que reciben un proceso limitado de calor, con una baja actividad de agua y corta vida de anaquel. Algunos de estos productos son:

a. Helados

Esta es uno de las aplicaciones más importantes de las betalaínas, ya que el producto adicionado con pigmento de garambullo ha tenido

gran aceptación por parte de los consumidores (García, 1997).

b.Yoghurt

En este producto se han utilizado niveles bajos de 4 a 8 mg/l de pigmento, el cual debe de contener menos de 10 levaduras por gramo.

c.Embutidos

Se pueden utilizar en productos cárnicos con bajo contenido de humedad y que no contengan SO₂, como pueden ser el salami o el jamón (Jackman y Smith, 1992).

E. EFECTOS TOXICOLOGICOS DE COLORANTES SINTETICOS

La toxicología es el estudio de los efectos adversos de sustancias en los organismos vivos. Una de las formas de llevar a cabo esto es mediante la realización de pruebas toxicológicas.

1.Pruebas Toxicológicas

a. Pruebas Agudas. Por medio de éstas, podemos determinar la dosis letal (LD₅₀) y los efectos agudos, mediante la realización de una sola dosis de la sustancia. Se llevan a cabo en especies como el ratón, rata y conejo, de ambos sexos. Se realiza por 15 días y se debe registrar mortalidad, cambios de peso, signos de intoxicación como letargia y cambios de comportamiento.

b.Pruebas Subagudas. En dichas pruebas, se administra la sustancia mezclada con el alimento, generalmente en 4 dosis. Después de 14 días se realizan estudios de histopatología.

c.Pruebas Subcrónicas. Generalmente duran 90 días, se utilizan dos especies (rata y ratón) y la ruta de administración es oral. Se dan 3 dosis (una alta pero que no provoque mas del 10% de mortalidad, una dosis baja y una intermedia).

d.Pruebas Crónicas. Se llevan a cabo al igual que las pruebas subcrónicas, pero el periodo es mayor. Se utilizan para determinar el potencial carcinogénico de los químicos.

e. Pruebas Teratológicas. En las pruebas teratológicas los ratones, ratas y conejos son los animales usados más frecuentemente. Se utilizan mínimo 10 hembras por grupo. En las pruebas se produce la gestación, se confirma ésta y se administra el químico y se establece el efecto teratogénico. Los animales se pesan diariamente y días antes del parto (día 20-21), se realiza una cesárea. Se cuentan los animales nacidos vivos y muertos, se examinan los fetos para detectar malformaciones u otros problemas.

f.Pruebas Reproductivas. Mediante estas pruebas se pueden evaluar efectos en fertilidad y comportamiento reproductivo en general. En la primera parte de la prueba se observan si ocurren problemas de fertiidad de los

padres, en la segunda parte se observa el desarrollo del feto y en la tercera se miden los efectos en la madre (lactancia, aceptación del producto) y del producto (crecimiento, desarrollo, etc.)

g.Pruebas Mutagénicas. Se llevan a cabo en organismos tales como bacterias, plantas, insectos, ya que son sistemas sencillos que permiten un análisis detallado de la composición genética (Loomis, 1996).

h.Pruebas Toxicocinéticas. Son aquellas en las que se realiza un estudio cuantitativo de los procesos metabólicos como son absorción, distribución y excreción de una sustancia. La duración de estas pruebas dependerá de la vía de administración, cantidad de producto y destino metabólico de éste en el organismo (Casarett y Doull, 1980).

2. ESTUDIOS TOXICOLOGICOS DE COLORANTES

Se han realizado estudios toxicológicos con diversos colorantes dentro de la gama de los rojos, en los que se encuentran:

Rojo No. 10 (Carmoisina)

Este colorante es un componente natural de la cochinilla. En dicho estudio se les administró a ratones machos (CD-1) una dosis única de Carmoisina por intubación oral (200 mg/Kg) o inyección iv (200 mg/Kg). La cinética del compuesto fué estudiado monitoreando la disminución de la radioactividad en plasma, tractogastrointestinal, riñón, hígado, pulmón, testículos, bazo y vesícula

biliar. Las heces y orina de los ratones fueron colectadas entre las 4 y 96 horas después de ser dosificadas. Después de la administración oral los picos de radioactividad fué casi completamente excretada (98%) en las heces y orina entre 16-32 horas después de la dosificación oral (Galli et al., 1981).

Rojo 2G

Se ha demostrado con anterioridad que el colorante Rojo 2G puede ser inductor de daño del DNA y mutaciones en sistemas bacterianos. Esta genotoxicidad ha sido estudiada mas allá investigando las actividades de dos tintes estructuralmente relacionados, el rojo 10B y el 6B, en estos ensayos. Los colorantes fueron incubados anaeróticamente con extractos de células de ciego de ratas. Los resultados muestran que mientras el rojo 6B fué inactivo bajo todas las condiciones, el rojo 10 B fue genotóxico (Haveland-Smith, 1981).

Rojo No. 3 (Eritrosina BS)

Dicho colorante fué administrado a cerdos en grupos de tres machos y tres hembras, oralmente, por 14 semanas en dosis de 0 (control), 167, 500 y 1500 mg/Kg de peso corporal /día. Se observó un aumento en el peso de la glándula tiroides y una disminución en los niveles séricos de tirosina en todos los tratamientos (Butterworth et al., 1976b).

En otro estudio se administró oralmente a ratas y ratones a concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0% por 13 semanas. Los efectos reportados fueron distensión cecal, incremento del peso de la tiroides y pigmentación de los

túbulos renales. La pigmentación se observó en ambos sexos con la mayor dosis administrada y en los machos con 0.5 y 1.0%. El nivel aceptable se consideró de 0.25% de la dieta, equivalente a un consumo de 160-170 mg/Kg /día, siendo la DL₅₀ de 300 mg/Kg por vía intraperitoneal en ratas (Butterworth et al., 1976a).

Cuando la eritrosina fué administrada a cuyos en la dieta y por intubación oral, se reportaron efectos clínicos como disminución del hematocrito, cuenta leucocitaria, nivel de hemoglobina y una pérdida de peso relacionada con la dosis. También se observaron cambios en la tiroides, como agrandamiento, un alto almacenamiento de coloide en la mayoría de los folículos, en algunos animales se observó una hiperplasia focal y una infiltración leucocitaria intraluminal e intersticial (Collins y Long, 1976).

Rojo No. 40 (Allura)

Es importante considera los estudios toxicológicos realizados con este compuesto puesto que actualmente, es uno de los colorantes mas usados en alimentos, drogas y cosméticos.

Cuando ratas adultas se alimentaron con una dieta que contenía 0, 2.5, 5.0 y 10% del rojo No. 40, durante dos semanas y continuaron durante la gestación y lactancia de las hembras. Se observó una reducción en el proceso de reproducción, en el peso de la descendencia y en la sobrevivencia, así como problemas de comportamiento (Vorhees et al., 1983).

En otro estudio, el colorante fué administrado en la dieta en niveles de 0, 0.42, 0.84 y 1.68% en ratones de 5 semanas de edad de la generación Fo y de 9 semanas de edad de la generación F1. Se midieron parámetros reproductivos y de comportamiento. Se reportaron pocos efectos adversos en tamaño y peso de las camadas. No se observaron efectos adversos en cuanto al desarrollo y comportamiento durante la lactancia (Tanaka, 1994).

Rojo Congo

Se estudiaron los colorantes rojo congo y nueve otros estructuralmente relacionados, observando toxicidad testicular. En este estudio se identificó el componente estructural responsable de la inducción prenatal de aplasia de células germinales. Se les administró una dosis oral a hembras de 8 a 12 días de gestación y posteriormente se examinaron los testículos de los machos de 45 a 50 días de nacidos (Gray y Ostby, 1993).

F. TOXICIDAD DE LAS BETALAINAS

La mutagenicidad de las betalaínas se ha probado en cinco líneas de *Salmonella typhimurium*, demostrando que no hubo actividad mutagénica con o sin fracciones de hígado S-9, además de que no se observaron diferencias significativas en cuanto a ganancias de peso, consumo de alimento y muestras histopatológicas. El pigmento no indujo genotoxicidad en *Escherichia coli* WP2 o para *S. typhimurium* TA1538 (Haveland-Smith, 1981).

Por otra parte, Shwartz et al.(1983) administraron betalaínas a ratas hembras en diferentes preparaciones, tales como una solución de betanina fermentada, una de betanina pura, otra de betanina degradada y por último una de betacianina. Ninguna de éstas causó o promovió la carcinogénesis en el hígado de las ratas.

En un estudio realizado por Kapadia et al.(1996) reportaron que después de llevar a cabo pruebas *in vitro*, el jugo del betabel mostró una alta actividad para prevenir tumores producidos por el virus Epstein-Barr. También se logró ver un efecto en cuanto a tumor de piel y pulmón, en pruebas *in vivo*, donde el jugo tuvo un efecto anti carcinogénico, disminuyendo hasta un 60%. Por esto se ha considerado que el jugo de betabel, debido a la betanina, puede ser utilizado para prevenir cancer.

IV. HIPOTESIS

El pigmento de garambullo no presenta riesgos toxicológicos al ser administrado a ratas Wistar, por ser un compuesto metabolizado a nivel gastrointestinal y fácilmente eliminado por orina.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Cuantificar los efectos toxicológicos producidos por el pigmento del fruto de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*), mediante la realización de pruebas de toxicidad aguda, cinética de eliminación, digestibilidad, metabolismo hepático y efectos cardiovasculares.

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar dosis letal del pigmento en ratas Wistar recién destetadas evaluando la variación de peso, el consumo de alimento y el daño a órganos internos.
2. Evaluar la digestibilidad del pigmento de garambullo en el tracto gastrointestinal.
3. Realizar cinéticas de eliminación del pigmento en orina e identificarlo mediante espectroscopía y cromatografía de líquidos de alta resolución.
4. Observar el metabolismo a nivel del hígado utilizando perfusión hepática.
5. Registrar los efectos cardiovasculares producidos por el pigmento de garambullo, por medio de un polígrafo.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. MATERIALES

1. Material biológico

-Ratas WISTAR (Recién destetadas, peso inicial de 80 a 100 g, hembras y machos)

-Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

2. Material de prueba

-Pigmento del fruto de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*)

B. METODOS

1. Extracción del Pigmento

Una parte de fruto se molió con tres partes de agua destilada. Posteriormente, se agregó 0.66 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) por 100 ml. del jugo obtenido. Se puso a fermentar en baño María a 37°C por 3 horas (Solomons, 1969). Los extractos fermentados se centrifugaron a 4500 rpm a 24 C durante 15 minutos. Se filtró y el sobrenadante se concentró por rotaevaporación (Fig.3) (Hess y Kask, 1975).

2. Pruebas Agudas

Se formaron cuatro grupos homogéneos en un mínimo de cuatro animales por experimento para cada sexo, con un peso inicial de 80-100 g

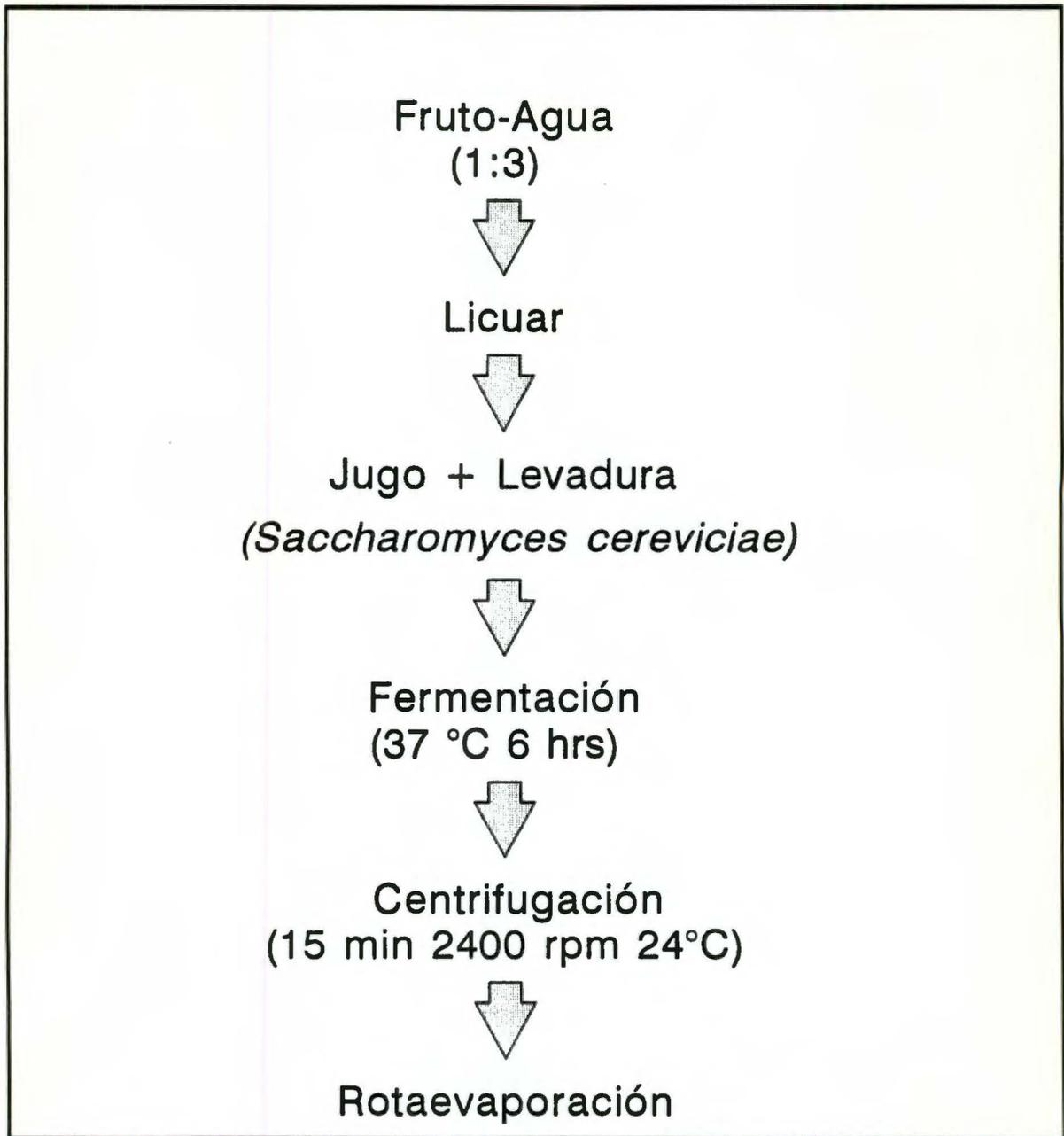


Fig.3 Método de extracción del pigmento del fruto de garmbullo

aproximadamente. Los animales se mantuvieron en un ambiente con ventilación en jaulas individuales de acrílico, dándoles diario de comer 100 g de alimento.*

a.1. Grupo control de hembras y machos. Se les administró oralmente una dosis única de agua desionizada y esterilizada.

a.2. Grupos problemas de hembras y machos. El concentrado se administró por sonda oral en dosis únicas de 0.5, 2.5 y 5.0 g/Kg del pigmento de garambullo en solución acuosa.

Se observó diariamente la conducta, se registró el peso corporal y el consumo de alimento, durante 15 días. Al día 16 se sacrificaron todos los animales y se les extrajo el corazón, el hígado, el bazo, los riñones y los pulmones. Cada órgano se llevo a peso constante para determinar el peso relativo de órganos (Fig.4).

3. Cinética de Eliminación del Pigmento en Orina

Se formaron cuatro grupos homogéneos con un mínimo de tres animales por experimento para cada sexo. Los animales se mantuvieron en cajas metabólicas y se les dio alimento (el antes mencionado) y agua en cantidades libres.

* Composición de la dieta: Nutricubos de Purina, el cual contiene maíz amarillo, harina de soya, pulpa de betabel deshidratada, harina de pescado, avena entera, levadura de cerveza, harina de alfalfa, melaza de caña, germen de trigo, suero deshidratado, harina de carne, acemite de trigo, BHA como preservativo de grasa animal, sal, carbonato de calcio, vitamina B12, DL-metionina, pantotenato de calcio, cloruro de colina, ácido fólico, riboflavina, tiamina, niacina, hidrocloreuro piridoxina, sulfato ferroso, vitamina A, vitamina D3, ioduro de calcio, carbonato ferroso, óxido de manganeso, carbonato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato de zinc y óxido de zinc.

Ratas WISTAR

Machos

Hembras

Control

Problema 1 (0.5 g/Kg)

Problema 2 (2.5 g/Kg)

Problema 3 (5.0 g/Kg)

Control

Problema 1 (0.5 g/Kg)

Problema 2 (2.5 g/Kg)

Problema 3 (5.0 g/Kg)

Consumo diario del alimento
Peso corporal diario

Sacrificio

Extracción de corazón, hígado, pulmones,
riñones y bazo

Peso relativo de órganos

Fig.4 Pruebas de toxicidad aguda del pigmento de garmbullo en ratas Wistar

b.1. Grupo control de hembras y machos. Se les administró oralmente

el vehículo empleado para la dilución del pigmento, es decir, agua desionizada y esterilizada.

b.2. Grupos problemas de hembras y machos. Se administró por sonda oral en dosis únicas de 0.5, 2.5, 5.0 g/Kg el pigmento del garambullo en solución acuosa.

La orina de cada animal se recolectó cada hora durante 24 horas. Se realizaron determinaciones espectrofotométricas a dicha orina y se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) a 535 nm (Fig.5) (Meloan y Kiser, 1973; Willard et al., 1981).

Para las determinaciones de HPLC se utilizó un cromatógrafo Perkin Elmer modelo 4000, con inyector automático y detector UV-Vis LC-95, integrador Perkin Elmer LCI-100 con una columna M-Bondapak C18, la fase móvil fue metanol-NaH₂ PO₄ 0.05M (1:1) ajustada a pH 3 con H₃PO₄.

4. Estudios de Digestibilidad *in vitro*

Se utilizaron tres animales de cada sexo realizándose cuatro repeticiones de cada muestra, se sacrificó al animal y se extrajo el tracto gastrointestinal (cortando estómago, intestino delgado e intestino grueso), se extrajo el contenido de cada porción, se lavaron los órganos, se pesaron los órganos y los contenidos.

Organos: Las piezas se cortaron en pedazos pequeños y se colocaron en tubos, se les añadió 5 ml de solución salina al 0.9% y se les agregó

Ratas WISTAR

Hembras y machos



Administración oral del pigmento de garambullo

0 g/Kg (Control)

0.5 g/Kg

2.5 g/Kg

5.0 g/Kg



Muestras de orina



* *Espectroscopía*

* *Cromatografía de líquidos*

Fig.5 Cinética de eliminación del pigmento de garambullo en orina.

1 ml de pigmento. Se utilizaron tubos testigos los cuáles sólo contenían órgano y 5 ml de solución salina. Se tuvieron diez repeticiones de cada tubo.

Contenidos gastrointestinales: Se midió el pH de cada contenido. A cada contenido se le agregó agua destilada y se agitó, el sobrenadante se colocó en tubos (5 ml), adicionando 1 ml de pigmento. Se utilizaron tubos testigos, los cuáles únicamente contenían contenido. Se tuvieron diez repeticiones de cada tubo.

Todos los tubos se incubaron a baño María durante 24 horas a 37°C utilizando agitación continua. Se realizaron determinaciones espectrofotométricas a dos tubos de cada muestra a las 2, 4, 8, 16 y 24 horas de que se colocaron los tubos en el baño, dichas determinaciones se hicieron a 535 nm (Fig.6).

5. Metabolismo Hepático

La perfusión hepática se realizó utilizando el método de Seglen (1974). Tres diferentes concentraciones 0.6, 2.3 y 9.5 mg de betalainas se inocularon a las células hepáticas. Estas se incubaron durante siete horas a 37°C. Se cuantificó el contenido de color en un lector de ELISA a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas a 535 nm (Fig. 7).

6. Efectos Cardiovasculares

Se utilizaron cuatro ratas Wistar machos de 45 días de destete, las cuales se anesteciaron con pentobarbital sódico en dosis de 2.5 ml por kg. Posteriormente se registró un electrocardiograma en un polígrafo. A los 30 minutos se administró mediante intubación oral 0.5 g/kg de pigmento extraído del

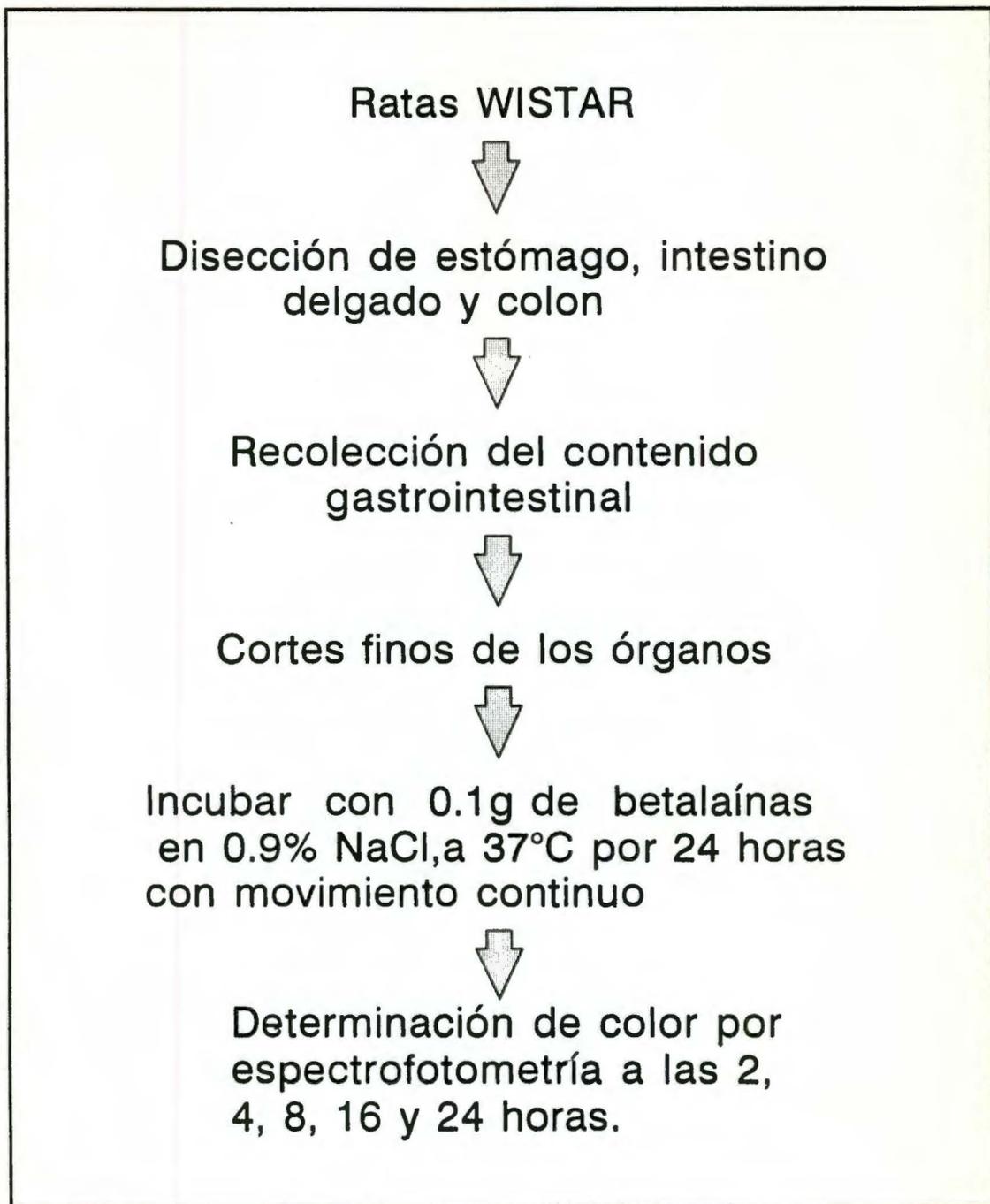


Fig.6 Digestibilidad gastrointestinal en ratas Wistar del pigmento de gámbulo.

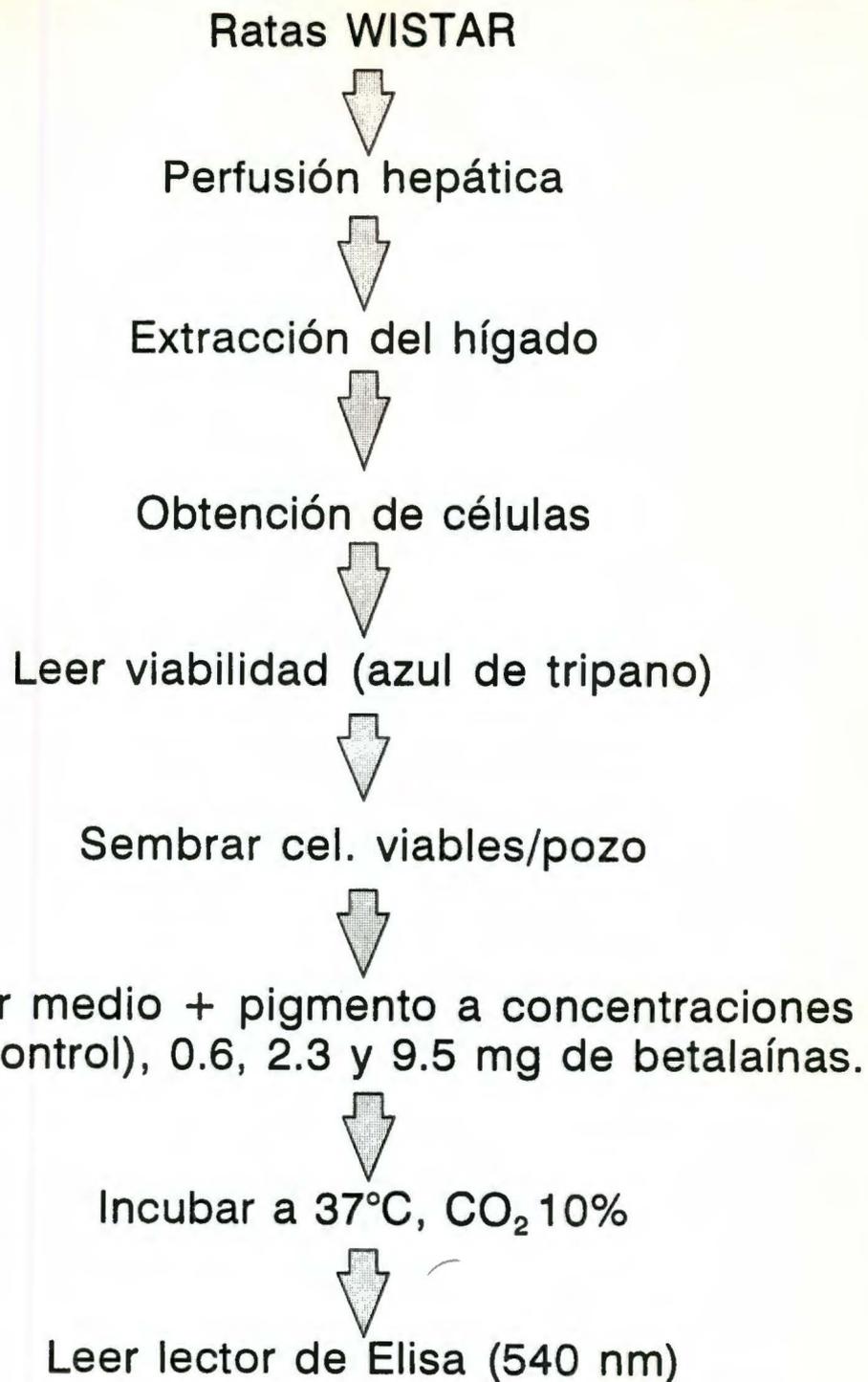


Fig. 7 Degradación hepática del pigmento de garmbullo en ratas Wistar.

pigmento de gámbulo, se registró la frecuencia cardíaca durante 30 minutos y se le administró la dosis restante para 2.5 g/kg, este mismo procedimiento se repitió para la dosis de 5 g/kg. Se utilizó una solución de adrenalina como un control positivo para incrementar la frecuencia cardíaca.

7. Analisis de Datos

Los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza de una sola vía y se compararon las medias mediante la prueba de rango múltiple de LSD a un nivel de significancia del 5% (Statgraphics Corporation, 1992).

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

A. EXTRACCION DEL PIGMENTO

Las betalaínas deben de pasar por un proceso de extracción, fermentación y concentración no solamente para obtener dicho pigmento del fruto, sino además, para lograr la máxima optimización del producto. Esto también se debe de llevar a cabo debido a que las preparaciones comerciales varían en cuanto a color y purificación, dependiendo de la proporción de betacianina y betaxantina extraídas (Jackman y Smith, 1992).

La concentración de betalaínas en el jugo extraído fue de 0.0083 g/100g. La extracción del pigmento se llevó a cabo con agua en una relación 1:3 con respecto al fruto, debido a que Reynoso (1995) indica que es el solvente con el cual se obtiene una máxima concentración y estabilidad del pigmento.

Al someter el jugo a fermentación, se observó un incremento en el contenido del pigmento de 8.3 a 9.7 mg/100g. La fermentación del pigmento se llevó a cabo utilizando *Sacharomyces cereviciae*, debido a que esta levadura es la más utilizada para este proceso (Drdák et al., 1992). La temperatura a la cual se realizó fue de 37°C ya que ésta no presentó ningún efecto en la tonalidad, aunque en un estudio realizado por Ontiveros (1988) se logró una mayor eficiencia en la extracción del colorante, al utilizar altas temperaturas (90°C), sin embargo, aquí se presentó una variación en la tonalidad del pigmento. El proceso de fermentación

se efectuó para disminuir los sólidos totales e incrementar la concentración de betalainas en base sólida ya que este se considera un método eficaz de purificación (Adams et al., 1976).

Después de fermentado, el pigmento se centrifugó con la finalidad de eliminar la levadura y pequeñas partículas del fruto.

El licor se concentró hasta los 0.23 g de pigmento/100g de solución, con la finalidad de eliminar los productos derivados de la fermentación tales como ácidos y alcoholes, además de que esto nos permitió trabajar con el volumen menor para la administración de los animales (Tabla 1).

La caracterización estructural e identificación de las betalainas involucra comparación directa con estándares utilizando técnicas de espectroscopía y cromatografía (Reynoso, 1995).

Se realizó un barrido del pigmento de garambullo en la región ultravioleta-visible del espectro. En la figura 8 se puede observar que el garambullo presenta dos picos máximos de absorción, a 280 y a 535 nm, los cuales coinciden con dos de los tres picos observados para el betabel (Reynoso, 1995). El pico adicional que tiene el betabel a los 480 nm corresponde a las betaxantinas, el cual no se diferencia en el espectro del garambullo, probablemente debido a que la concentración de dicho pigmento es mínima (Powrie y Fennema, 1963; Reynoso, 1995).

Los pigmentos identificados al final del proceso de extracción utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución fueron indicaxantina (1.20 min), filocactina (2.02 min), betanina (2.60 min), isobetanina (4.62 min) (Fig.9).

Tabla 1. Concentración de betalaínas durante el proceso de extracción

	Betalaínas (g/100g)
Fruto	0.0083
Jugo fermentado	0.0097
Pigmento concentrado	0.2300

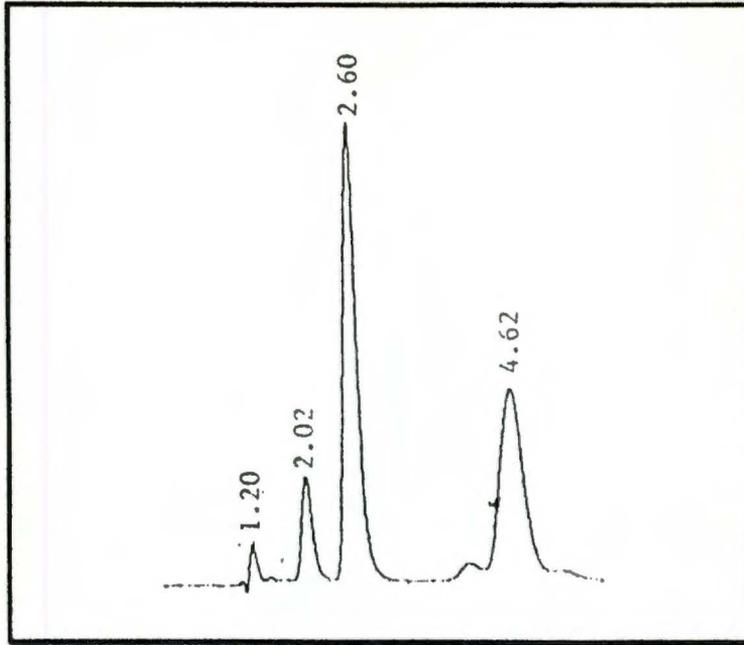


Fig. 9 Perfil cromatográfico del pigmento de garambullo a 535 nm. Indicaxantina (1.20 min), filocactina (2.02 min), betanina (2.60 min) e isobetanina (4.62 min).

B. PRUEBAS AGUDAS

El factor más importante para la aceptación de una sustancia como aditivo alimentario es el establecimiento de su inocuidad durante su consumo. Por lo que cuando se trata de una sustancia nueva, el punto de partida para la evaluación toxicológica es la letalidad. Para obtener esta información se debe de determinar otro factor muy importante que es la dosis-respuesta. De aquí siendo el primer paso el establecimiento de la dosis letal media (DL_{50}) (Fernícola y Jauge, 1985).

En base a esto se establecieron dosis de 0.5, 2.5 y 5.0 g de pigmento de garambullo por Kg de peso de rata, las cuales son aceptables para sustancias que no cuentan con tantas restricciones como los colorantes sintéticos.

Al realizar los estudios de toxicidad aguda, el pigmento de garambullo no causó la muerte en ninguna de las dosis administradas, ni en las hembras ni en los machos. Los animales no mostraron ningún efecto adverso a través de todo el experimento.

En un estudio que se llevó a cabo con ratones y ratas se reportó que después de una prueba de toxicidad aguda, la cual duró 7 días y en la que se administró Eritrosina por vía oral en cantidad de 0.32-0.40 g/Kg, se observó letargia generalizada, seguida de recuperación o de coma y muerte, en el segundo caso después de realizar la necropsia se encontró el abdomen distendido, además de adhesiones entre el diafragma y el hígado (Butterworth et al., 1976a).

En la figura 10 y 11 se presenta la gráfica de ganancia de peso de los animales con respecto al tiempo, cuando se les administró una dosis de 0.5 g/Kg se observó una ganancia hasta de 89g para los machos y de 78 g para las

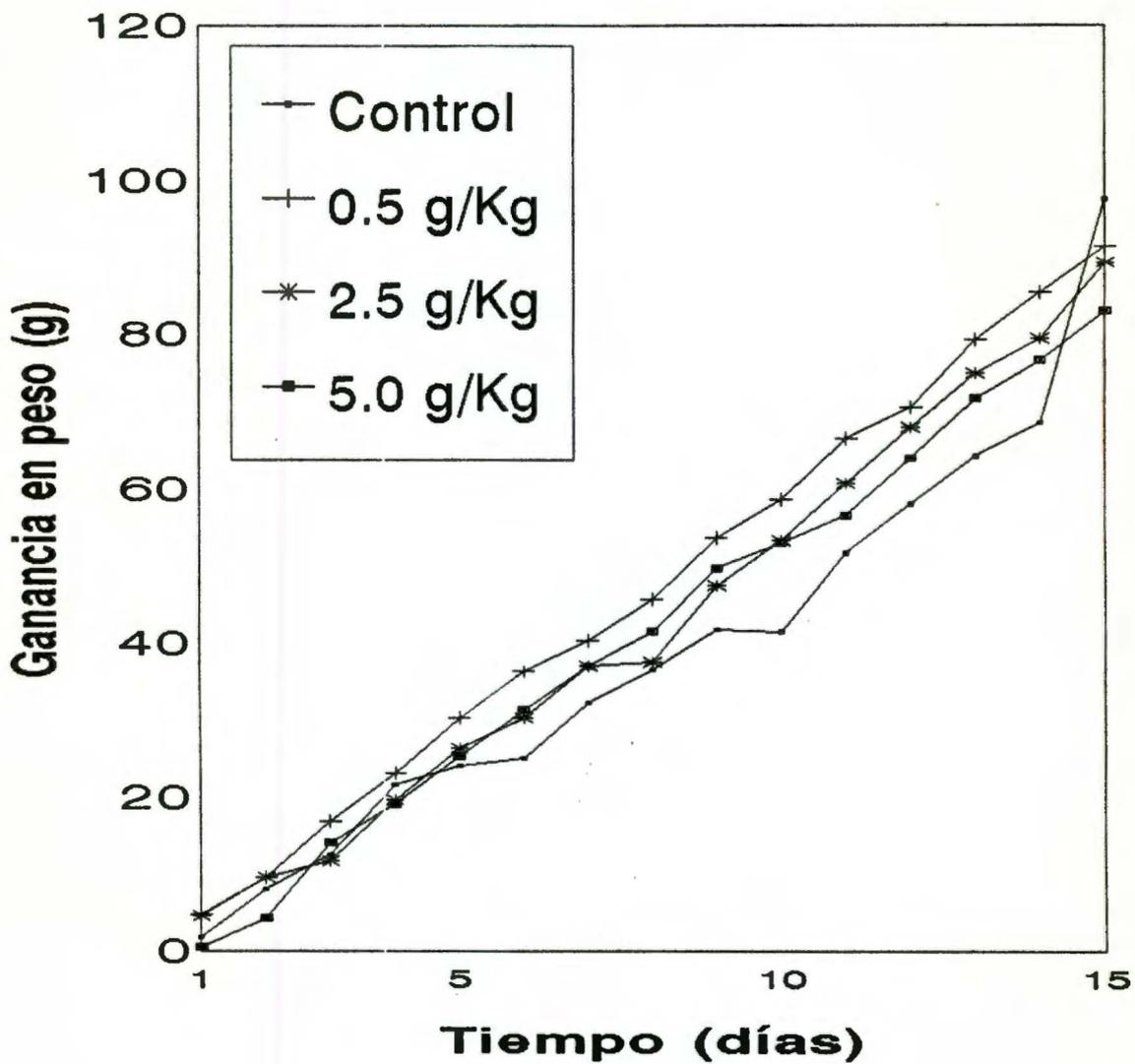


Fig.10 Incremento de peso de machos tratados con el pigmento del fruto de garambullo

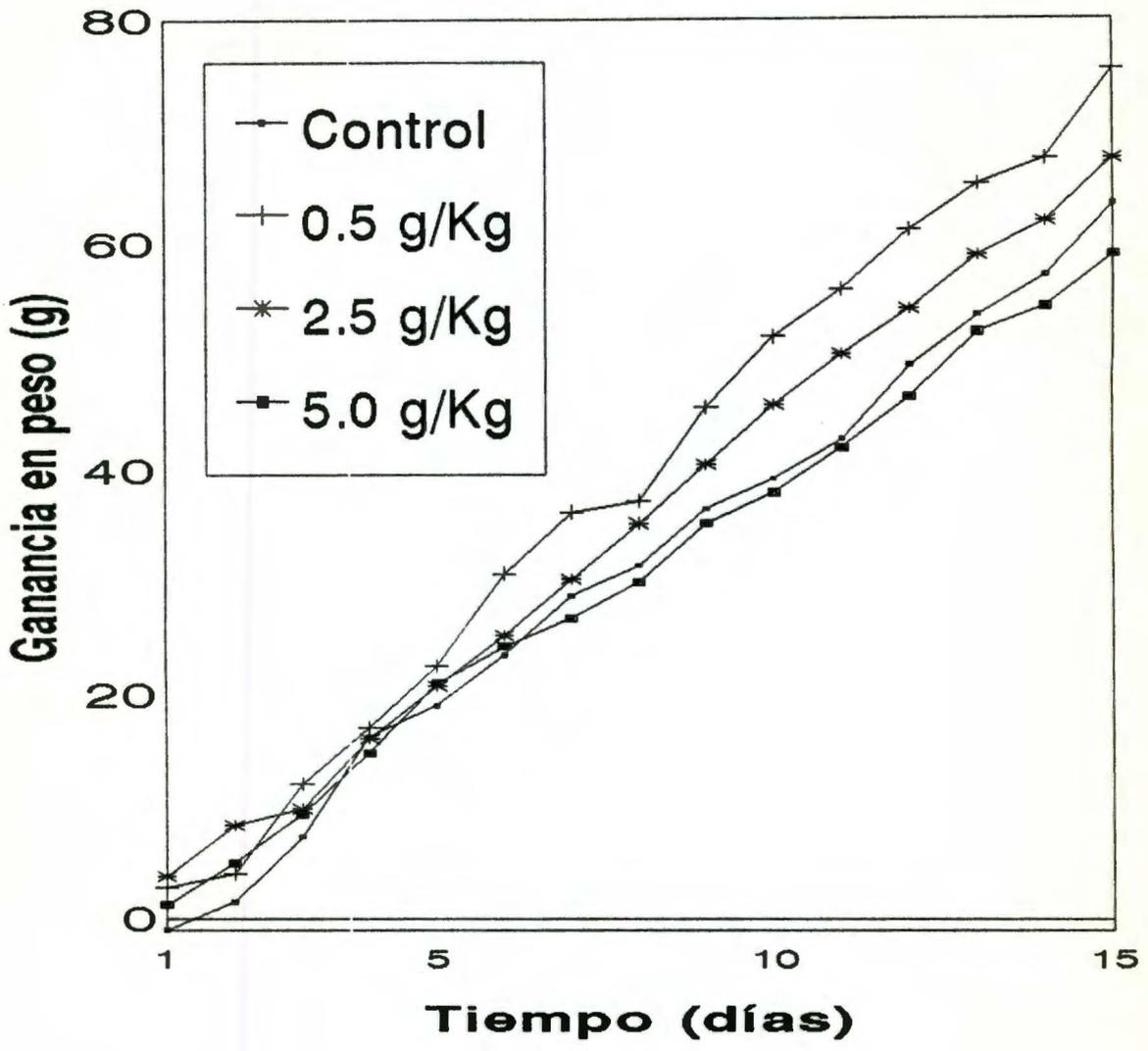


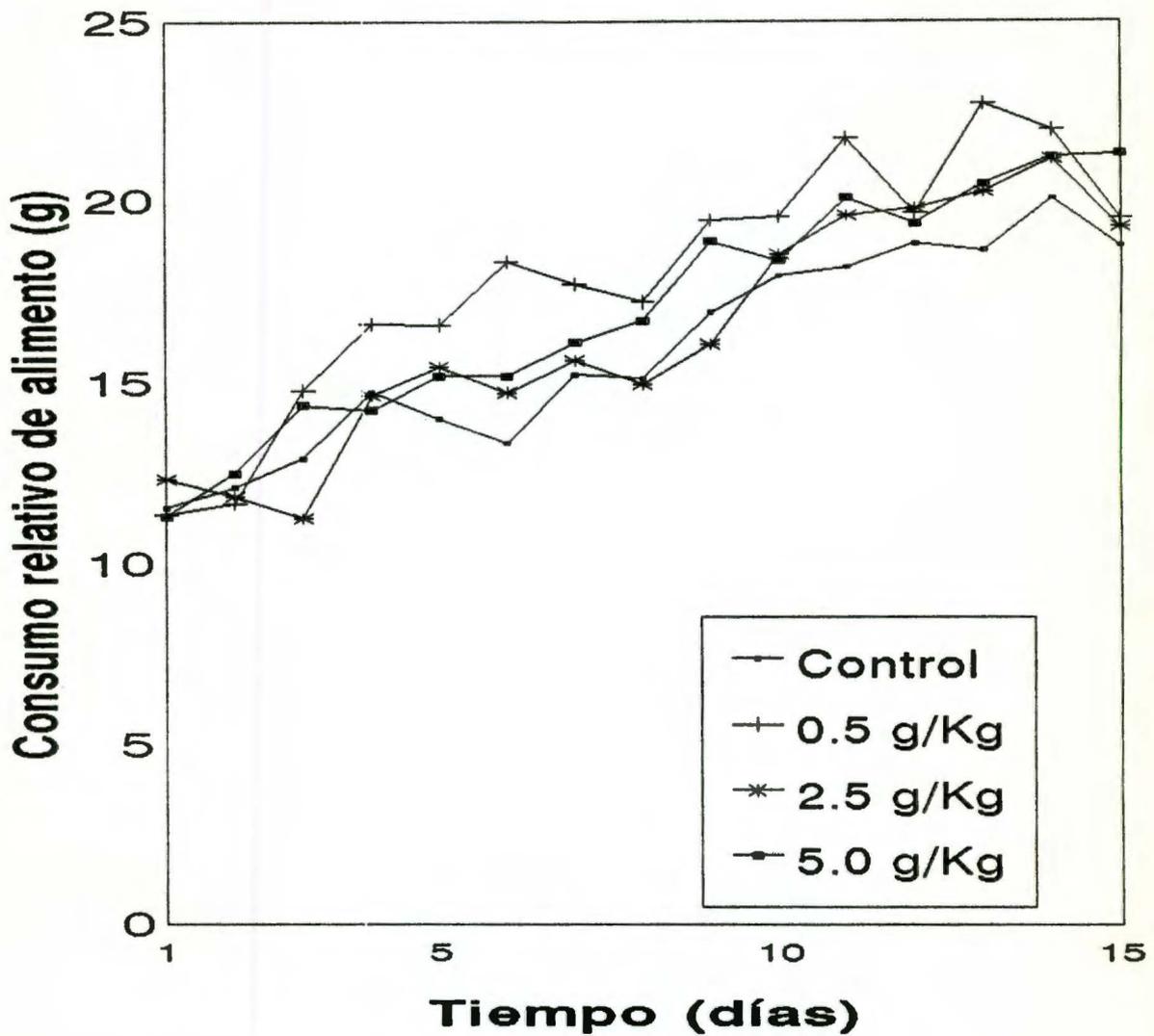
Fig. 11 Incremento de peso de hembras tratadas con el pigmento del fruto de garambullo

hembras, para la dosis de 2.5 g/Kg la ganancia fue de 87g para los primeros y de 69 g para las segundas, en el caso de la dosis de 5 g/Kg la ganancia fue de 80 g para los machos y de 61 para las hembras, lo cual se puede comparar con los animales control en donde para los machos la ganancia fue de 96 g y para las hembras de 61g, no se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) ni por tratamiento ni por sexo.

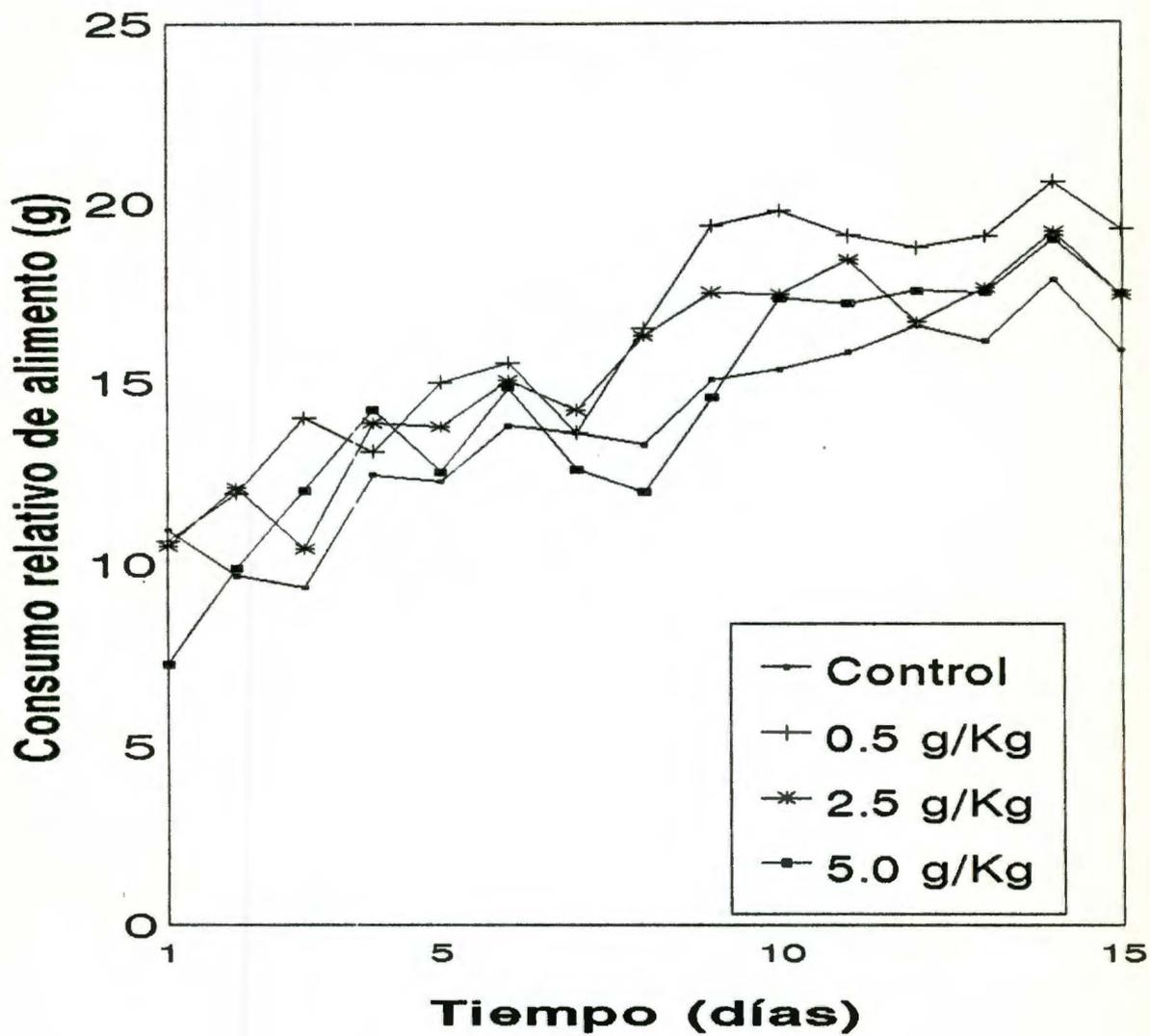
Se debe de tomar en cuenta que este se trata de un estudio biológico en el cual existen algunos factores como la absorción, el contenido de proteínas del plasma, la excreción biliar y sobretodo la flora intestinal que influye en los efectos de las sustancias y varía dependiendo de cada individuo, por lo que al seleccionarse los animales de forma aleatoria se espera variabilidad en la respuesta.

En la figura 12 y 13 se muestra el consumo relativo de alimento para machos y para hembras y se observa que el consumo de alimento incrementó a través del tiempo, siendo proporcional a la ganancia de peso. En el caso de los machos para la dosis de 0.5 g/Kg el consumo llegó a ser de 19 g al igual que para las hembras, para la dosis de 2.5 g/Kg el consumo fue de 18.5 g/Kg para los machos y de 18 g para las hembras, para la dosis de 5 g/Kg el consumo fue de 21 g para los primeros y de 18 g para las segundas, para el caso de la dosis control el consumo fue de 17 para los machos y de 16 para las hembras. No existiendo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) para ninguno de los casos.

Dichos datos coinciden con aquellos reportados por von Elbe y Shwartz en 1981, en este estudio realizado con ratas durante un período de 7 días el pigmento betalaínico fue adicionado al alimento en una cantidad de 2.0 g/Kg,



g. 12 Consumo relativo de alimento de machos tratados con el pigmento del fruto de garambullo



13 Consumo relativo de alimento de hembras tratadas con el pigmento del fruto de garambullo

durante dicho período no se observó diferencias significativas entre los animales problemas y los controles en cuanto a ganancia de peso y consumo de alimento, indicando que la palatabilidad y la calidad nutricional no afectaron la ingestión diaria.

En otro estudio realizado con ratones cepa CD-1 donde el pigmento fue administrado en dosis únicas de 0.5, 5.0 y 15 g de pigmento de garambullo por kg de peso animal, no se observó diferencia estadística significativa entre los animales problema y los control en ninguno de los parámetros antes mencionados (Reynoso, 1995).

Existen otros colorantes dentro de la gama de los rojos, como es la eritrosina, en donde sí se han reportado alteraciones. Datos obtenidos en un estudio de toxicidad crónica, el cual se llevo a cabo por 2 años en ratas, estas fueron alimentadas con dietas que contenían de 0.5 a 5.0% de eritrosina, los resultados indicaron que en los niveles de 5.0% se observó una depresión del crecimiento total del animal (Hansen et al., 1973).

En la figura 14 y 15 se relaciona el peso de órganos al finalizar el tratamiento con respecto al peso corporal de machos y de hembras, no se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) para ningún órgano de los animales problema comparado con los control para ambos sexos.

Estos resultados concuerdan con von Elbe y Schwartz (1981), donde no se encontraron alteraciones patológicas significativas después de una semana de tratamiento con el pigmento de betabel. Se reportaron focos blanquecinos en pulmones, pero se determinó que este hecho no estaba relacionado con la administración del pigmento. Se encontró una coloración purpúrea en el tracto

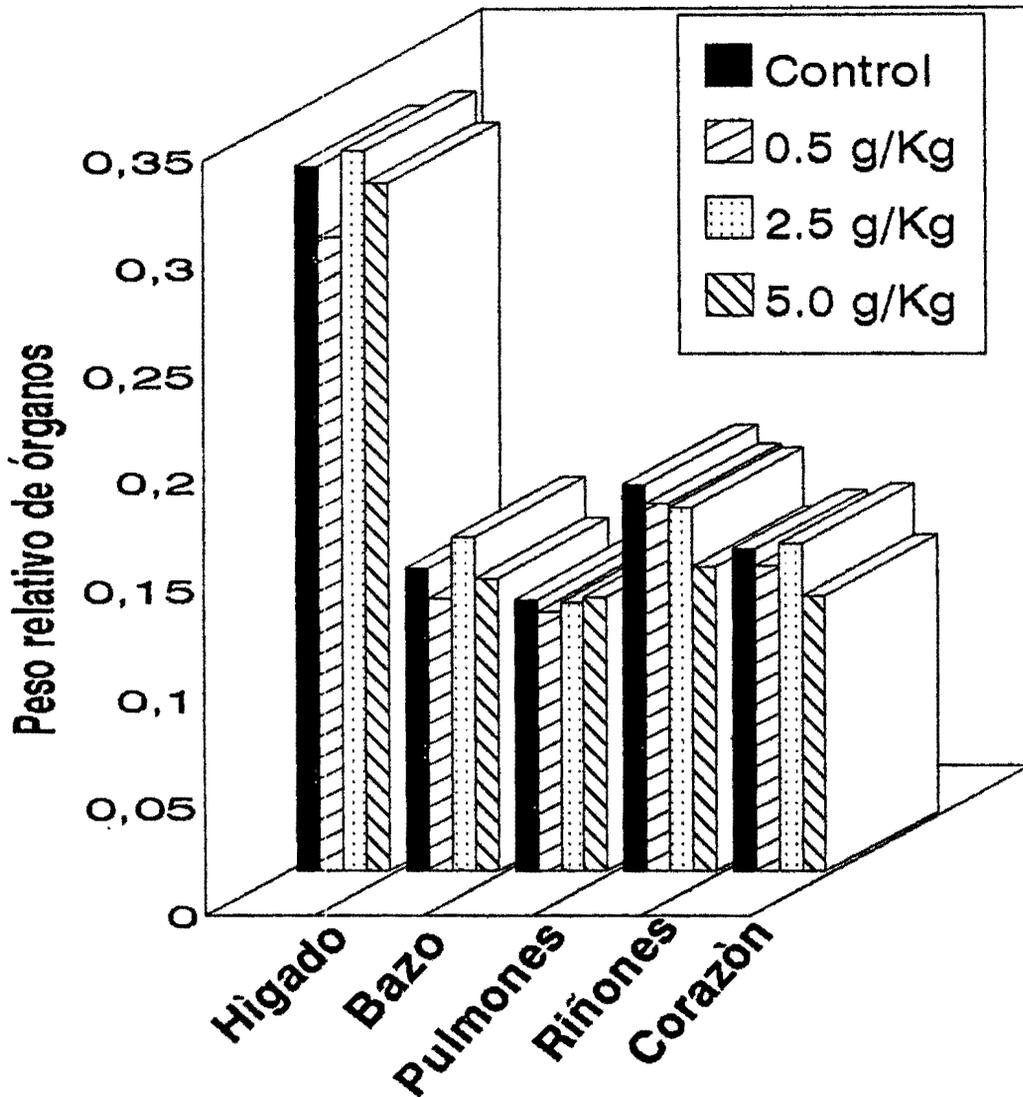


Fig. 14 Peso relativo de órganos de machos tratados con el pigmento del fruto de garbanullo

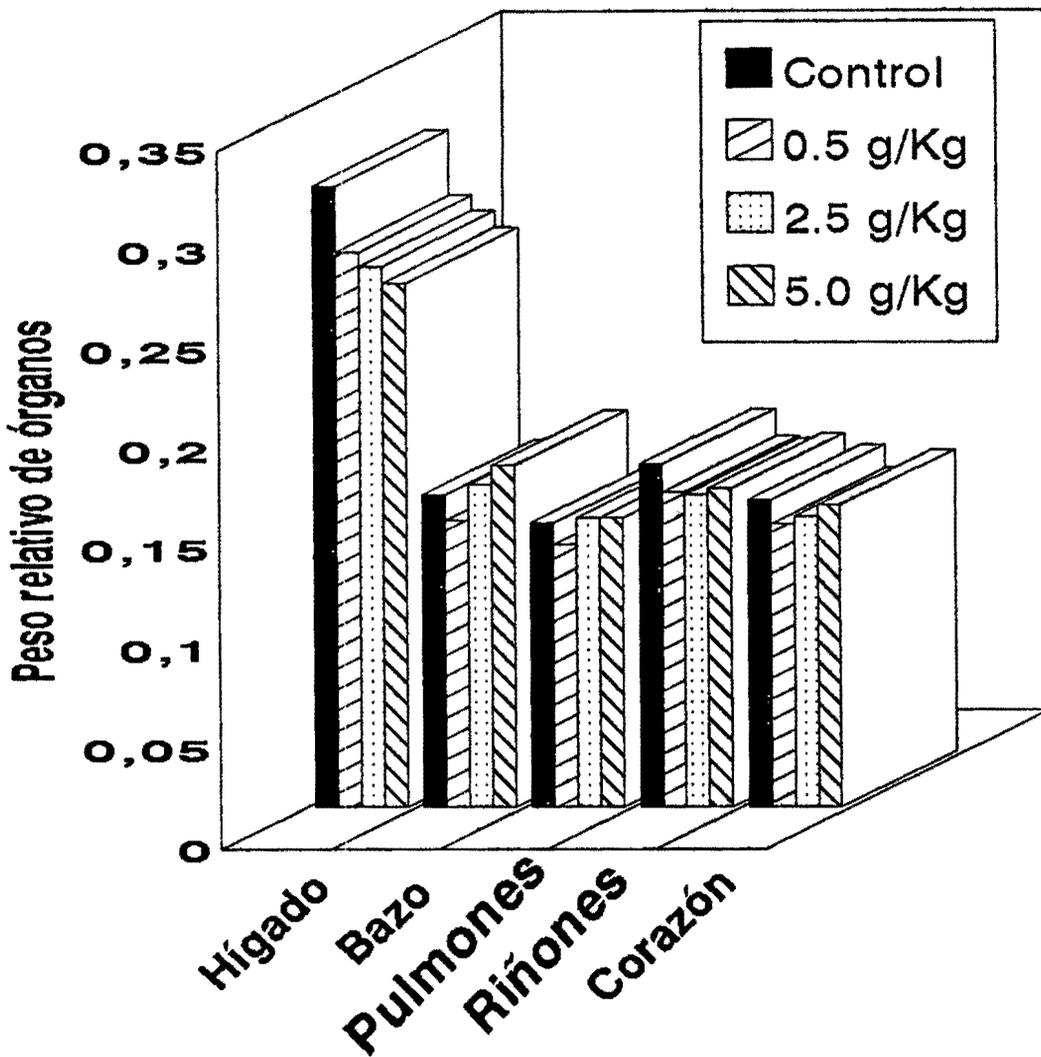


Fig. 15 Peso relativo de órganos de hembras tratadas con el pigmento de garbanullo

gastrointestinal, lo que también se pudo observar en el presente estudio, aunque esto no causó ningún daño.

El hecho de no encontrar daños en órganos es un factor muy importante en toxicología. En algunos colorantes como es el caso de la eritrosina en donde Hansen (1973) observó que el peso del bazo era bajo para casi todas las dosis administrada en machos, y en hembras para una dosis de 5.0%. Además, de una distensión cecal para la dosis de 1.0%, lo que aumentaba conforme la dosis incrementaba. Esto también se observó en un estudio realizado por Butterworth et al. en 1976, donde además se observó que el peso de los riñones en las hembras a las cuales se les dio 0.25 y 0.5% fueron significativamente mas bajos que para los controles, sin embargo, no se vio ningún trastorno en su funcionamiento. Además, se presentó un aumento de peso relativo de la tiroides en ambos sexos para el nivel más alto de pigmento en la dieta, lo que coincidió con Collins y Long en 1976. Estos hallazgos, junto con otros estudios, intervinieron para que en 1990 el uso del Rojo #3 ó Eritrosina se limitara solamente a algunos alimentos y medicamentos (Duxubury, 1990).

C. ESTUDIOS DE DIGESTIBILIDAD *in vitro*

En cuanto a los estudios de digestibilidad, se encontró que después de 24 horas de incubación el estómago degradó el pigmento en un 14%, el intestino delgado en un 9% y el intestino grueso en un 18% respectivamente, para los machos. Mientras que para las hembras, fue de 13%, 7% y 17%, respectivamente.

Sin embargo, la degradación por parte de los contenidos del estómago, intestino delgado e intestino grueso fue de 29%, 25% y 27%, respectivamente

para el caso de los machos. Mientras que para las hembras fue de 25%, 20% y 28%.

Por lo anterior podemos notar que el pigmento fue degradado en mayor proporción por los contenidos de los órganos que por los órganos en sí.

No existiendo diferencia estadística ($P < 0.05$) entre los machos y las hembras. Mientras que al realizar un análisis estadístico por horas se observó que para el caso de los machos hubo diferencia entre las horas 2 y 4 en relación con las horas 8, 18 y 24. Para las hembras la diferencia existió entre las horas 2 y 4 en relación con la 8 y ésta, a su vez, con la hora 18 y ésta con la hora 24.

En la Tabla 2 y 3 también podemos notar que el pH tiene un alto efecto en la degradación del pigmento, presentando una mayor degradación por parte de las soluciones con un pH igual al del intestino delgado e intestino grueso, el cual es de 6.9 y 6.8 respectivamente. Y una menor degradación para la solución de pH de 3.6 similar al del estómago.

Reynoso (1995) nos indica que las betalaínas del pigmento del garambullo presentan una mayor estabilidad a pHs de 4 y 5, y una menor estabilidad para los de 3 y 8.

En un estudio donde se administró oralmente un extracto de betabel a ratas, el contenido en el estómago disminuyó rápidamente, pero no se observó que ni los intestinos ni los ductos biliares estuvieran teñidos. Aquí se sugiere que las condiciones ácidas del estómago degradan en su mayor parte al pigmento aunque esta variación con nuestros datos puede estar dado por el hecho de que Watts y col. utilizaron betalaínas del betabel el cual presenta menor estabilidad en pHs menores de 4.5 (Watts et al., 1993; Jackman y Smith, 1992)

Tabla 2. Degradación gastrointestinal del pigmento de garambullo en machos.

	Contenido de pigmento (%)				
	Tiempo (horas)				
	2	4	8	18	24
Contenido de estómago	87.43	85.14	81.16	80.47	71.45
Piezas de estómago	93.39	91.48	87.90	86.65	86.51
NaCl + Pigmento (pH 3.6)	98.04	98.23	89.23	88.92	87.96
Contenido de Intestino delgado	95.91	94.67	81.74	77.07	74.64
Piezas de Intestino delgado	96.69	93.15	92.09	91.88	91.79
NaCl + pigmento (pH 6.9)	91.57	92.15	86.82	86.64	86.30
Contenido de Intestino grueso	85.63	85.19	83.10	75.71	73.21
Piezas de Intestino grueso	93.84	88.09	85.97	84.69	82.38
NaCl + Pigmento (pH 6.8)	96.22	94.35	85.43	85.76	85.50

Tabla 3. Degradación gastrointestinal del pigmento de garrambullo en hembras.

	Contenido de pigmento (%)				
	Tiempo (horas)				
	2	4	8	18	24
Contenido de estómago	94.75	91.14	90.52	81.67	75.40
Piezas de estómago	95.60	93.85	91.14	90.87	87.60
NaCl + Pigmento (pH 3.6)	98.38	98.60	90.64	89.77	88.29
Contenido de Intestino delgado	93.88	92.54	86.37	75.58	79.11
Piezas de Intestino delgado	95.20	95.68	94.15	93.80	92.94
NaCl + pigmento (pH 6.9)	91.88	90.60	85.94	87.11	86.92
Contenido de Intestino grueso	93.99	88.25	82.71	75.68	71.92
Piezas de Intestino grueso	88.53	88.45	87.20	82.25	83.37
NaCl + Pigmento (pH 6.8)	96.27	95.13	92.33	88.74	87.15

Sin embargo, no toda la degradación está dada por el pH, también intervienen otros aspectos como la bacterias intestinales, procesos no enzimáticos y la velocidad de vaciamiento gástrico.

Existen estudios sobre todo en tintes en donde se demuestra que tanto en los tejidos como en los contenidos hay bacterias reductoras. Fore et al. (1967) reportaron que los contenidos de la porción distal del intestino delgado y del ciego mostraron actividad reductora, aunque esto no se vio en los contenidos del estómago y del duodeno, se concluyó que la actividad fue microbial. Scheline y Longberg en 1965 al aislar *Enterococcus sp.* de heces de ratas obtuvieron una reducción de un colorante amarillo, más tarde se logró caracterizar a la enzima proveniente del *Streptococcus faecalis* responsable de este hecho. En 1969 Murrells encontró que extractos de *S. faecalis* y *Escherichia coli* eran capaces de reducir un tinte hidrosoluble, el Rojo 2G, lo que se explicó debido a la relativa permeabilidad de las membranas celulares de estos dos organismos hacia el rojo 2G.

En cuanto al pigmento de garambullo no se sabe con certeza si los microorganismos intestinales actúan para degradarlo, y de ser así, que tipo de organismos intervienen en el proceso.

D. METABOLISMO HEPATICO

Por medio de este método buscamos saber si las betalainas son metabolizadas por las células del hígado.

Por parte del estudio de metabolismo hepático, no se obtuvo datos de una degradación del pigmento de los hepatocitos para ninguna de las concentraciones probadas hasta las siete horas, esto lo podemos observar en la figura 16, donde se muestra que las betalaínas no son degradadas por las células hepáticas.

Este dato coincide con aquellos reportados en un estudio en donde utilizando preparaciones de hígado perfundido tampoco se observó un metabolismo por parte de éste (Watts et al., 1993)

Krantz et al. (1980) reportaron que cuando las betaninas fueron adicionadas al líquido de perfusión, el nivel de estas en la sangre fue constante durante el experimento y en 3 horas solamente el 1% del pigmento fue eliminado en la bilis. Lo que indicó que el metabolismo sufrido por el hígado es muy poco, la mayoría de la betanina absorbida es excretada casi en su totalidad a través de los riñones.

Dentro de los estudios histopatológicos realizados a los órganos después de una evaluación de toxicidad subcrónica del pigmento de garambullo por Reynoso en 1995, se observó un ligero edema en las células del hígado de animales administrados con 15 g/Kg del pigmento, esto fue provocado por una acumulación anormal de líquido en espacios intercelulares de los tejidos, debido a un desequilibrio entre las fuerzas que tienden a conservar líquido en el compartimiento intravascular y las que tienden a desplazarlo hacia los espacios intersticiales de los tejidos, y no por un efecto directo del pigmento (Robbins et al., 1984).

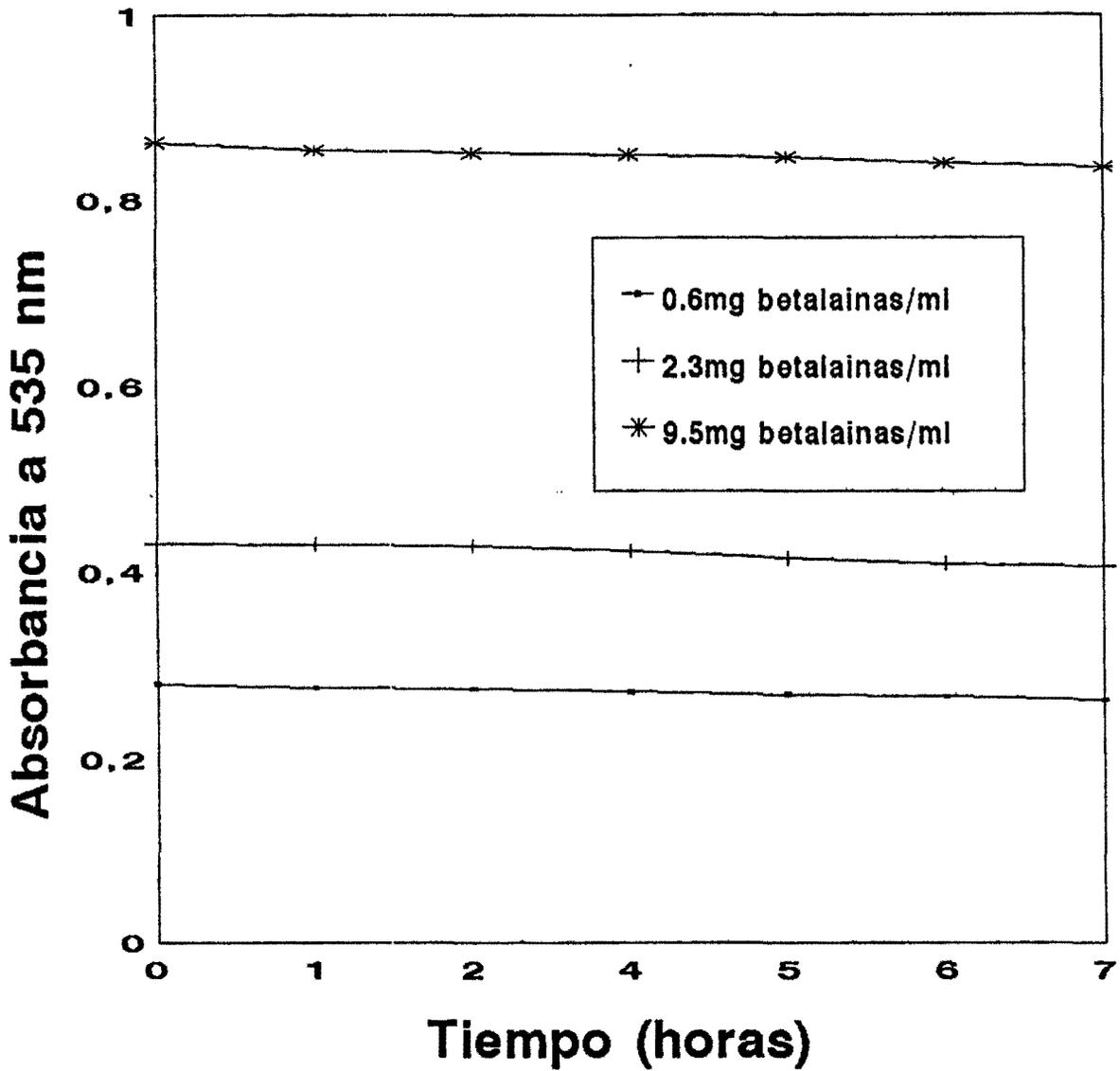


Fig. 16 Degradación del pigmento de garmbullo por hepatocitos de ratas Wistar.

Schwartz et al. (1983) demostraron en un estudio realizado con hígado de rata que después de utilizar diferentes soluciones de betalaínas de betabel, el pigmento no inicia ni promueve carcinogénesis.

Existen algunos aditivos en alimentos que son absorbidos de manera intacta y metabolizados, interactúan con órganos blancos y tejidos y pueden constituir un riesgo potencial tóxico (Furia, 1977).

Por lo anterior podemos ver que aún en el caso de que el pigmento llegara intacto al hígado, no existe el riesgo de un daño.

E. CINETICA DE ELIMINACION

Con respecto al estudio de cinética de eliminación del pigmento en orina, en donde después de la recolección a diferentes tiempos se identificaron a las betalaínas por espectroscopía (figura 17) y por HPLC (figura 18), aquí podemos observar que para la dosis de 0.5 g/Kg se detecta la betanina (2.72 min) , mientras que para las dosis de 2.5 y 5.0 g/Kg además de observarse la anterior se puede detectar la isobetanina (4.50 min).

La figura 19 relaciona el porcentaje de color con respecto al tiempo, mostrando que el tiempo de eliminación fue directamente proporcional a la concentración del pigmento administrada. La intensidad del color estuvo relacionada directamente con la dosis en el caso de la administración de 2.5 y 5.0 g/Kg para ambos sexos, en donde el color era rojo, mientras que para la dosis de 0.5 g/Kg se observó un tono naranja. Las betalaínas fueron totalmente excretadas en menos de 30 horas para todas las dosis administradas.

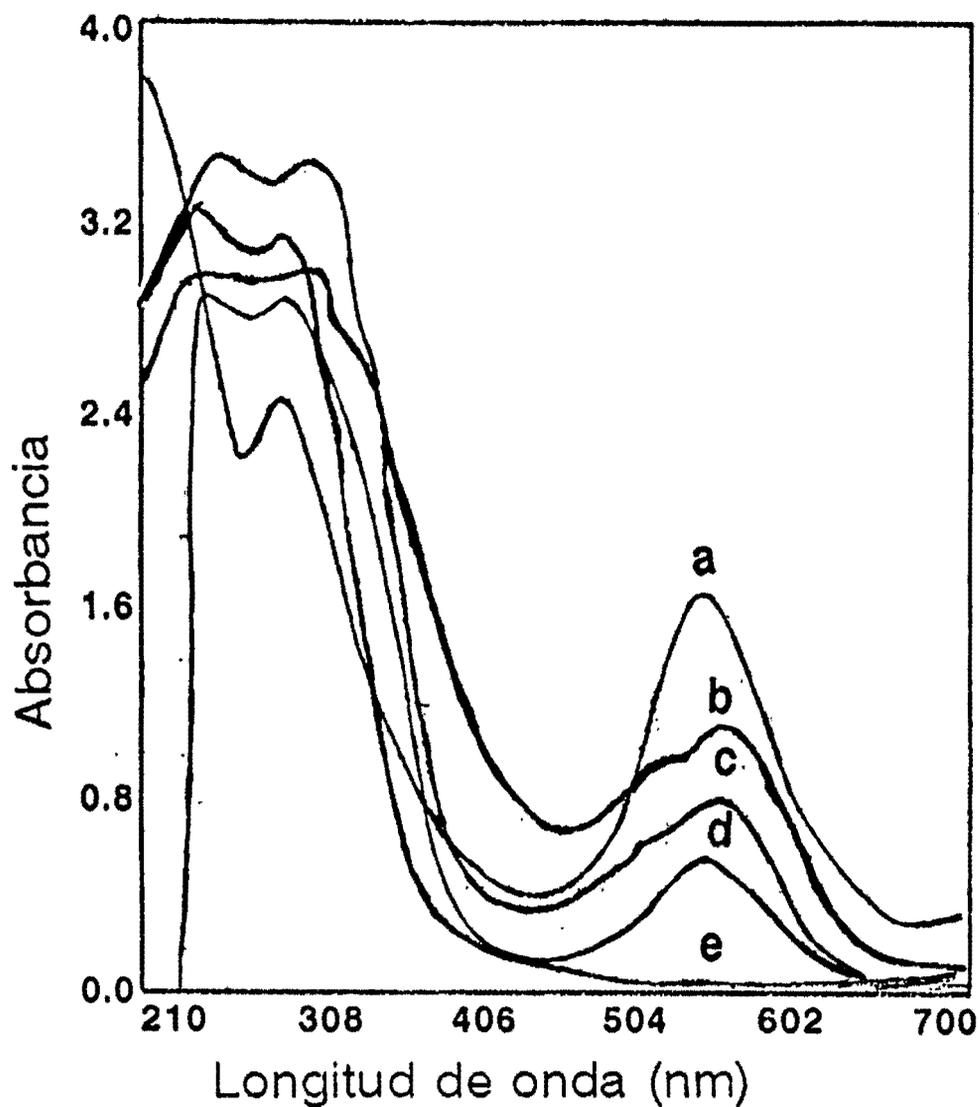


Fig. 17 Espectros de absorción del pigmento de gámbulo administrado a ratas Wistar (a), orina recolectada de la dosis de 5 g/Kg (b), 2,5 g/Kg (c), 0.5 g/Kg (d) y Control (e).

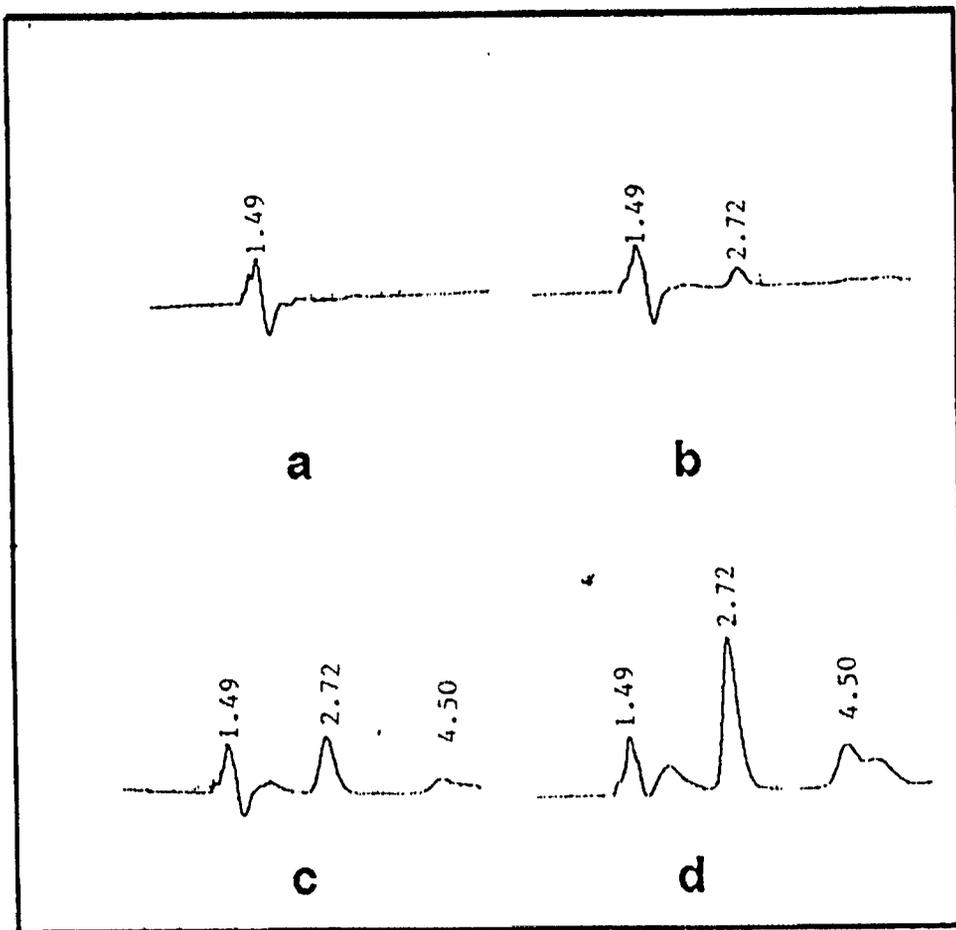


Fig. 18 Perfil cromatográfico de la orina de animales a)Control, b)0.5 g/Kg, c)2.5 g/Kg y d)5.0 g/Kg.

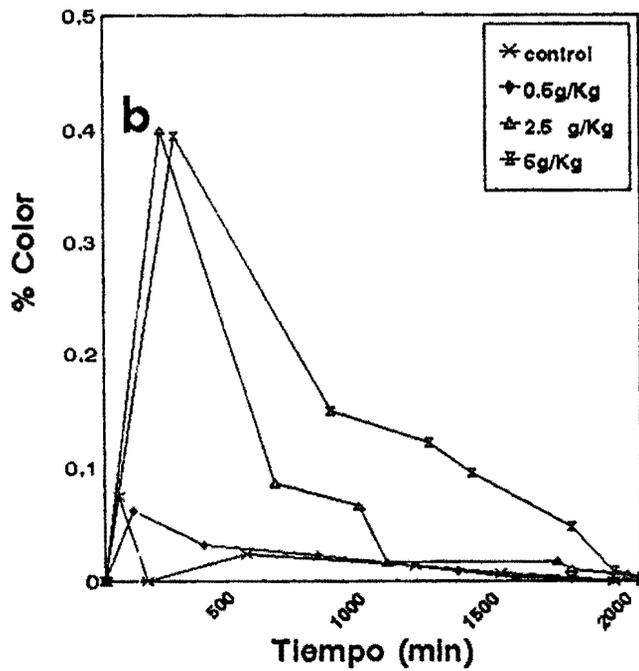
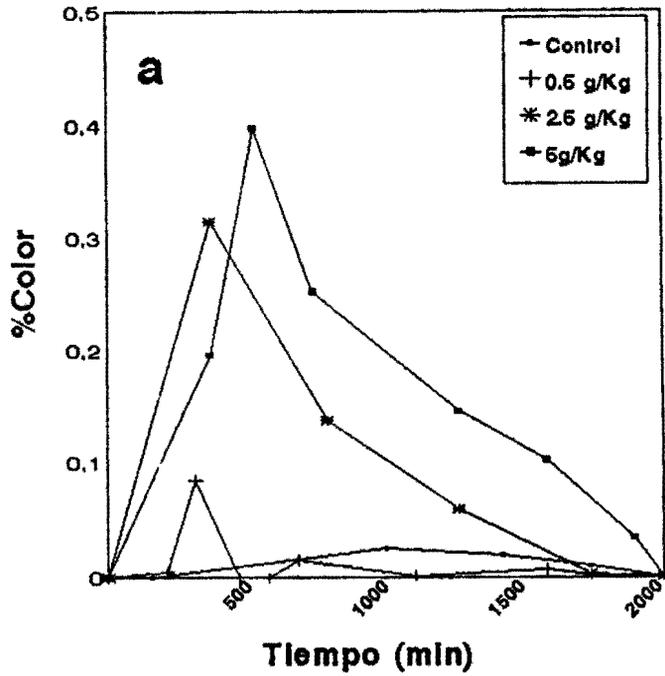


Fig. 19. Cinética de eliminación del pigmento de garrambullo a)machos y b)hembras.

Se pudo observar que la primer orina recolectada contenía mayor cantidad de betalaínas que las reportadas por Watts et al. (1993). En dicho estudio se estudio la beturia, la cual ocurre en un 10-14% de la población humana y se cree sucede por deficiencia de hierro o por problemas en la absorción. Después de una administración iv se obtuvo una recuperación del 80%.

En un estudio se observó que el Ponceau SX y el amarillo Sunset son absorbidos en el intestino a un nivel de 2-4% después de la administración oral, excretándose rápidamente por la bilis. En forma general, los compuestos hidrosolubles son pobremente absorbidos en el intestino y son reducidos por la flora bacteriana, seguido de la absorción de los pigmentos o sus metabolitos. La bilis es una ruta importante de excreción, en algunas ocasiones un porcentaje pequeño de pigmento no reducido es eliminado por la orina. Siendo una gran ventaja la característica de hidrosolubilidad del pigmento del garambullo, en su inocuidad.

Las betalaínas del fruto de garambullo son pobremente absorbidas y se eliminan del organismo a través de la orina debido a sus características de alta polaridad.

F. EFECTOS CARDIOVASCULARES

La velocidad cardiaca registrada antes de administrar el tratamiento fue de 420 latidos/minuto. Al administrarse el pigmento vía intubación, no se observó un aumento en el ritmo cardiaco incluso para la dosis de 5.0 g/Kg. Cuando se inyectó adrenalina vía intraperitoneal, hubo un incremento a 480 latidos/min (figura 20).

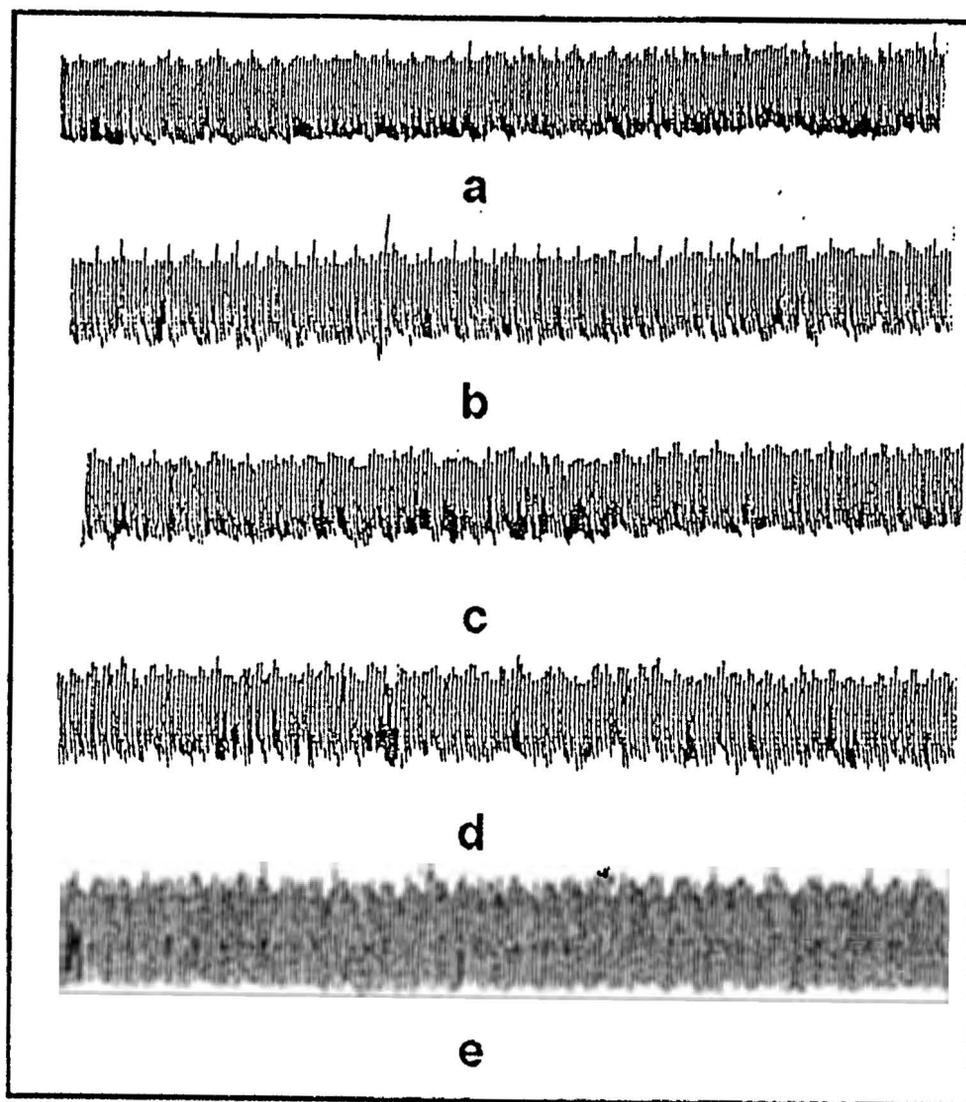


Fig. 20 Efecto de las betalainas de garambullo en el ritmo cardiaco en ratas administradas por intubación oral a)control, b)0.5 g/Kg, c)2.5 g/Kg, d)5.0 g/Kg y e)adrenalina 0.7 ml/Kg.

Krantz et al. reportaron que al inyectar vía intravenosa la betanina, se mostró un aumento transitorio del ritmo cardiaco así como de la presión arterial. Este efecto excitatorio fue similar al de la adrenalina.

Sin embargo en el presente estudio, este efecto no se presentó debido a que el pigmento fue administrado por intubación oral.

• VIII. CONCLUSIONES

- Durante el proceso de extracción se obtuvo una concentración final de 0.23 g/100g.
- El pigmento de garambullo no causó mortalidad hasta la dosis de 5.0 g/Kg por vía oral.
- El comportamiento de los animales a través del experimento fue normal.
- No se observaron alteraciones ni en el consumo de alimento ni en la ganancia de peso entre machos y hembras bajo las diferentes dosis de pigmento administrado.
- No se observó daño alguno para ninguno de los órganos analizados: corazón, pulmones, riñones, bazo e hígado. No hubo diferencia en cuanto al peso de los órganos de los animales problemas y los control para ambos sexos.
- La porción del tracto gastrointestinal que mas influye en la degradación del pigmento es el intestino grueso ya que fue de un 18% en los machos y de un 17% en las hembras, sin embargo se observó que el contenido del estómago para los machos y el del intestino grueso para las hembras degradaron mayor porcentaje del pigmento.
- Después de mantener al pigmento por siete horas en un cultivo de hepatocitos, bajo ciertas condiciones, se observó que éste no fue degradado por las células.

- Se constató que el pigmento es eliminado como betalaínas a través de la orina. Además de que la concentración eliminada fue directamente proporcional a la administrada.
- El ritmo cardíaco detectado fue de 420 latidos/min durante la administración de las dosis de 0.5, 2.5 y 5.0 g/Kg, no hubo diferencia en cuanto a la dosis control (0 g/Kg). Por lo que podemos decir que no se presentan efectos cardiovasculares a causa del pigmento.
- Estos estudios muestran el beneficio del pigmento de garambullo para ser usado como aditivo colorante, siendo un sustituto seguro de colorantes sintéticos.
- El garambullo puede ser una alternativa para los habitantes de las zonas áridas y semiáridas, pues es un área no explotada que puede contribuir para elevar el nivel de vida de los habitantes de dichas zonas.
- Las áreas en las cuales los Médicos Veterinarios Zootecnistas se pueden involucrar son tan vastas, pero algunas de ellas son pocas veces exploradas, el hacerlo permite trabajar en conjunto con especialistas de otras ciencias y, así enriquecer los conocimientos.

IX. BIBLIOGRAFIA

Adams, J.P., Von Elbe, J.H. y Amundson, C.H. 1976. Production of a betacyanine concentrate by fermentation of red beet juice with *Candida utilis*. J.Food Sci. 41:78-81.

Altamirano, C.R., Drdák, M., Simko, P., Rajniakova, A., Karavicova, J. y Preclhk, L. 1993. Thermal degradation of betanine in various water alcohol model systems. Food Chem. 46:73-74.

Anónimo. 1976. Función y objetivos de la comisión nacional de las zonas áridas. México. Pgs:18-24.

Ballester, O.F. 1978. Los cactus y otras plantas suculentas. De. Flora Print. España. Pg: 114.

Bravo, H.H. 1978. Componentes químicos de las cactáceas. En: Las cactáceas de México. UNAM. México. Pgs: 63-39 y 699-707.

Butterworth, K., Gaunt, F., Grasso, P. y Gangolli, D. 1976a. Acute and short-term toxicity studies on erythrosine bs in rodents. Fd. Cosmet. Toxicol. 14:525-531.

Butterworth, K., Gaunt, F., Grasso, P. y Gangolli, D. 1976b. Short-term toxicity of erythrosine bs in pigs. Fd. Cosmet. Toxicol. 14:533-536.

Casarett, L. J. y Douil, J. 1980. Toxicology. MacMillan Publishing Co. Pgs: 28-53.

Collins, T.F. y Long, E.L. 1976. Effects of chronic oral administration of erythrosine in the mongolian gerbil. Fd Cosmet. Toxicol. 14: 233-248.

Coronado, M. y Vega, S. 1991. Aprovechamiento de recursos silvestres en zonas áridas y semiáridas de México, Garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Cuadernos de nutrición. 14: 34-40.

Czygan, C.F. 1980. Betalains. En: Pigments in plants. Ed. Stuttgart. New York. Pgs:370-389.

Drdák, M., Altamirano, C.R., Rajniakova, A., Simko, P., Karavicova, J. y Benkovska, D. 1992. Red beet pigment composition. Effects of fermentation by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Food Sci. 57(4):307-311.

Duxbury, D.D. 1990. Replacement colors and blends for banned FD&C Rojo #3 lake. Food Processing. May. Pgs:63-70.

Dziezak, J. D. 1987. Applications of food colorants. Food Technology. April. Pgs: 78-88.

Fernícola, A.G. y Jauge, P. 1985. Nociones básicas de toxicología. Ed. CPEHS, OPS, OMS. México.

Fici, A. 1980. Plantas crasas (Cultivo, tratamiento y cuidado). Ed Vechi. España. Pgs: 5-39.

Fore, H., Walker, R. y Goldberg, L. 1967. Studies on Brown FK. II. Degradative changes undergone *in vitro* and *in vivo*. Fd. Cosmet. Toxicol. 5: 459.

Furia, T.E. 1977. Nonabsorbable, polymeric food colors. Food Technology. 31:34-39.

Furia, T.E. 1990. Color additives in food. En: Handbook of food additives. Ed. Press. Pgs:587-615.

Galli, C.L., Marinovich, M. y Costa, L.G. 1981. Absorption, distribution and excretion of [14] Carmoisine in mice after oral and intravenous administration. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19:413-418.

García, F.A. 1997. Extracción fraccionada, estabilidad y aplicación a un producto lácteo (Helado de crema) del pigmento de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. U.A.Q. Querétaro, México.

Gaunt, F. 1969. Short-term toxicity study on Indigo Carmin in the pig. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 7:17-24.

Gray, E.L. y Ostby, S.J. 1993. The effects of prenatal administration of azo dyes on testicular development in the mouse: A structure activity profile of dyes derived from benzidine, dimethylbenzidine or dimethoxybenzidine. *Fundamental and Applied Toxicol.* 20: 177-183.

Hallagan, J.B., Allen, D.C. y Borzalleca, J.F. 1995. The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics colour additive exempt from certification. *Fd. Chem. Toxic.* 33:515-528.

Hansen, W.H., Zwickey, R.E., Brouwer, J.B. y Fitzhugh, O.G. 1973. Long-term toxicity studies of erythrosine. Effects in rats and dogs. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 11:535.

Haveland-Smith, R.B. 1981. Evaluation of the genotoxicity of some natural food colours using bacterial assays. *Mutation Res.* 91: 285-289.

Hess, G.G. y Kask, U. 1975. Química general experimental. CECSA. México, D.F. 9: 71-74.

Jackman, R.L. y Smith, J.L. 1992. Anthocyanins and betalains. En: Natural food colorants. Ed. G. A. F. Hendry y J. D. Houghton. AVI Publ. Blackie. Glasgow & London. Pgs: 183-241.

Kapadia, G.T. 1996. Chemoprevention of lung and skin cancer by beet root extract. *Cancer Lett.* 100: 211-214.

Klaassen, C. D. 1986. Principles in toxicology. En: Cassarett and Doull's Toxicology. New York. Pgs: 11-32.

Krantz, C., Monier, M. y Wahlstrom, B. 1980. Absorption, excretion, metabolism and cardiovascular effects of beet root extract in the rat. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 18:363-366.

Loomis, J.A. 1996. Loomis essentials of toxicology. Ed. Academic Press. U.S.A. Pgs. 221-238.

Meggos, H.N. 1984. Colors – key food ingredients. *Food Technology.* January. 70-74.

Meloan, C.E. y Kiser, R.W. 1973. Problemas y experimentos en análisis instrumental. Ed. Reverte Mexicana, S.A.

Murrels, D.F. 1969. The reduction of food azo dyes by rat caecal microflora, with particular reference to *Streptococcus faecalis*. Ph.D.Thesis. University of Reading, Reading, Berks, England.

Nilsson, I. 1970. Studies into the pigments in beet root. *Lantbrukshoegskolans. Anal.* 36:179.

Nieto, J. 1986. Desarrollo rural en Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

Ontiveros, A.A. 1988. Extracción y pruebas de estabilidad del colorante de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.

Powrie, W.D. y Fennema, O. 1963. Electrophoretic separation of beet pigments. J. Food Sci. 28:214-220.

Reynoso, R. 1995. Extracción, caracterización, estabilidad durante almacenamiento y pruebas toxicológicas del pigmento del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis de Maestría. Facultad de Química. U.A.Q. Querétaro, México.

Robbins, L.S., Cotran, R.S. y Kumar V. 1984. Fluid and hemodynamic derangements. In pathologic basis of disease. Ed. Saunders. E.U.A. Pgs: 85-88.

Rodríguez, P. F. 1985. Las betalaínas como colorantes naturales en alimentos. Industria alimentaria. 7: 9-13.

Rosseta, L. 1986. Food colors. Food Tech. 41: 49-56.

Santos, E. 1989. Introducción. En: Avances en aditivos para la industria de alimentos. Pual. México. Pgs: 1-111.

Scheline, R.R. y Longberg, B. 1965. The absorption, metabolism and excretion of the sulphonatedazo dye, acid yellow by rats. Acta pharmac. Tox. 23:1.

Seglen, P.O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell. Biol. 13:29-83.

Shwartz, S.J., von Elbe, J.H., Pariza, M.W., Goldsworthy, T. y Pitot, H.C. 1983. Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. Fd. Chem. Toxicol. 21:531-535.

Statgraphics Corporation. 1992. Software version 5.0.

Solomons, G.L. 1969. Materials and methods in fermentation. Academic Press Inc. Londres.

Tanaka, T. 1994. Reproductive and neurobehavioral effects of Allura Red AC administered to mice in the diet. *Toxicol.* 92:169-177.

Von Elbe H.J. y Schwartz, S.J. 1981. Absence of mutagenic activity and a short-term toxicity study of beet pigments as food colorants. *Arch. Toxicol.* 49:93-98.

Vorhees, C.V., Butcher, R.E., Brunner, R.L., Wootten, V. y Sobotka, T.J. 1983. Developmental toxicity and psychotoxicity of FD&C Red no. 40 in rats. *Toxicology.* 28:207-217.

Watts, A.R., Lennard, M.S., Mason, S.L., Tucker, G.T. y Woods, H.F. 1993. Beeturia and the biological fate of beetroot pigments. *Pharmacogenetics.* 3:303-311.

Willard, H.H., Merritt, L.L., Dean, J.A. y Settle, F.A. 1981. Instrumental methods of analysis. Litton Educational Publishing Inc. New York. Pgs: 529-563.