
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

Propiedad de la Facultad de
Ciencias Químicas - UAQ

**“Extracción fraccionada, estabilidad y
aplicación a un producto lácteo (helado de
crema) del pigmento de garambullo
(*Myrtillocactus geometrizans*)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:
FLOR ANGÉLICA GARCÍA BARRERA**

QUERÉTARO, QRO. JUNIO 1997

FACULTAD DE
QUÍMICA



BIBLOTECA

*Esta investigación se desarrolló en las instalaciones
del Departamento de Investigación y Posgrado en
Alimentos de la Facultad de Química, en la
Universidad Autónoma de Querétaro.*

Bajo la asesoría de M.C. Rosalía Reynoso Camacho

**Gracias Jesucristo por darme todos los
medios para alcanzar esta meta tan importante en mi vida.**

**Es tarea imposible mencionar a cada
una de las personas que has colocado
a mi derredor, pero sin duda es posible agradecerte la
presencia de todas ellas.**

De manera muy especial mi más sincero agradecimiento a:
M.en C. Rosalía Reynoso Camacho por el gran apoyo técnico, tiempo, paciencia, trabajo, confianza y amistad que durante la elaboración de este proyecto continuamente me brindó.

Gracias...

... Dra. Elvira González, por la confianza depositada en mí para la realización de este proyecto, así como el gran apoyo y enseñanzas que me brindó en todo momento.

... Mtro. Jorge Álvarez, por los conocimientos, atención y amistad que desde siempre compartió como profesor y como persona.

... Dra. Flavia Loarca, por tu constante apoyo y exigencias, así como los conocimientos y experiencias transmitidas.

... Mtra. Rosario Mejía, por su gran amistad y guía en cada momento de mi carrera, por todos sus invaluable consejos y conocimientos.

...Mtras. Lupita Puga, Leti de la Isla, Concepción García y Cristina Cabrera por que su forma de ser ha sido modelo de continua lucha y superación constante en mi desarrollo profesional.

Dedicatorias:

A ti mamá, por darme la oportunidad de vivir, tu constante apoyo y por todos tus esfuerzos para mi superación.

A ti abuelita, por tu inmenso amor, cuidados y ejemplo de fortaleza.

A toda mi familia, por su apoyo, cuidados y cariño, especialmente a mis tíos Violeta, Graciela, Concepción y Alfonso, por su ayuda desmedida y su gran ejemplo.

A ti Lupita, por que tu gran amistad incondicional, consejos y apoyo, me han permitido superar grandes pruebas como esta.

A la amistad de cada una de las personas que a lo largo de mi vida luchó junto conmigo por un mismo ideal: Mónica, Dania, Sandra, Eduardo, Alejandro, Jesús, Rosario, Cecilia, P. Wenceslao, P. Juan Manuel, Comunidad Jeshua Adonai, Generación '90- Facultad de Química.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de Figuras	i
Índice de Cuadros	ii
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	7
A. COLORANTES	7
B. GARAMBULLO	11
C. BETALAÍNAS	12
1. Composición Química	14
2. Estabilidad	14
3. Aplicaciones	16
D. HELADOS DE CREMA	17
E. EVALUACIÓN SENSORIAL	19
IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
V. OBJETIVOS	23
A. OBJETIVO GENERAL	
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	24
A. MATERIALES	24
1. Material Biológico	
2. Material de Prueba	
B. MÉTODOS	24
1. Extracción del pigmento	24
2. Purificación del pigmento	26
3. Concentración del pigmento	27
4. Estabilidad del pigmento	29
5. Determinación de ph máxima estabilidad del pigmento	31
6. Cálculo y evaluación de tiempos de vida media, constantes de velocidad y energía de activación	34
7. Elaboración de helado a nivel laboratorio	35
8. Evaluación sensorial	35
9. Preparación del helado comercial	36
10. Vida de anaquel	36
11. Análisis estadístico	36

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
A. <i>EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL PIGMENTO</i>	37
B. <i>ESTABILIDAD DEL PIGMENTO</i>	41
C. <i>DETERMINACIÓN DE pH MÁXIMA ESTABILIDAD DEL PIGMENTO</i>	50
D. <i>CÁLCULO Y EVALUACIÓN DE TIEMPOS DE VIDA MEDIA, CONSTANTES DE VELOCIDAD Y ENERGÍA DE ACTIVACIÓN</i>	52
E. <i>ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DEL HELADO A NIVEL LABORATORIO</i>	60
F. <i>PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DEL HELADO COMERCIAL</i>	62
G. <i>VIDA DE ANAQUEL</i>	64
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. Estructuras químicas de a) betacianinas, b) betaxantinas y c) betalaínas	13
2. Extracción del pigmento de garambullo	25
3. Purificación y concentración del pigmento de garambullo	28
4. Estudio efectuado para conocer la estabilidad del pigmento de garambullo	30
5. Parámetros L*, a* y b*. Medidas internacionales de color	32
6. Evaluación de pH de máxima estabilidad del pigmento de garambullo	33
7. Estabilidad del pigmento de garambullo extraído con agua en presencia de diferentes agentes estabilizantes	42
8. Estabilidad del pigmento de garambullo extraído con etanol-HCl 1% en presencia de diferentes agentes estabilizantes	44
9. Estabilidad del pigmento de garambullo extraído con etanol:agua en presencia de diferentes agentes estabilizantes	46
10. Estabilidad del pigmento de garambullo extraído con etanol-HCl 1%:agua en presencia de diferentes agentes estabilizantes	48
11. Efecto del pH sobre betalaínas extraídas con agua del fruto de garambullo	51
12. Efecto de agentes estabilizantes a pH de máxima estabilidad de betalaínas extraídas con agua del fruto de garambullo	53
13. Evaluación sensorial del helado de crema (preparación a nivel laboratorio)	61
14. Evaluación sensorial del helado de crema comercial adicionado de pigmento de garambullo.	63
15. Evaluación sensorial del helado de crema comercial adicionado de pigmento de garambullo después de su almacenamiento (8 días)	65

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
1. Características de colorantes de la gama de los rojos	4
2. Contenido de betalainas extraídas con diferentes solventes del fruto de garambullo	38
3. Constante de velocidad del pigmento de garambullo, adicionado con diferentes agentes estabilizantes	55
4. Efecto de agentes estabilizantes sobre el tiempo de vida media del pigmento de garambullo	56
5. Energía de activación del pigmento de garambullo en presencia de diferentes agentes estabilizantes	59

I. RESUMEN

El fruto de garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) contiene pigmentos rojos púrpura pertenecientes a la familia de las betalaínas, las cuales presentan una mayor estabilidad al compararse con las contenidas en el betabel. Estos pigmentos se han utilizado en alimentos como aditivos, en productos que reciben un proceso limitado de calor, con baja actividad de agua y corta vida de anaquel, principalmente productos lácteos. El objetivo del presente trabajo fue extraer, estabilizar y aplicar el pigmento a un helado de crema sabor fresa, logrando su aceptación por parte del público consumidor.

Se realizaron extracciones del pigmento utilizando diferentes solventes y se evaluó su vida media de anaquel en presencia de diferentes agentes estabilizantes. Cuando se adicionó etanol-HCl 1% se logró extraer la mayor concentración de las betalaínas (0.9%); sin embargo, el pigmento resultó muy inestable ($\Delta E = 14.6$) comparado con la extracción acuosa ($\Delta E = 12.3$). Los resultados mostraron que el pigmento tuvo la mayor estabilidad a pHs de 4.8 y 5.2 a bajas temperaturas, lo cual se comprobó con los tiempos de vida media. Por ejemplo, en el caso de 25°C ésta fue de 11,436.6 min y para 60°C de 83.5 min. En presencia de ácido ascórbico al 0.1% se duplicó la vida de anaquel del pigmento con una energía de activación de 25.78 Kcal/mol en comparación con 22.07 Kcal/mol para el control. Se concluyó que el ácido ascórbico al 0.1% fue el mejor estabilizante de los utilizados en el presente estudio, para el pigmento de *Myrtillocactus geometrizans* en solución acuosa a pH entre 4.8 y 5.2.

Se identificó el colorante presente en un helado comercial sabor fresa, el cual fue utilizado posteriormente para fines comparativos. Se elaboró un helado a

nivel laboratorio al que se le adicionó pigmento de garambullo con estabilizante, para un primer lote, a un segundo lote se adicionó pigmento sin estabilizante y al tercer lote rojo No. 40. A dichos helados se les tomó lectura de los parámetros de color y se evaluaron sensorialmente respecto a color, sabor, olor y aceptabilidad general, por 50 jueces consumidores no entrenados, utilizando una escala hedónica de 10 puntos donde 0 = *disgusta mucho*, 5 = *indiferente* y 10 = *gusta mucho*. La evaluación sensorial también se llevó a cabo después de 8 días de almacenamiento en condiciones de comercialización, bajo los mismos parámetros utilizados anteriormente. Durante la elaboración del helado sabor fresa a nivel laboratorio los valores obtenidos de a^* fueron de 13.89 y 17.52 para los helados que contenían pigmento de garambullo con y sin ácido ascórbico y 29.40 para el que contenía rojo No. 40. En la evaluación sensorial, no existió diferencia significativa en las calificaciones otorgadas para color (6.50, 6.65 y 6.06), olor (7.45, 7.20 y 7.64), sabor (7.63, 7.78 y 8.05) y aceptabilidad general (7.50, 7.45 y 7.40) entre los helados mencionados con anterioridad, respectivamente. En la evaluación aplicada al helado elaborado comercialmente se observó un comportamiento similar al que presentó el helado elaborado a nivel laboratorio para cada calificación otorgada. Sin embargo, para el primero, se observó diferencia estadística significativa entre parámetros de color para el helado adicionado del colorante artificial y el de pigmento de garambullo con ácido ascórbico, comparado con el adicionado solo de pigmento de garambullo siendo 8.5, 9 y 7 los valores promedio asignados por los jueces consumidores respectivamente.

Por los resultados obtenidos, se concluyó que el fruto de garambullo es una fuente potencial de pigmentos naturales para la industria alimentaria, recomendado especialmente para su utilización, en alimentos que no requieren ser sometidos a procesos térmicos altos, como es el caso de productos lácteos (congelados).

II. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los procesos y métodos de conservación causan algunos cambios en la forma y la calidad de los alimentos, lo cual reduce la atracción de dichos productos (*Badui, 1989; Maga y Kim, 1990*). Por esta razón es necesario utilizar aditivos tanto naturales como sintéticos para el mejoramiento de sus características funcionales como sabor, color, textura, apariencia, vida útil, procesamiento, etc. (*Rossetta, 1986*).

En los últimos años se ha observado un aumento en el interés por el empleo de aditivos de origen natural, principalmente en cuanto a colorantes se refiere. Esto se debe a las consecuencias de los efectos toxicológicos adversos que algunos colorantes artificiales han presentado, por lo que algunos de ellos han sido eliminados de la legislación. Se ha restringido un número considerable de colorantes artificiales principalmente de la gama de los rojos (Cuadro 1), debido a que se les ha asociado con la generación de efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Las fuertes restricciones que han sufrido ha llevado a la tecnología a la búsqueda de nuevas alternativas que ofrezcan un menor riesgo en su utilización (*Francis, 1987; Duxbury, 1990*).

La variedad de colorantes naturales es muy amplia, se han identificado fuentes opcionales que permiten obtener pigmentos que logran satisfacer los requerimientos que la industria alimentaria exige. Estos aditivos se derivan de frutas, verduras, raíces, semillas, minerales y otras fuentes, estos han ganado rápidamente su aceptación en el mercado, debido a que ofrecen expandir las opciones de pigmentación. Sin embargo, la limitación en el uso de estos

Cuadro 1. Características de Colorantes de la Gama de los Rojos

COLORANTE	COLOR	ESTABILIDAD				LIMITACIONES
		Calor	Ox-Red	Luz	pH	
Rojo No. 3	Rosa caliente	Buena	Excelente	Pobre	7 - 8	Alto costo No presenta amarillos Permitido su uso sólo en cosméticos
Rojo No. 40	Rojo ladrillo	Deficiente	Deficiente	Buena	3 - 8	No proporciona brillo Costo < Rojo No. 3 No presenta rosas ni morados
Rojo Carmín	Rojo magenta	Excelente	Excelente	Excelente	> 3.5	Alto costo En potencia 2/3 partes < Rojo No. 3
Betabel	Rojo púrpura	Pobre	Pobre	Buena	3 - 7	Sabor característico Triple costo Pobre estabilidad No iguala los rosas del Rojo No. 3

compuestos esta dada por sus costos y a la pobre estabilidad que algunos presentan a las condiciones del medio como actividad de agua, temperatura, pH, presencia de trazas metálicas que en conjunto afectan sensiblemente su funcionalidad (*Rodríguez , 1985*).

Por otra parte el uso de alternativas para el aprovechamiento de recursos no convencionales es importante no solo como una vía para elaborar nuevos productos sino como un elemento de orden económico para zonas marginadas que cuentan con estos recursos de manera natural. En México existe una gran variedad de recursos silvestres susceptibles de ser aprovechados para la producción de alimentos, como es el caso del fruto de garambullo.

Este recurso tiene la ventaja de no requerir unidades e insumos para su desarrollo agrícola. Su producción normalmente es estacional y corresponde a una o dos épocas del año (*Coronado y Vega, 1990*).

Los trabajos que existen sobre el fruto de garambullo son incipientes pero dan una idea de las posibilidades de uso del pigmento contenido en dicho fruto. Las pruebas que hasta ahora se han aplicado proporcionan información científica no existente sobre aspectos químicos, características de estabilidad y riesgos toxicológicos implícitos en la utilización de este pigmento como aditivo colorante. El conocimiento generado por las investigaciones sobre las propiedades del pigmento y los factores que las afectan, así como su inocuidad, son esenciales para su exitosa aplicación en una variedad de productos alimenticios. Este pigmento se clasifica dentro del orden de pigmentos de tipo betalaínico y se han obtenido concentraciones a nivel competitivo con las obtenidas de otras fuentes naturales (214.13 mg de betalaínas/100g) (*Reynoso 1995*).

Es necesaria la investigación y el análisis de los pigmentos extraídos del fruto propuesto, aún más su aplicación en medios complejos principalmente sólidos o integrados de varios componentes. Existen algunos factores que afectan el color o su percepción incluyendo la superficie, el tamaño de partícula, la homogeneización y la distribución del color, el pH, la cantidad y la actividad de agua, la naturaleza de sus constituyentes y sus interacciones.

Hasta ahora la información existente sobre el garambullo es escasa y es conveniente el desarrollo de trabajos de mayor alcance que propongan alternativas tecnológicas para la conservación y uso de este recurso vegetal llegando a mercados de otras regiones (*Coronado y Vega, 1990*). Aunado a esto los resultados obtenidos permitirán ir a la par de la tecnología actual y la demanda a nivel industrial que se exige para esta gama de pigmentos.

III. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Todos los alimentos están constituidos por sustancias cuya interacción determina en gran medida muchas de sus características y propiedades. En la industria se requiere, por lo tanto, la adición de ciertos compuestos químicos o aditivos, que han brindado desde años muy remotos el mejoramiento de las características funcionales de los alimentos. Al ser incorporados con fines tecnológicos y organolépticos, permiten al tecnólogo, tener un mayor control de las variables que intervienen en la producción de alimentos.

La gama existente de aditivos es enorme, pero deben ser reconocidos como seguros para su consumo, entre los mas importantes se encuentran los colorantes, los antioxidantes, los conservadores, los emulsificantes, las vitaminas, los aminoácidos, etc. Existen desde aquellos que mejoran o facilitan un determinado proceso como los antiaglomerantes hasta los que modifican las características sensoriales dentro de los cuales se encuentran a los saborizantes y a los colorantes (Rodríguez, 1990; Badui, 1989).

A. COLORANTES

Los colorantes deben su función a la capacidad de poder absorber una parte de la luz que reciben y reflejar el resto. Debido a que el color es una propiedad de la materia directamente relacionada con el espectro de la luz, puede medirse físicamente en términos de su energía radiante o intensidad y por su longitud de onda. La materia actúa de esta manera cuando contiene en su estructura un grupo de átomos que reciben el nombre de cromóforos, principal unidad estructural de un

colorante. Consiste en un núcleo que tiene átomos unidos por dobles enlaces, atribuyéndose a éstos su poder colorante debido a que las reacciones que originan el desdoblamiento de estas dobles ligaduras, transformarían el 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, por tanto, resulta necesario sumar los efectos de varios cromóforos en una misma molécula para obtener la coloración deseada (*Santos, 1989; Francis, 1989*).

Desde hace varias décadas se ha considerado la existencia del color en la industria alimentaria como un arte, pues de este factor dependerá la apreciación o no del producto a comercializar por parte del cliente y desde luego su preferencia y consumo (*Birren, 1963*).

Un aditivo colorante es cualquier sustancia capaz de ofrecer un tinte o pigmentación para uso en medicamentos, cosméticos o alimentos. Esta sustancia puede ser fabricada por proceso de síntesis o similares, con o sin intermediarios, o extraída, aislada o derivada de diversas fuentes (vegetales, animales, minerales u otras). Los aditivos colorantes que se utilizan en la industria alimentaria se clasifican en certificados (sintéticos) y exentos de certificación. Dentro de estos últimos se encuentran los obtenidos de fuentes naturales y los duplicados sintéticamente de ellos (idénticos al natural). Estos pigmentos están sujetos al mismo escrutinio que se utiliza en los colorantes sintéticos, esto es, la realización de análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos los cuales deben garantizar que no afectarán la salud de los consumidores.

Un pigmento natural es aquel que es sintetizado, acumulado o excretado de células pertenecientes a un sistema biológico. La mayoría de los pigmentos de los

frutos se encuentran en el protoplasma, dentro de los organelos llamados plástidos. En algunos casos, cuando son solubles en agua, se concentran en forma disuelta en las vacuolas de las células. El color distintivo en frutas, vegetales y flores no está dado normalmente por un solo pigmento sino por una combinación o sistema de varios de ellos (*Rosseta, 1986*).

Las principales razones para adicionar aditivos colorantes a alimentos son:

- . Restablecer la apariencia original del alimento.
- . Asegurar la uniformidad en color debido a las variaciones de origen natural en la intensidad de color.
- . Intensificar colores en los alimentos cuando en forma natural estos son muy débiles.
- . Mantener la identidad por el cual los alimentos son reconocidos.
- . Proteger el sabor y vitaminas fotosensibles durante el almacenamiento al impedir la completa absorción de la luz incidente (efecto sol-pantalla).
- . Mejorar o modificar la apariencia del alimento.
- . Actuar como indicativos visuales de la calidad (*Meggos, 1994*).

Los colorantes de la gama de los rojos han sufrido limitaciones para su utilización en alimentos, principalmente debido a sus características de color, estabilidad y restricciones en su uso (Cuadro 1). Esta gama de colorantes se ha visto severamente restringida además debido a su asociación con la generación de cáncer (rojo numero 2 ó amaranto) y problemas hormonales (rojo numero 3, eritrosina) de algunos de ellos (*Diario Oficial de la Federación, 1988; Duxbury, 1990*). Ante la posibilidad de verse disminuidos cada vez más, se han propuesto colorantes obtenidos de fuentes naturales para los cuales las restricciones legales

en cuanto a sus niveles de utilización son mucho menos severas (*Furia, 1990*). En la mayoría de los casos, estos compuestos se encuentran en forma natural en distintos alimentos tradicionales por lo que la seguridad en su uso se ha comprobado a través de los años (*Badui, 1989*). Sin embargo, la utilización de procesos químicos en su obtención y su comportamiento en los diferentes substratos no descarta las pruebas necesarias para asegurar la inocuidad hacia el consumidor (*Furia, 1990*).

Los colorantes, ingredientes únicos e insustituibles en alimentos, presentan diferente fuerza tintorea y composición, más aún los obtenidos de fuentes naturales. La predicción del poder de coloración en la preparación de la formulación en un alimento es difícil tanto como conocer y controlar todos los componentes del pigmento; por lo que es importante maximizar la selectividad del proceso químico de obtención y purificación (*Meggos, 1984*).

Dentro de los pigmentos naturales más importantes encontramos grupos como las antocianinas, los carotenoides, las clorofilas, los flavonoides y las betalaínas; ésta clasificación se da basada en sus características químicas y capacidad de proporcionar una gama específica de colores. Su composición cambia de acuerdo a la variedad de la planta, región y estación. Debido a su naturaleza al ser extraídos, presentan una baja concentración, falta de uniformidad, baja estabilidad a factores como luz, pH, temperatura, actividad acuosa, al igual que índices de contaminación por otros compuestos propios de la fuente. Por todo esto se hace necesaria la búsqueda de diversos métodos más selectos de purificación, extracción y estabilidad de colorantes de origen natural (*Rossetta, 1986*). Es fundamental la investigación de fuentes potencialmente interesante de pigmentos naturales que mejoren las características de estabilidad y que a la vez puedan ser

utilizados como aditivos en la industria alimentaria tal es el caso de el fruto de garambullo *Myrtillocactus geometrizans*.

B. GARAMBULLO

El garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*) pertenece a la familia de las cactáceas; es un grupo de alrededor de 2000 especies, las cuales se ubican en zonas áridas y semiáridas de América del Norte y del Sur (Bravo, 1978; Domínguez, 1995). La planta almacena el agua para su subsistencia de la manera mas eficiente soportando la escasez o abundancia que provoca la lluvia, ya sea por su rápida evaporación o por provocar la erosión en la superficie del suelo con poca penetración a la tierra. Esta especie requiere de una menor cantidad de agua respecto a la mayoría de las cactáceas.

El garambullo produce un fruto comestible de baya redonda de aproximadamente 2 cm de diámetro color púrpura, el cual ha sido muy poco explotado. Una de sus principales limitantes es la corta vida poscosecha de este fruto. En las comunidades productoras se cosecha a mano y se vende en canastas de palma cubiertas con hojas de higuerrilla tratando de evitar el daño por insectos y la contaminación con polvo, basura, etc. Desafortunadamente es necesario consumirlo de uno a dos días después de su cosecha debido a su rápida fermentación; ya que generalmente si se recolecta en la madurez de consumo y es mantenido a temperaturas de 22°C en recipientes cerrados, en menos de seis horas ocurre una rápida fermentación. Cuando el fruto es almacenado en recipientes abiertos, a los dos días se observa invasión fúngica. Por otra parte si se mantiene en congelación (-2°C) al descongelarse se presentan daños físicos y una

disminución del aroma y sabor pero sin afectar la composición de los pigmentos del fruto.

La inexistencia de canales de comercialización y baja capacidad de consumo del fruto fresco por parte de la población, conducen a grandes pérdidas de este recurso. La transformación del mismo, como medio de conservación ocurre en algunas de las comunidades productoras aisladamente. Los frutos se consumen en general, frescos y en algunos lugares se transforman en licores y mermeladas (Coronado y Vega, 1990).

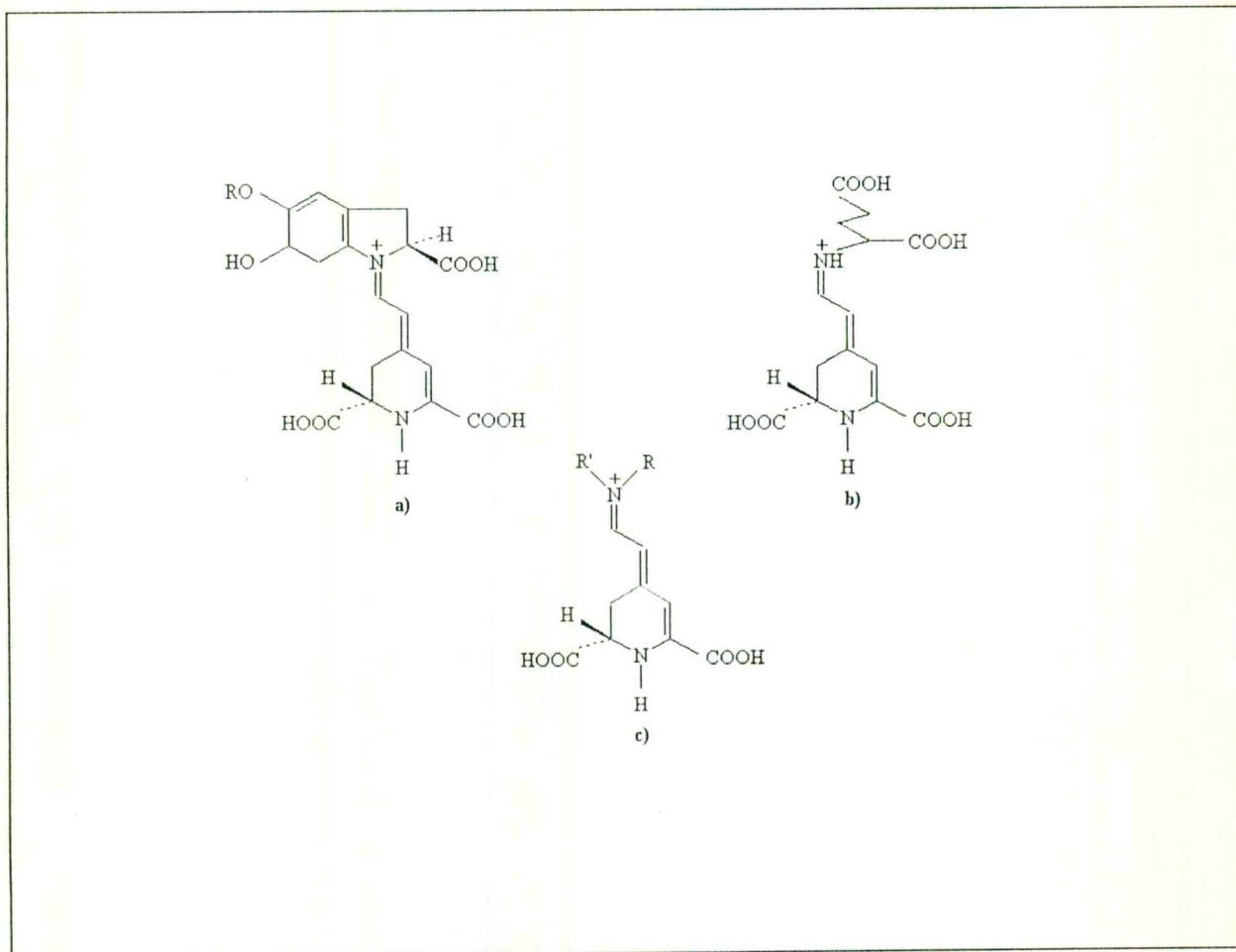
Se han podido caracterizar los pigmentos del fruto de garambullo, los cuales se ubican dentro del grupo de las betalainas (Reynoso, 1995). Al conocer sus propiedades químicas básicas ha sido posible integrar diferentes estudios que han hecho posible mejorar su estabilidad para la óptima utilización de estos compuestos.

C. BETALAÍNAS

Las betalainas pertenecen a los cinco aditivos colorantes de origen natural mas ampliamente utilizados en alimentos, el término se refiere a la mezcla de pigmentos rojos conocidos como betacianinas (Figura 1a) y amarillos llamados betaxantinas (Figura 1b). El contenido de cada uno de ellos varia con respecto a la naturaleza de la fuente (Hendry, 1992; Badui, 1989; Piatelli 1964).

Este grupo de pigmentos se encuentra en 10 familias de Centrosperma, siendo la mas conocida la remolacha roja o betabel (*beta vulgaris*) (Czygan, 1980).

Figura 1. Estructuras químicas de a) betacianinas, b) betaxantinas y c) betalaínas



1. Composición Química

Las betalaínas son aminoácidos con un grupo amino cuaternario, de peso molecular de 400 a 500 que presentan un atractivo color rojo (*Hendry, 1992*) y son solubles en agua. Se conocen unas 70 betalaínas y todas tienen la misma estructura básica (Figura 1c) que se caracteriza por tener el sistema 1,7-diazoheptametino. Su color es atribuible a las estructuras de resonancia y grupos r y r' que extienden o no la conjugación, cuando la sustitución de estos grupos se da por el anillo aromático origina el cromóforo rojo, que es caracterizado como betacianina, por otra parte si la conjugación no se extiende, el componente originado se denomina betaxantina y es de color amarillo (*Piatelli y Minale, 1964; Fennema, 1993*).

2. Estabilidad

Existen una serie de factores físicos y químicos que limitan la aplicación tecnológica de estos compuestos como aditivos colorantes.

Las betalaínas, como muchos otros pigmentos naturales son altamente termolábiles y su velocidad de degradación se incrementa con la temperatura (*Rodríguez, 1985; Walford, 1989*). Su susceptibilidad al calor, oxígeno y altas actividades de agua restringen su uso como colorante en alimentos. Sus aplicaciones están enfocadas a productos que reciben un proceso limitado de calor, con baja actividad de agua y que tengan una corta vida de anaquel (*Maga y Kim, 1990*). Sin embargo es factible el uso de compuestos químicos antioxidantes que brinden mayor estabilidad al pigmento para ser aprovechado favoreciendo la vida útil del mismo y de él en el alimento (*Murai y Wilkins, 1990; Mahoney y Graf, 1986*).

La máxima estabilidad con respecto al pH, como se ha informado para betabel, se encuentra en el intervalo de 4.5 a 7.0., en donde no existe variación de color (*Huang y von Elbe, 1987*). Bajo condiciones ácidas la tonalidad es azul violeta y en condiciones alcalinas, el color llega a ser amarillo oscuro por la pérdida de betanina (*Hendry, 1992*). Para las betalaínas de garambullo se ha informado un intervalo de pH de 3.0 a 7.0, abajo de 3 el color cambia a violeta y por arriba de 7 a una coloración púrpura intenso (*Reynoso, 1995*). En el caso de betabel la velocidad de degradación de sus pigmentos, a diferentes temperaturas, es fuertemente influenciado por la actividad acuosa; altas actividades de agua disminuyen la estabilidad de las betalaínas. Son muy estables en productos deshidratados, sobre todo en alimentos con una actividad de agua menor de 0.5. Con la reducción de este valor de 1.0 a 0.37 unidades (a 75° C) es posible incrementar la vida del producto hasta en un 10% (*Cohen y Saguy, 1983*).

Una de las principales causas de la pérdida del pigmento, parece ser la reacción entre betalaínas y oxígeno molecular (*Attoe y von Elbe, 1985*). Su degradación en presencia de oxígeno puede llegar a ser hasta de un 15% en sólo seis días.

Los antioxidantes que contienen azufre y los compuestos fenólicos no son efectivos en estabilizar a las betalaínas, lo cual indica que el mecanismo de oxidación no involucra una reacción en cadena de radicales libres. Se ha sugerido que dicho mecanismo vía de radicales libres no ocurre durante la pérdida de las betalaínas del garambullo. Se ha demostrado que es mejor utilizar compuestos que eliminan oxígeno del medio como es el caso de los ácidos ascórbico e isoascórbico (*Attoe y von Elbe, 1985*). Sin embargo, existe controversia en la literatura en cuanto

al comportamiento de las betalaínas del betabel en presencia de estos agentes estabilizantes.

La presencia de metales por ejemplo del hierro tiene un efecto sobre el centro electrofílico de las betalaínas del betabel, lo desestabiliza y ocasiona un desarreglo de enlaces y pérdida del poder colorante por destrucción del grupo cromóforo (*Santos, 1989*). Para el garambullo es conveniente la adición de ácido ascórbico a partir de temperaturas de 40°C para mantener la integridad química del pigmento. La presencia de metales actúa como pro-oxidante, por transferir electrones, liberando radicales y formando hidroperóxidos. Se realizaron pruebas con betalaínas de garambullo adicionadas de metales como cromo y hierro encontrando diferencia estadística entre las muestras control y las muestras del pigmento de garambullo con dichos metales a los niveles de 2 mg/L y 15 mg/L respectivamente. Los resultados sugieren que existe un mayor impacto en la velocidad de oxidación del pigmento en presencia de estos metales.

También existe una relación directa de la pérdida de color del pigmento de garambullo en solución al incrementarse la temperatura, no obstante que su energía de activación fue de 20.8 Kcal/mol resultó mas estable que otros colorantes naturales (*Reynoso 1995*).

3. Aplicaciones

Las betalaínas pertenecen a los cinco aditivos colorantes de origen natural mas ampliamente utilizados en alimentos, principalmente en productos lácteos y cárnicos.

Dentro del grupo de alimentos para ser incluidos en la aplicación del pigmento se encuentran helados, confitería, productos cárnicos a base de soya, embutidos, postres, productos lácteos, etc. (*von Elbe et al, 1974 a*).

Las betalaínas también son utilizadas para alimentos tostados, adicionándose después de la extrusión, así como en productos cárnicos con bajo contenido de humedad y que no contengan SO₂ tales como embutidos estilo salami.

La aplicación en helados es una de las más importantes para las betalaínas, en países europeos la mayoría de los helados color rosa contienen betalaínas de betabel, utilizando niveles de 15 a 25 mg/l. El color obtenido depende de la variedad de betabel utilizado y de las condiciones de extracción empleadas (*Hendry, 1992; Dziezak, 1987*).

La industria de alimentos necesita continuar desarrollándose en áreas para el desarrollo de nuevos productos, procesos y sistemas de incorporación de sabores, aromas y colores en alimentos. Sin duda la industria de elaboración de helados en sus diversas aplicaciones debe contar con estos principios, sobre todo al ser productos con un alto nivel de consumo por parte de la población mundial.

D. HELADOS DE CREMA

El helado, tal como se conoce hoy en día, es el resultado de una evolución de cinco siglos que se inició en Europa. A principios del siglo XX, las fábricas de helados en los Estados Unidos utilizaban todavía congeladores a base de hielo y

sal. Hoy en día los congeladores continuos de cilindros múltiples producen mas de 4000 litros de helado congelado uniformemente por hora.

En la fabricación del helado y productos análogos se emplean ingredientes lácteos diversos. La composición del helado es a base de grasa de leche (grasa butírica) y sólidos de leche no grasos derivados de ingredientes como azúcar, estabilizador, emulsionante, materiales saborizantes, colorantes, agua y aire.

La combinación de estos componentes, antes de la incorporación de aire y de la congelación, se conoce como la base para helado. Su composición puede variar en cuanto al contenido de grasa, sólidos de leche no grasos y total de sólidos, de acuerdo con las necesidades del mercado.

El helado se define como una espuma en que se presentan celdas de aire que constituyen el aumento de volumen, las películas de mezcla de los ingredientes mencionados anteriormente rodean las celdas de aire. Dentro de las películas se encuentran, glóbulos de grasa solidificados dispersos, cristales de hielo, azúcares, sales, proteínas y otros componentes de la base, algunos insolubles otros disueltos (*Potter, 1990*).

Es necesario el empleo de colorantes en la fabricación de helados de crema, debido a la importancia de mantener la calidad y presentación de un producto, específicamente los elaborados con bases de frutas, ya que los pigmentos provenientes de éstas varían con la estación y variedad, además de ser muy débiles e inestables.

La evaluación de las propiedades organolépticas de los productos fabricados, tiene gran importancia comercial para la industria alimentaria. Es necesario asegurar niveles de calidad y frecuentemente desarrollan nuevos productos que correspondan a los gustos del consumidor. Por lo anterior cuando se introduce al mercado un producto cuya formulación incluye un aditivo nuevo o diferente es necesario llevar a cabo evaluaciones sensoriales.

E. EVALUACIÓN SENSORIAL

Esta ciencia utiliza los sentidos humanos para medir las características particulares de un alimento o ingrediente como son sabor, color, olor, textura, apariencia, etc. La evaluación sensorial se utiliza principalmente para revisar los efectos de nuevos ingredientes o formulaciones, así como nuevos procesos, e incluso el monitoreo de los efectos del almacenamiento sobre determinados productos. El desarrollo de una evaluación sensorial debe considerar diversos aspectos técnicos específicos ya que contempla la utilización de factores físicos, psicológicos y respuestas a estímulos que nos brindaran sus respuestas de acuerdo a los términos de descripción que se utilicen. La aplicación de las medidas sensoriales puede incluir desde detectar fallas en la línea de producción hasta estudios complejos sobre la respuesta de una sola fibra nerviosa ante un estímulo químico.

Es importante tener el control del proceso y las variables que participan para lograr confiabilidad y reproducibilidad. Por el amplio campo de aplicación que este análisis tiene, se requiere definir el objetivo de estudio y así seleccionar los métodos apropiados para lograr la información deseada, de igual forma deben

efectuarse los análisis sensoriales de una manera científica con tanto cuidado como si se tratara de un análisis químico.

En general, se puede clasificar dichos métodos en dos grupos: Métodos Analíticos y Métodos Afectivos. Los primeros a su vez incluyen métodos sensitivos (umbral y diferenciación) cuantitativos (gradiente y duración) y cualitativos (análisis descriptivos). Para los de carácter afectivo se consideran las pruebas de aceptación, preferencia y nivel de agrado.

En los métodos de tipo analítico deberá contarse con jueces entrenados ampliamente en las áreas de evaluación específicas, el número necesario de ellos será mínimo (máximo de 10 a 15 personas), deberán cumplir con las exigencias y requisitos propios a las reglas establecidas para ellos. Por el contrario para los métodos de carácter afectivo el único requisito que los jueces deberán cumplir es que sean consumidores potenciales o habituales del producto a evaluar. Desde luego no se descartan las reglas propias que se establecen para llevar a cabo dichas evaluaciones como pudieran ser el lugar de prueba, el material de enjuague, la preparación y la presentación de las muestras, las hojas de respuestas, los parámetros a evaluar, la afinidad con la muestra, etc. El número de jueces necesario para este tipo de evaluaciones requerirá al menos de 50 jueces consumidores para que los resultados sean satisfactorios y confiables; a efecto de extrapolar hacia la población de interés previamente definida.

Sin duda alguna para la evaluación sensorial de nuevos productos o ingredientes la prueba que indica el nivel de agrado o desagrado que provoca una muestra específica nos brindará resultados apropiados al objetivo del estudio.

Para la aplicación de esta prueba, también llamada de tipo hedónico, se utiliza una escala en la que se puntualiza la característica de agrado. Esta escala debe contar con un indicador del punto medio a fin de facilitar al juez consumidor la localización del punto de su preferencia a la muestra.

La presentación de las muestras deberá ser como el consumidor confrontaría el producto en estudio habitualmente.

Para los resultados obtenidos es recomendable el tratamiento vía análisis de varianza. Esta técnica estadística permitirá conocer si existen diferencias significativas entre la media de las calificaciones asignadas a mas de dos muestras y con esto indicando el comportamiento propio de los datos obtenidos de un experimento, lo que se conoce como similitud entre muestras (*Pedrero, 1992*).

Existen una serie de factores que limitan la aplicación tecnológica de pigmentos de origen natural como aditivos colorantes en una amplia variedad de alimentos. El fruto de garambullo, objeto de este estudio presenta características que le permiten ser objeto de nuestro estudio.

IV. HIPÓTESIS

El pigmento del fruto de garambullo presenta características que permiten darle una mayor estabilidad así como una tonalidad apropiada para ser incorporado en helados, dicho producto puede ser competitivo con productos comerciales y aceptado por el consumidor.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Extraer, estabilizar e incorporar el pigmento del fruto de garambullo a un producto lácteo (helado de crema), logrando la aceptación por parte del consumidor.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- . Extraer el pigmento del fruto de garambullo mediante el uso de diferentes soluciones.
- . Efectuar pruebas de vida de anaquel del pigmento, con la adición de agentes estabilizantes.
- . Determinar el pH de máxima estabilidad del pigmento.
- . Calcular y evaluar el tiempo de vida media, las constantes de velocidad de degradación y la energía de activación del pigmento de garambullo en presencia de diferentes agentes estabilizantes.
- . Elaborar un helado a nivel laboratorio y determinar la concentración del pigmento de garambullo ha ser aplicado comparándolo con un helado comercial adicionado de colorante sintético (rojo numero 40).
- . Realizar evaluaciones sensoriales del helado adicionado con el pigmento de garambullo y con el colorante artificial.
- . Incorporar el pigmento de garambullo a un helado de elaboración comercial realizando las evaluaciones sensoriales correspondientes.
- . Efectuar pruebas de vida de anaquel del helado en estudio y del comercial adicionados con pigmento de garambullo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Material Biológico

Levadura (*Saccharomyces Cerevisiae*).

2. Material de Prueba

Pigmento del Fruto de Garambullo (*Myrtillocactus Geometrizans*).

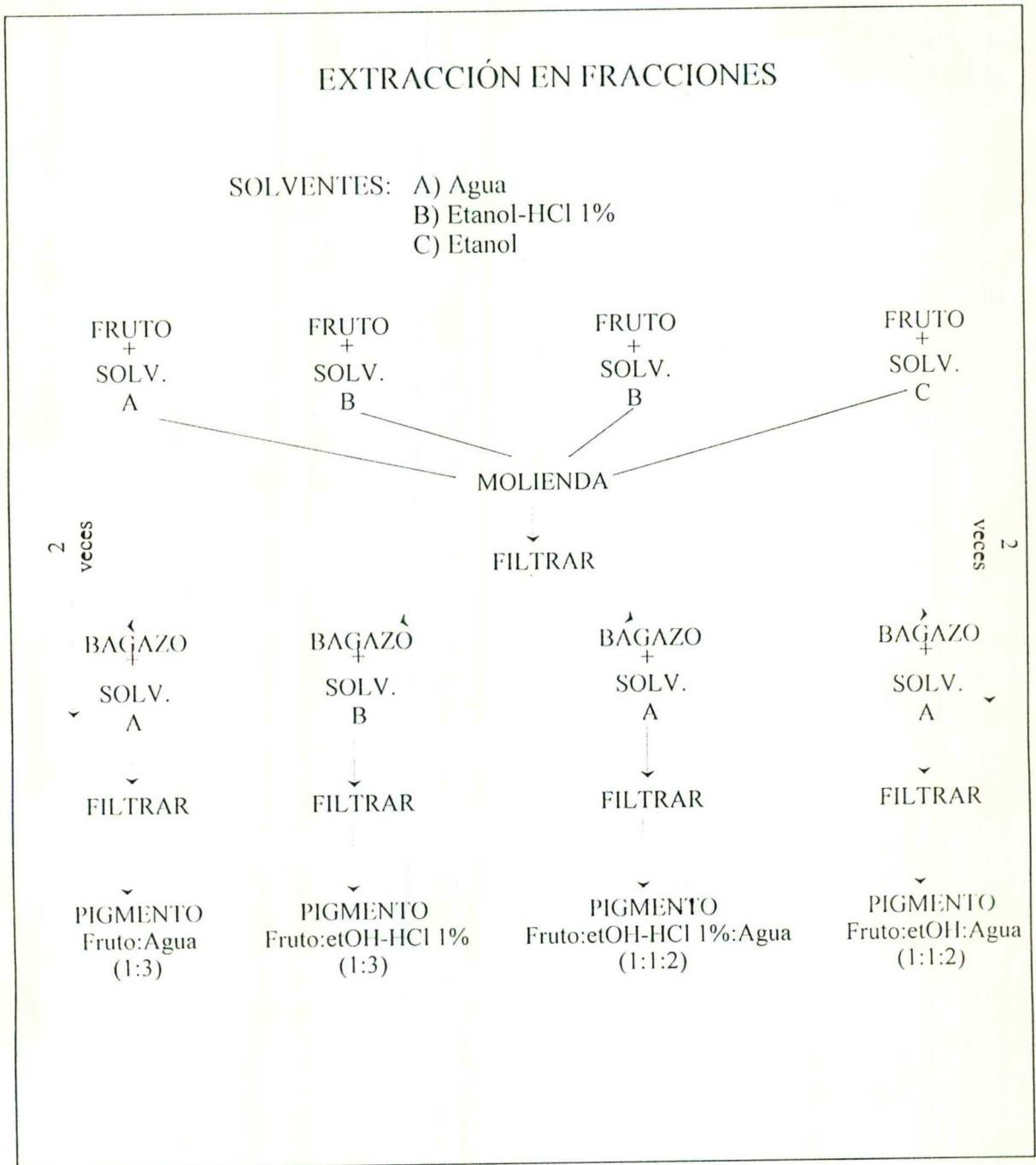
El fruto fue recolectado en los meses de Julio y Agosto de 1995 en la Ciudad de Querétaro, se almacenó a temperatura de -15°C en bolsas de polietileno negro; se mantuvo en estas condiciones previo a su análisis. Se descongeló a temperatura ambiente al momento de efectuar los estudios de extracción.

B. MÉTODOS

1. Extracción del pigmento

Se pesaron 200 g de fruto a los cuales se adicionó una fracción de 200 ml del solvente correspondiente (Figura 2), el total adicionado fue de 600 ml de la solución extractora. Se llevó a cabo la molienda de esta mezcla, en un recipiente de vidrio, lográndose la interacción completa entre los componentes presentes, se separó mediante filtración la parte líquida del bagazo. La parte obtenida de bagazo fue mezclada con una segunda parte del solvente correspondiente (200 ml), repitiéndose el proceso anterior separando el bagazo del líquido por filtración y .

Figura 2. Extracción del pigmento de garambullo



agregándose, por última vez, la tercera fracción correspondiente sobre el bagazo residual obtenido. Se utilizaron tres solventes, de los cuales se obtuvieron cuatro diferentes soluciones extractoras [agua, etanol-HCl 1%, etanol:agua, etanol-HCl 1% :agua]; para obtener el pigmento con agua, se utilizaron tres fracciones de 200 ml de este solvente, de igual forma se trabajó con etanol acidificado (HCl 1%).

En el siguiente caso (etanol:agua 1:2) se utilizó una primera fracción de etanol y las otras dos fracciones restantes fueron agua, siendo el mismo procedimiento para la última solución utilizada (etanol-HCl 1% :agua 1:2) una primera fracción de 200 ml de etanol acidificado y las dos fracciones restantes de agua.

Al mezclar las tres fracciones líquidas obtenidas de cada operación para cada solvente se obtuvo el pigmento en solución correspondiente (Figura 2).

2. Purificación del pigmento

Obtenido el pigmento en las diferentes soluciones se procedió a llevar a cabo la fermentación. Para ello se utilizó 0.66% de levadura *Saccharomyces cerevisiae* activada en un jugo preparado con la molienda de fruto en agua, cuyo volumen equivalía a una quinta parte del total del pigmento en solución a fermentar. Dicha fermentación se llevó a cabo en recipientes cerrados, por 3 horas a 37°C en baño María con agitación constante.

Los diferentes productos se centrifugaron a 4500 r.p.m. durante un tiempo de 15 min. para eliminar el material biológico y bagazo de cada uno de ellos,

obteniéndose líquidos claros con el pigmento de las diferentes soluciones extractoras (Figura 3).

3. Concentración del pigmento

Cada mezcla obtenida fue sometida a evaporación al vacío a 40°C en un rotaevaporador con capacidad de 1 lt, hasta obtener un volumen de 1/10 parte del total en volumen (Figura 3).

Se determinó el porcentaje de color total obtenido como betanina presente en este concentrado, utilizando el procedimiento indicado de acuerdo al Diario Oficial de la Federación como a continuación se indica.

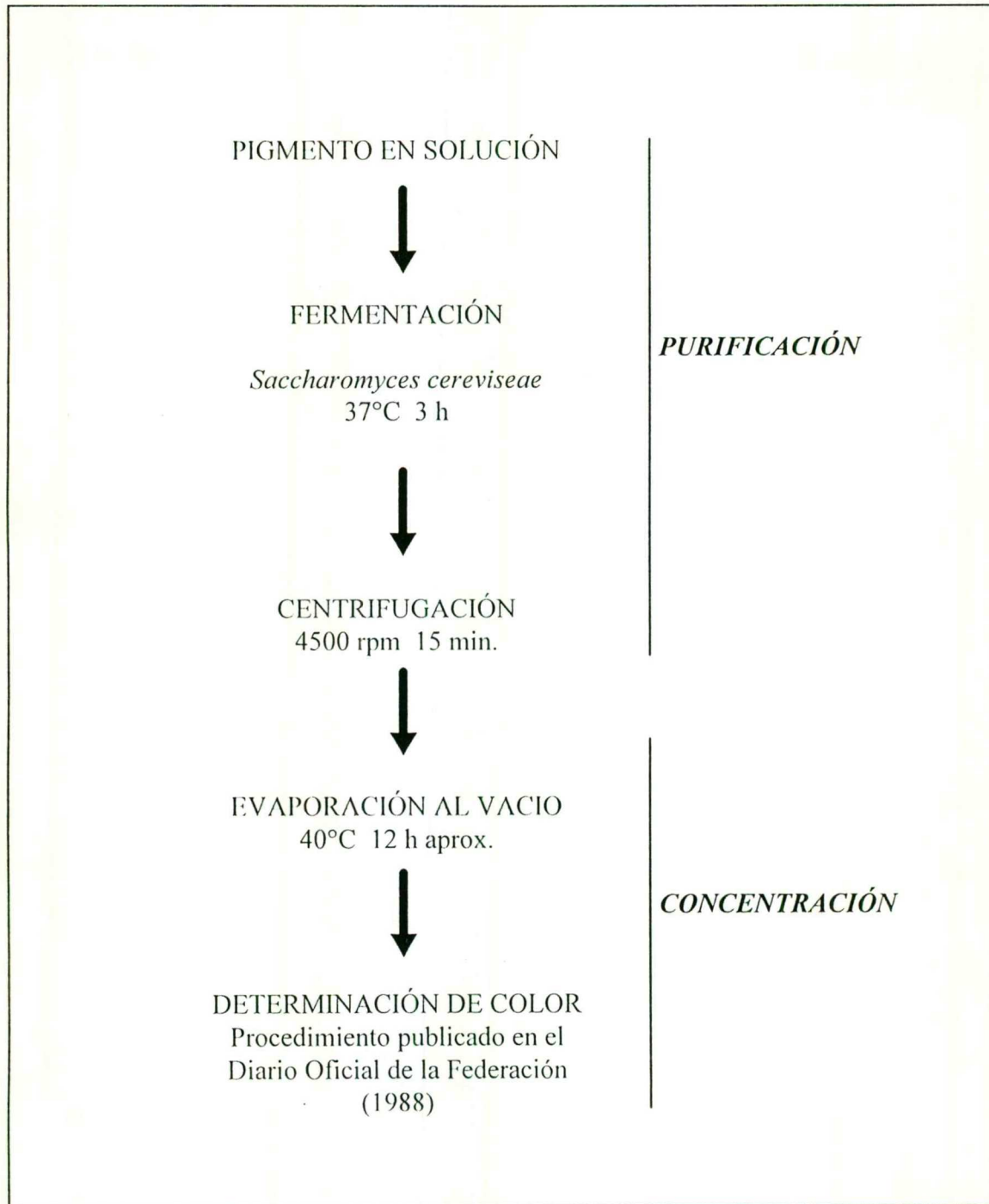
Se disolvió una cantidad pesada correctamente en una solución reguladora y se diluyó a un volumen conveniente con esta misma solución (V total en ml), la absorción máxima puede ser en el intervalo de 0.2 a 0.8.

Se centrifugó la solución, cuando así lo requirió y se midió la absorción corrigiendo con un blanco compuesto por la solución reguladora de pH=5. El contenido de color se calculó en bases a la máxima absorción A (a 530 nm) usando la absorbancia específica para betanina.

A 1% = 1120 (1cm)

$$\% \text{ Color rojo C} = [A * V / (1120 * L * W)] * 100$$

Figura 3. Purificación y concentración del pigmento de garambullo



En donde:

A= Absorción máxima

V= Volumen de solución probada en ml

L = Longitud de la celda en cm

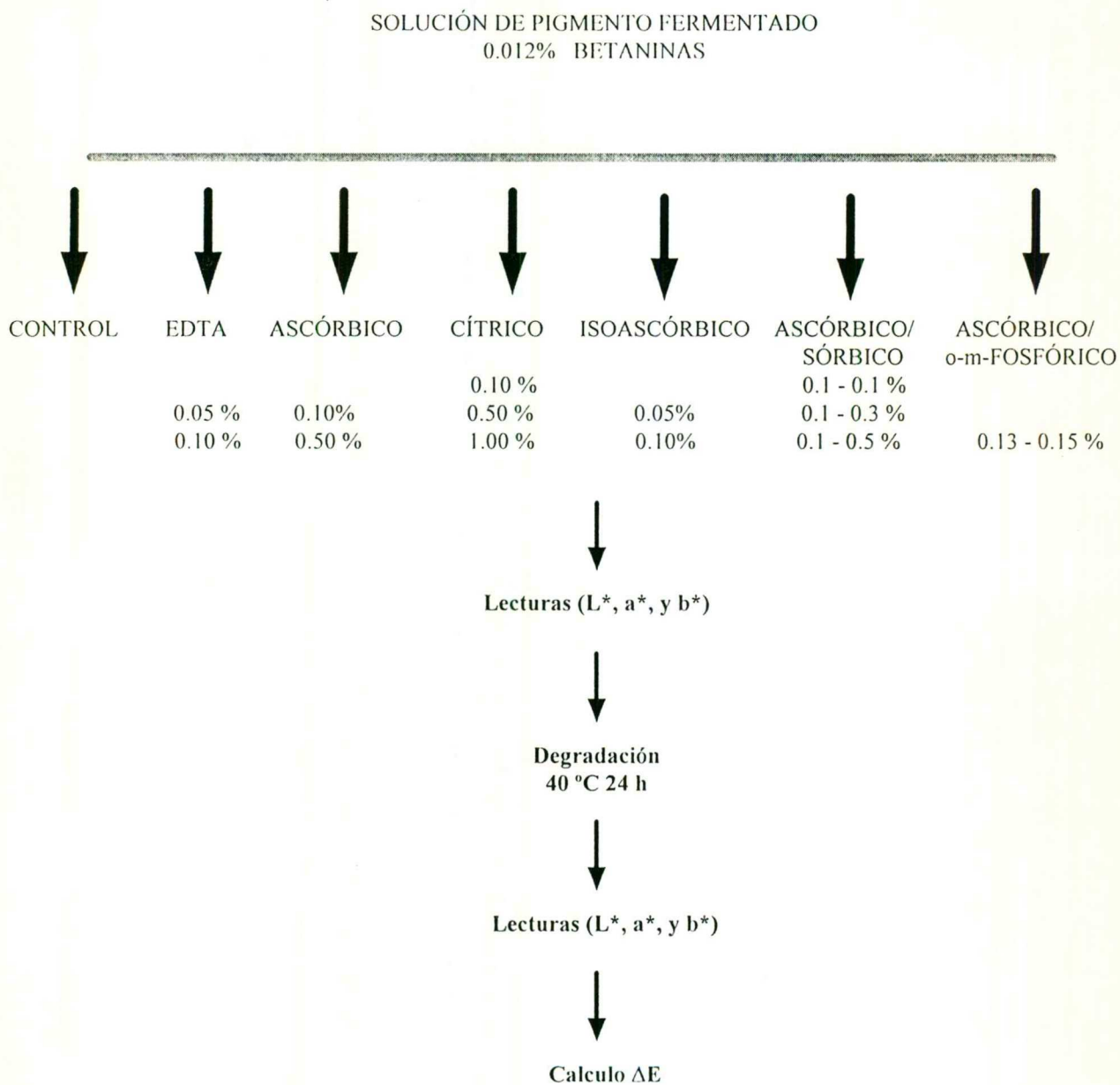
W= Peso de la muestra en gramos

4. Estabilidad del pigmento

Una vez fermentado el jugo en agua, etanol-HCl 1%, etanol:agua (1:2), etanol-HCl 1% :agua (1:2) se prepararon soluciones de prueba a una concentración de 0.012% de betaninas. Se trabajó cada solución por triplicado, en tubos de ensaye con tapón de rosca, a los cuales se les adicionó 10 ml de cada solución, así como los diferentes agentes estabilizantes de prueba a las concentraciones seleccionadas siguiendo la ruta que se muestra en la figura 4, se tuvo un control negativo, el cual consistió en el pigmento en solución sin ningún agente estabilizante.

A cada tubo se le tomaron lecturas en un colorímetro Hunter.Lab D 259 de los parámetros L^* , a^* y b^* , medidas internacionales de color. El empleo de los parámetros L^* , a^* y b^* se denomina prueba de triestímulo colorimétrico. Las coordenadas pueden ser medidas directamente por reflexión de una muestra opaca o por transmisión a través de una muestra transparente. Estos valores fueron utilizados para el cálculo de Delta E el cual nos brinda un parámetro de la pérdida de color que sufren dichas soluciones, a mayores valores de Delta E significa una degradación mayor del pigmento, valores menores comparativamente, son indicios

Figura 4. Estudio efectuado para conocer la estabilidad del pigmento de garmbullo



de la estabilidad del pigmento, y por lo tanto una protección por parte de los agentes estabilizantes.

De acuerdo a la combinación de ellas fue posible ubicar la tonalidad, matiz y luminosidad de cada una de las muestras que se analizaron (Figura 5). Dichas lecturas evalúan en conjunto la diferencia neta de color de la muestra teniendo como referencia el control. Estas soluciones se sometieron a temperatura de 40°C por 24 horas, en baño maría; al término de este tiempo, se tomaron nuevamente lecturas de L*, a* y b* en el colorímetro antes mencionado, para observar la degradación o protección del pigmento y a partir de ellos se calculó la diferencia neta de color Delta E de acuerdo con la ecuación:

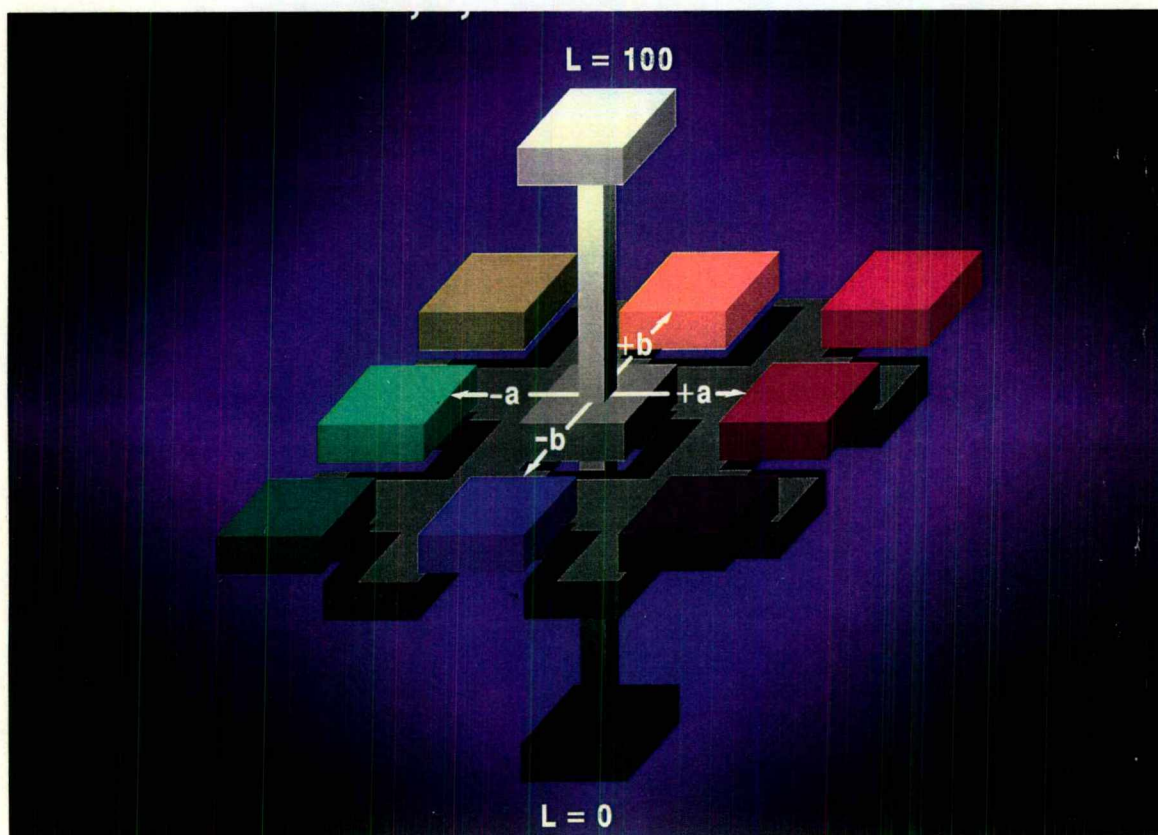
$$\text{Delta E} = [(L^*f - L^*i)^2 + (a^*f - a^*i)^2 + (b^*f - b^*i)^2]^{1/2}$$

en donde *f* = lectura final de cada tratamiento e *i* = lectura inicial de cada tratamiento (Francis, 1989; Berset, 1995).

5. Determinación de pH de máxima estabilidad del pigmento

A una solución del pigmento (0.012 % betaninas) extraído con agua y fermentado, se le modificó el pH a valores de 4.0, 4.4, 4.8, 5.2, 5.6 y 6.0 con ácido clorhídrico (0.25N) y con hidróxido de sodio al 2% según correspondiera. Se trabajaron estas 6 soluciones en tubos de ensaye con tapón de rosca, por triplicado, conteniendo 10 ml cada uno de las correspondientes soluciones modificadas. Las lecturas de L*, a* y b*, se tomaron para cada tubo en un colorímetro Minolta CM 2002, anteriores y posteriores a una degradación de 40°C por 24 horas (Figura 6).

Figura 5. L^* , a^* y b^* , medidas internacionales de color



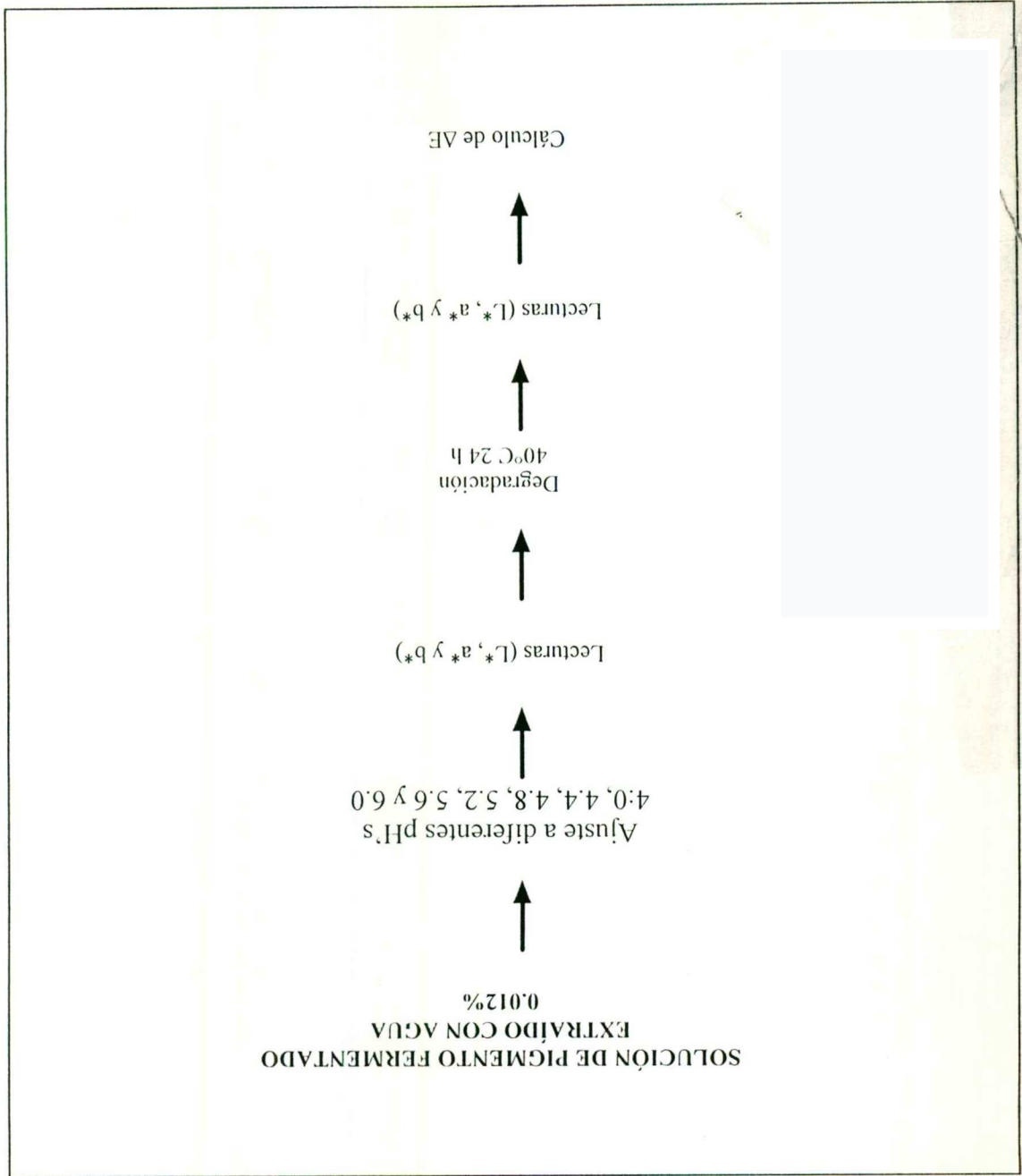


Figura 6. Evaluación del pH de máxima estabilidad del pigmento de garambullo

Se determinó la diferencia neta de color (Delta E) mediante la ecuación anteriormente mencionada, después del análisis respectivo.

6. Cálculo y evaluación de tiempos de vida media, constantes de velocidad y energía de activación

Se trabajó con una solución de prueba con concentración de 0.012% en betalaínas extraídas con agua, se trabajó con una serie de tubos de ensaye por triplicado, en los que se colocaron 10 ml de esta solución a cada uno; se le adicionaron agentes estabilizantes ácido ascórbico 0.1 y 0.5%, ácido cítrico al 1%, ácido isoascórbico en 0.1% y la mezcla de ácido ascórbico - sórbico 0.1- 0.1 %.

A estas soluciones se les modificó el pH a un valor de 4.8, y fue evaluada su estabilidad bajo diferentes temperaturas y tiempos. Se colocó cada tubo dentro de un baño maría al azar, a las temperaturas y tiempos de estudio, 4°C y 25°C (5 días), 40°C (60 horas), 60°C (5 horas), 80°C (2 horas) y 100 °C (30 minutos). Por intervalos predeterminados para cada uno de los diferentes tiempos mencionados se tomaron las diferentes lecturas de L*, a* y b* en un colorímetro Minolta CM 2002. Se calculó el cambio de color en base al porcentaje de pigmento remanente después del tratamiento térmico.

Pigmento remanente (%) = (mg de betanina al tiempo X / mg de betanina al tiempo cero)x100

Los porcentajes de 15 valores diferentes se graficaron en una escala semilogarítmica con respecto al tiempo y la pendiente de la línea se multiplicó por -2.303 para obtener la constante de velocidad (k) la cual se utilizó para calcular el

tiempo de vida media ($T_{1/2}$) del pigmento como: $T_{1/2} = 0.693 / k$ (von Elbe et al, 1974 b).

7. Elaboración de helado a nivel laboratorio

Se procedió a la mezcla de los siguientes ingredientes: Sólidos de leche, sacarosa, crema, lecitina, goma, fruta en mermelada. Se sometieron a cocimiento por 15 min. a fuego lento y sin dejar de agitar hasta la disolución total de todos los ingredientes. La mezcla obtenida se retiró del fuego y se esperó a que disminuyera su temperatura aproximadamente 20°C, para poder ser sometida a un enfriamiento a 4°C por 30 min., posteriormente se realizó el batido en una nevera pequeña de capacidad aproximada de 2.5 l de mezcla, por 30 min. En esta última fase se probaron diferentes concentraciones de pigmento de garambullo, comparando con un colorante artificial: Rojo #40.

8. Evaluación sensorial

Se realizó una evaluación de cada uno de los diferentes helados elaborados (nivel laboratorio, comercial y en almacenamiento) correspondiendo un análisis sensorial de tipo hedónico con 50 jueces no entrenados en donde se evaluaron: sabor, olor, color y aceptabilidad general, tomando en cuenta las características propias de este análisis. Se utilizó una escala de calificación de 0 a 10 en las que se designó cada valor de la siguiente forma:

0 equivalente a *Me disgusta*,

5 equivalente a *Me es Indiferente* y

10 equivalente a *Me gusta*.

9. Preparación del helado comercial

Una casa comercial productora de helados, mezcló su base de helado con el pigmento de garambullo, de acuerdo a su proceso de elaboración. Antes del batido y congelado se adicionó el pigmento de garambullo hasta igualar la coloración que ellos dan a su producto con el colorante artificial. Se procedió a la evaluación sensorial como se describió en el punto 8.

10. Vida de anaquel

Los helados que fueron elaborados a nivel comercial se sometieron a almacenamiento durante 7 días bajo las condiciones de comercialización, a temperatura de 4°C en congelador de puertas corredizas superiores y posteriormente fueron evaluados sensorialmente en cuanto a características de color, olor sabor y aceptabilidad general.

11. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza de una sola vía y se compararon las medias mediante la prueba de rango múltiple LSD a un nivel de significancia del 5%. Se efectuó en algunos estudios un análisis de regresión lineal. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL PIGMENTO DE GARAMBULLO

Para la obtención del pigmento del fruto de garambullo se trabajó con 4 soluciones extractoras diferentes, obteniéndose con etanol-HCl 1% 0.95 mg de betaninas/100g, con etanol-agua (1:2) 0.92, etanol HCl 1%:agua (1:2) 0.79, y agua 0.60 (Cuadro 2). El empleo de este método incrementó la cantidad de pigmento que se había obtenido en un estudio anteriormente realizado por Reynoso, quien en 1995 extrajo el pigmento de garambullo con agua en relación 1:3 respecto al fruto recuperando 0.23 mg de betaninas/100g.

En el presente estudio se utilizó la misma cantidad de fruto-solvente pero ahora con este último fraccionado, se triplicó la concentración de betalaínas (0.60) extraídas con agua, por lo que para esta extracción se logra mejorar el método antes reportado, el incremento de la concentración de pigmento se sugiere sea debido al efecto del área de superficie en contacto con la solución extractora así como el tiempo de molienda. Dichos resultados también se confirmaron al observar el bagazo resultante al final de esta operación ya que presentó ausencia completa de color rojo violeta característico de este pigmento.

En el caso de las extracciones que contenían etanol las tres fracciones obtenidas mostraron un cambio en la coloración del pigmento hacia tonos azul-violaceos, resultando tonalidades mas intensas para el caso de etanol acidificado. También brindaron el mayor rendimiento en términos de concentración de

Cuadro 2. Contenido de betalaínas del fruto de garambullo extraídas con diferentes solventes

Solventes	Betalaínas (mg/100g)	
	X	ó
Etanol HCl 1%	0.95 ±	0.01 a
Etanol : agua (1:2)	0.92 ±	0.01 a
Etanol HCl 1% : agua (1:2)	0.79 ±	0.04 b
Agua	0.60 ±	0.05 c

a,b y c significan diferencia estadística (p<0.05)

betalaínas en comparación con las otras mezclas utilizadas, como se pudo observar con el análisis estadístico incluido en el Cuadro 2. El efecto deshidratante del etanol permitió una mejor extracción del pigmento (0.95%) el cual se encuentra en las vacuolas de las células del fruto, facilitando la expulsión misma del colorante.

El resultado de las coloraciones obtenidas para esta extracción es resultado de la acidez que esta solución confiere al pigmento. Cuando se procedió a su concentración se obtuvo un material viscoso muy difícil de manejar, así como un sabor desagradable.

Ontiveros en 1988 realizó pruebas de extracción con etanol, además de otros solventes orgánicos como benceno, cloroformo y éter etílico. Para estos últimos se observó una separación de fases debido a que el pigmento fue insoluble en ellos en el caso de etanol se obtuvo una buena solubilidad, pero con una variación en la tonalidad. Cuando se extrajo con agua a temperaturas de 90°C se logró una mayor eficiencia en la extracción pero se formaron sabores y aromas indeseables en el pigmento obtenido.

Reynoso en 1995 trabajó con solventes como agua, etanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo, éter de petróleo, hexano y ciclohexano, entre mayor fue la constante dieléctrica mayor la polaridad de ellos, siendo decisiva en la extracción de betalaínas. Eligiéndose a el agua en relación 1:3 con respecto al fruto la solución extractora por excelencia.

Para todas las extracciones en las cuales se utilizó etanol como es el caso de etanol HCl 1%, etanol HCl 1%:agua (1:2) y etanol:agua (1:2) se observan concentraciones mayores que la obtenida con agua. De igual forma que sucede para

la extracción de etanol acidificado para estas 2 extracciones que incluyen etanol al ser concentrado el pigmento se desarrollaron sabores y olores desagradables.

Se consideró adecuado el uso de la fermentación como un método de purificación, debido a que redujó el contenido de azúcares totales del pigmento extraído. Para cada uno de los extractos obtenidos decidió utilizarse la levadura *saccharomyces cerevisiae* cuya especie presenta cepas con características muy diversas las cuales se adaptan a diferentes usos, por lo que industrialmente tiene un gran valor (Frazier, 1976).

La reducción de azúcares fue comprobado en pruebas preliminares, al comparar los resultados en términos de concentración de betalaínas del pigmento extraído con agua antes y después de la fermentación, los cuales fueron 0.6% y 0.72% respectivamente, observándose un 20% de incremento en la concentración por efecto de la disminución de dichos compuestos en el pigmento. En el caso de las extracciones que involucran la presencia de etanol en solución no se observa efecto en la disminución de la concentración de betalaínas para ninguno de los tres casos estudiados.

Para la purificación de betalaínas se han utilizado microorganismos como el hongo *aspergillus niger* y las levaduras *candida utilis*, *saccharomuyces oviformis* y *saccharomyces cerevisiae* (Drdak, 1992), su principal función es la reducción de azúcares disponibles en el sustrato, ya que dichos carbohidratos son preferidos en general por los microorganismos a cualquier otra fuente de energía. Ya que es bien conocido que los di, tri, o polisacaridos suelen ser hidrolizados a azúcares sencillos antes de su utilización. Un monosacárido, como la glucosa puede sufrir una descomposición anaerobia , que en el caso de acción por levaduras daría origen a

una fermentación de tipo alcohólica, originando como productos principales etanol y dióxido de carbono. Las levaduras suelen desarrollarse en toda la masa líquida y su crecimiento se ve favorecido por un pH ácido próximo a 4-5.

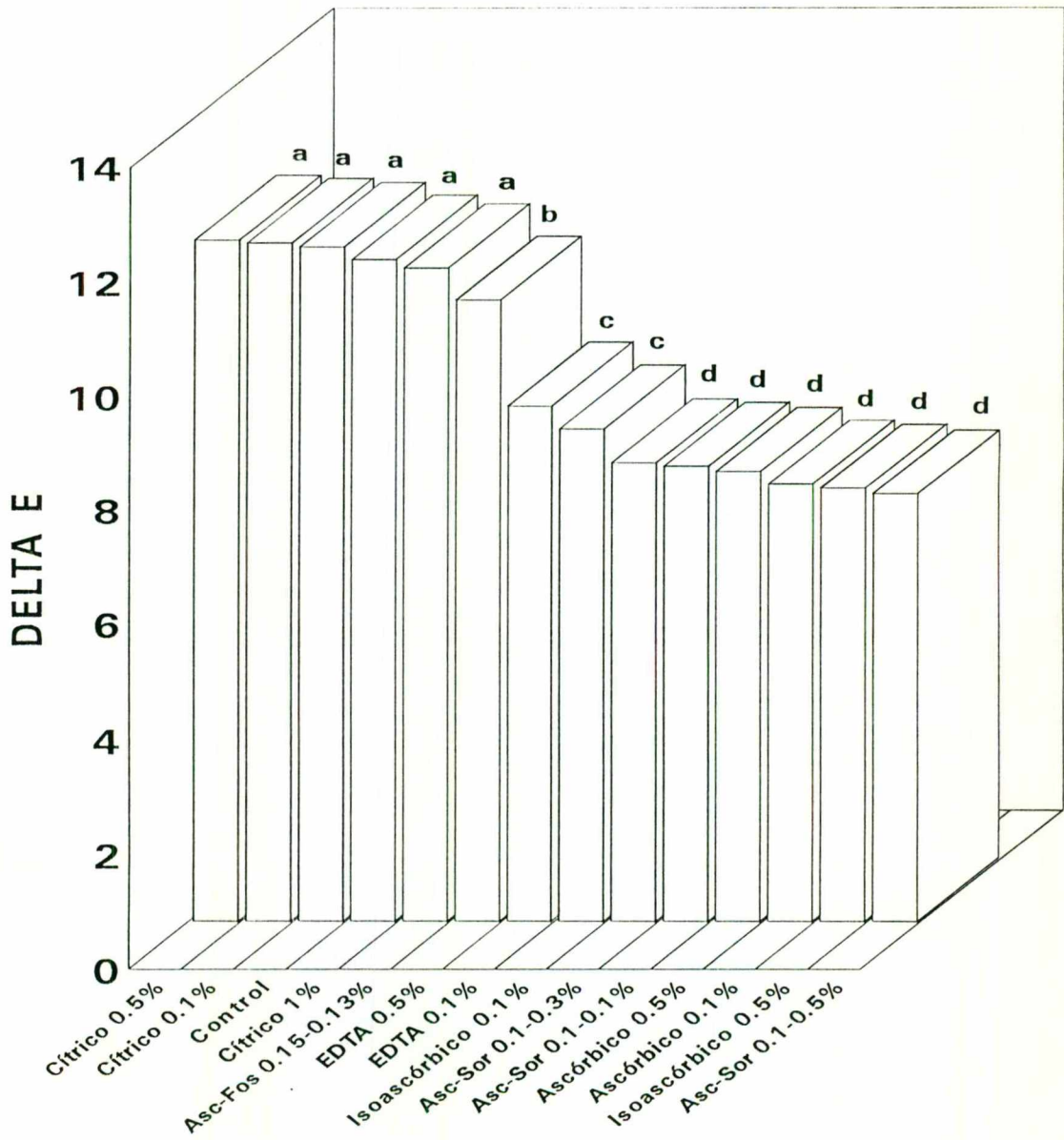
Una de las dificultades que presenta el trabajar con carbohidratos lo manifiesta su tendencia a formar jarabes al concentrarse, y la dificultad que presentan para manejarse en el laboratorio (*Morrison y Boyd, 1990*).

En el área de métodos de purificación otros autores han extraído las betalínas de flores y frutos por medio de una extracción acuosa seguida de una purificación por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en columna, ultrafiltración y ósmosis inversa. Estos métodos presentan la ventaja de eliminar compuestos que puedan llegar a deteriorar el producto, como azúcares, proteínas, iones metálicos, etc. Sin embargo, el costo de producción llega a incrementarse de manera significativa (*Rodríguez, 1985*). Por todo lo mencionado el método de fermentación resulta una alternativa de purificación de éste pigmento y ofrece un costo muy por abajo de los mencionados, además de un proceso accesible y con buen rendimiento.

B. ESTABILIDAD DEL PIGMENTO

En la figura 7 se presenta la gráfica que nos muestra los valores de Delta E obtenidos para el pigmento extraído con agua y adicionado con diferentes agentes estabilizantes después de haber sido sometido a temperatura de 40°C durante 24 hrs. Los que brindaron la mayor protección al pigmento de garmbullo fueron el ácido ascórbico, a concentraciones de 0.1 y 0.5%, la mezcla de éste con ácido sórbico (0.1-0.1 0.1-0.3 y 0.1-0.5%) así como el isoascórbico (0.5%), no existiendo

Figura 7. Estabilidad del pigmento de garmbullo extraído con agua en presencia de diferentes agentes estabilizantes



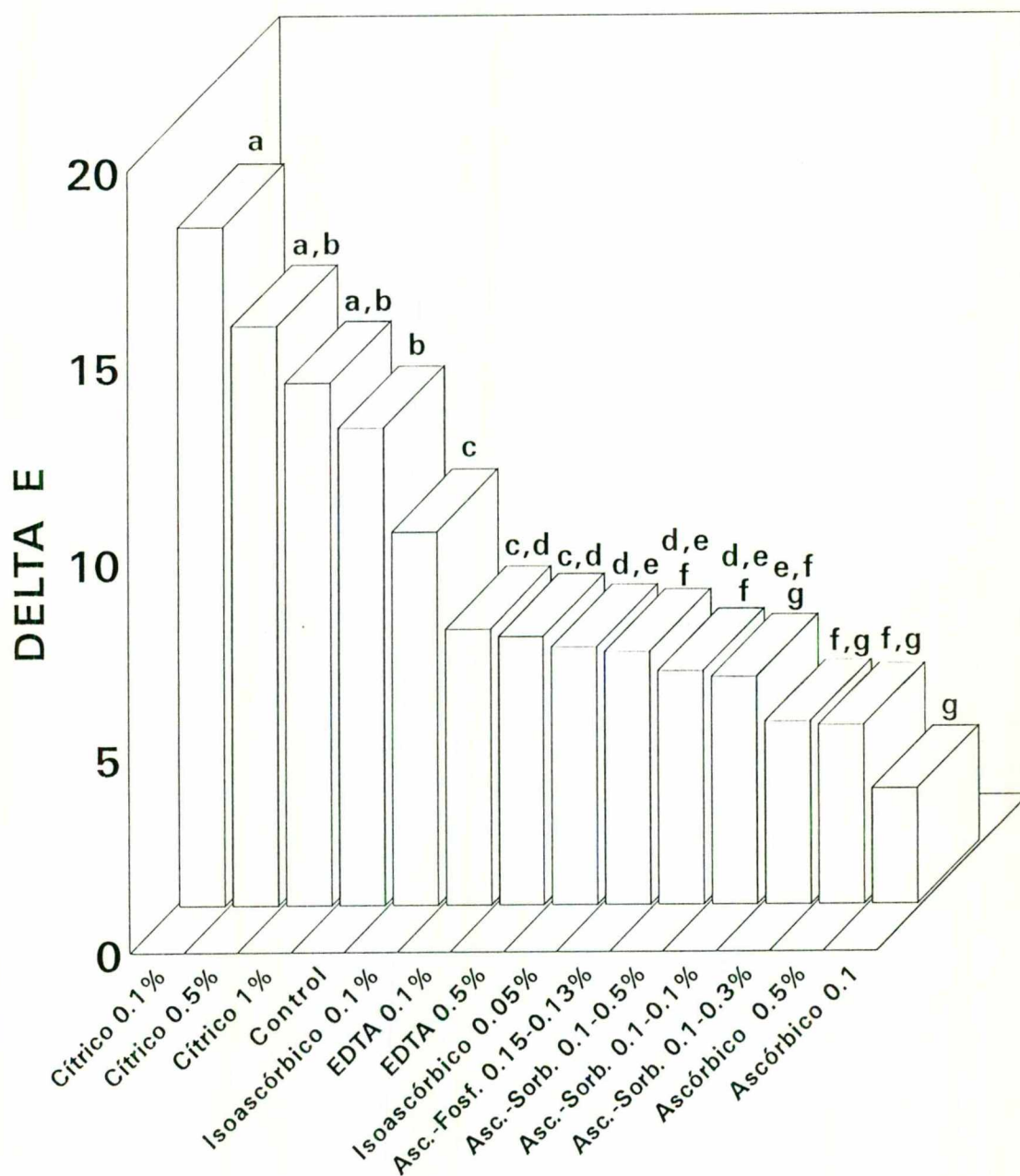
a,b,c y d denotan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

Sin duda el pH de las soluciones con las sales anteriormente mencionadas influye de manera total en los resultados mostrados. Por ejemplo con ácido cítrico las soluciones mostraron un pH aproximado de 2.6, pH al que no es estable y contrario para la utilidad de éstos pigmento betaláinicos.

En la figura 8 se muestran los resultados de las pruebas de estabilidad aplicadas al pigmento extraído con etanol HCl 1%. Estas soluciones presentaron una pérdida de color mayor comparada con la extracción en agua (Figura 7), es posible este argumento al comparar los valores de Delta E en ambos casos. Para el Etanol-HCl 1% los análisis mostrados revelan valores de Delta E de 18 mostrando el control una pérdida de 7.8 % con respecto al control el extracto acuoso. La diferencia neta de color (Delta E) al resultar numéricamente más alta indica una degradación mayor directamente relacionada con la muestra control para cada solución. Valores de Delta E para el ácido ascórbico muestran protección sobre el pigmento aproximadamente del 70% al encontrarse en estas condiciones. Sin embargo el pigmento de garambullo en solución presentó características desfavorables para su estabilidad, debido a la generación de un precipitado café claro. En las pruebas preliminares originó datos erróneos, aparentemente mostró lecturas netas mínimas de color, lo que indicó que la solución de etanol-HCl 1% brindaba mayor estabilidad al pigmento por efecto de la turbidez de las soluciones con gran cantidad de materia flotante siendo características de los parámetros L^* , a^* y b^* establecer sus fundamentos en la reflexión de la muestra. Este obstáculo se eliminó mediante la filtración en una pequeña malla.

Se sabe que la degradación de la betanina en presencia de alcoholes ocurre dependiendo del carácter nucleofílico de los mismos, el primer paso de su desintegración es un ataque nucleofílico en el átomo de carbono unido al nitrógeno

Figura 8. Estabilidad del pigmento de garambullo extraído con etanol-HCl 1% en presencia de diferentes agentes estabilizantes



a, b, c, d, e, f y g denotan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

cuaternario. La presencia de etanol incrementa la velocidad de degradación de las betalaínas, debido a la alta densidad electrónica en el átomo de oxígeno que presentan los alcoholes y a que son agentes nucleofílicos mas fuertes que el agua.

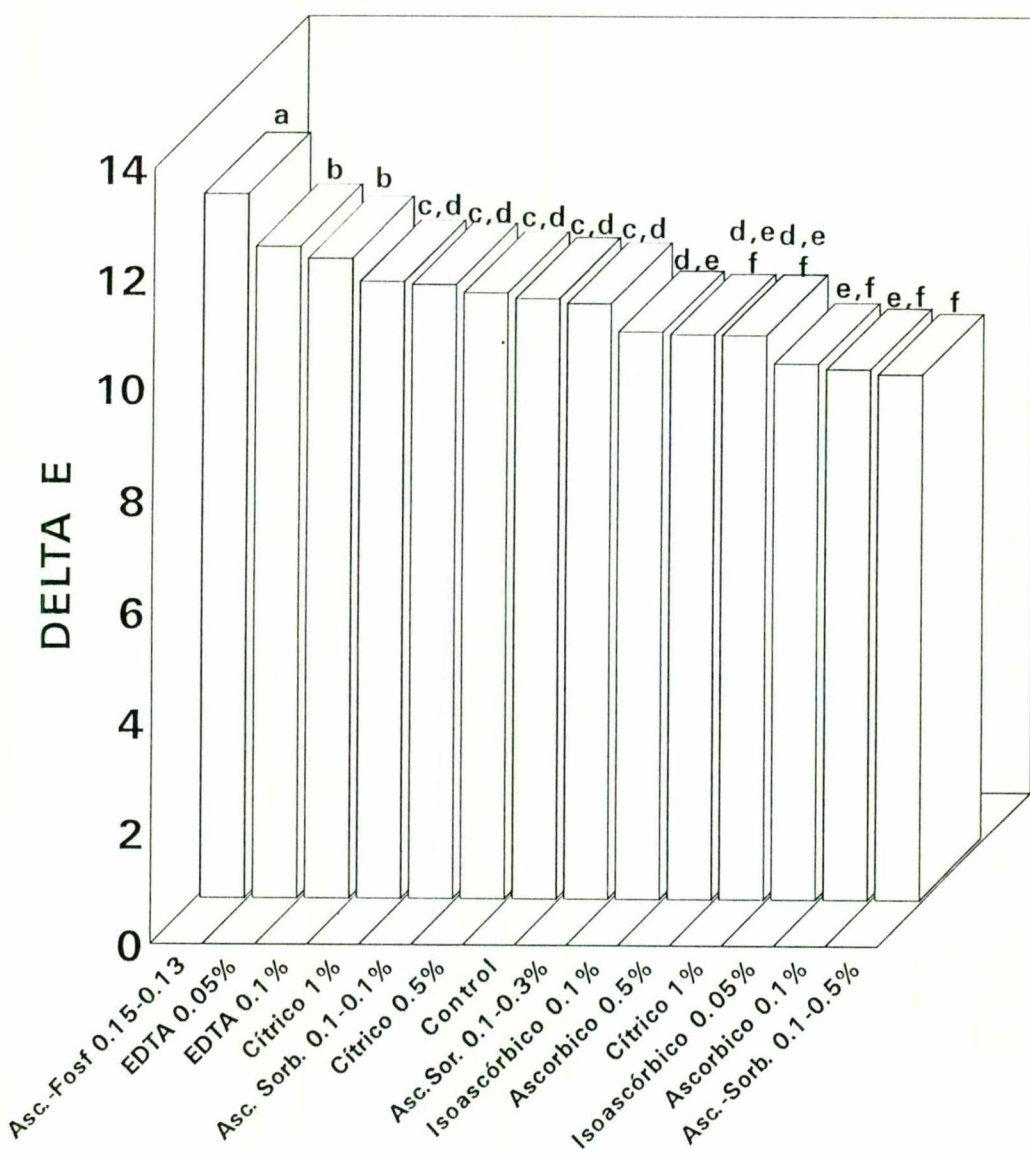
Durante el ataque nucleofílico se forma un compuesto protonado intermediario muy inestable que rompe el sistema de los dobles enlaces conjugados.

La liberación de este protón provoca una hidrólisis de las betalaínas, la escisión del protón no es tan rápida en soluciones ligeramente ácidas (pH 4-5) como lo es en soluciones neutras o básicas. A pH menor de 4 la aceleración de la degradación se incrementa, detectándose un cambio en el mecanismo de reacción (Simon et al, 1993), lo cual podría explicar la inestabilidad de las soluciones en etanol-HCl 1%.

Para la extracción realizada con Etanol:Agua (1:2) (Figura 9) se observó que el área del gráfico correspondiente a las sales es igual al comportamiento observado para los valores de Delta E reportados en la figura 8, pero en este caso la degradación es mucho menor. En este caso encontramos para el ácido cítrico 0.1% un 10% más de degradación con respecto a su propio control, pero un 30% aproximadamente menos para su similar en la solución de Etanol-HCl 1%, el ácido ascórbico a una concentración de 0.1% protege al pigmento en un 58.7%.

La solución del pigmento de garambullo en Etanol: Agua brinda resultados de estabilidad muy favorables para la extracción del pigmento, pero en contra parte ofrece un incremento considerable en costo de dicho proceso. Lo que sugiere que

Figura 9. Estabilidad del pigmento de garambullo extraído con etanol:agua en presencia de diferentes agentes estabilizantes



a, b, c, d, e, y f denotan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

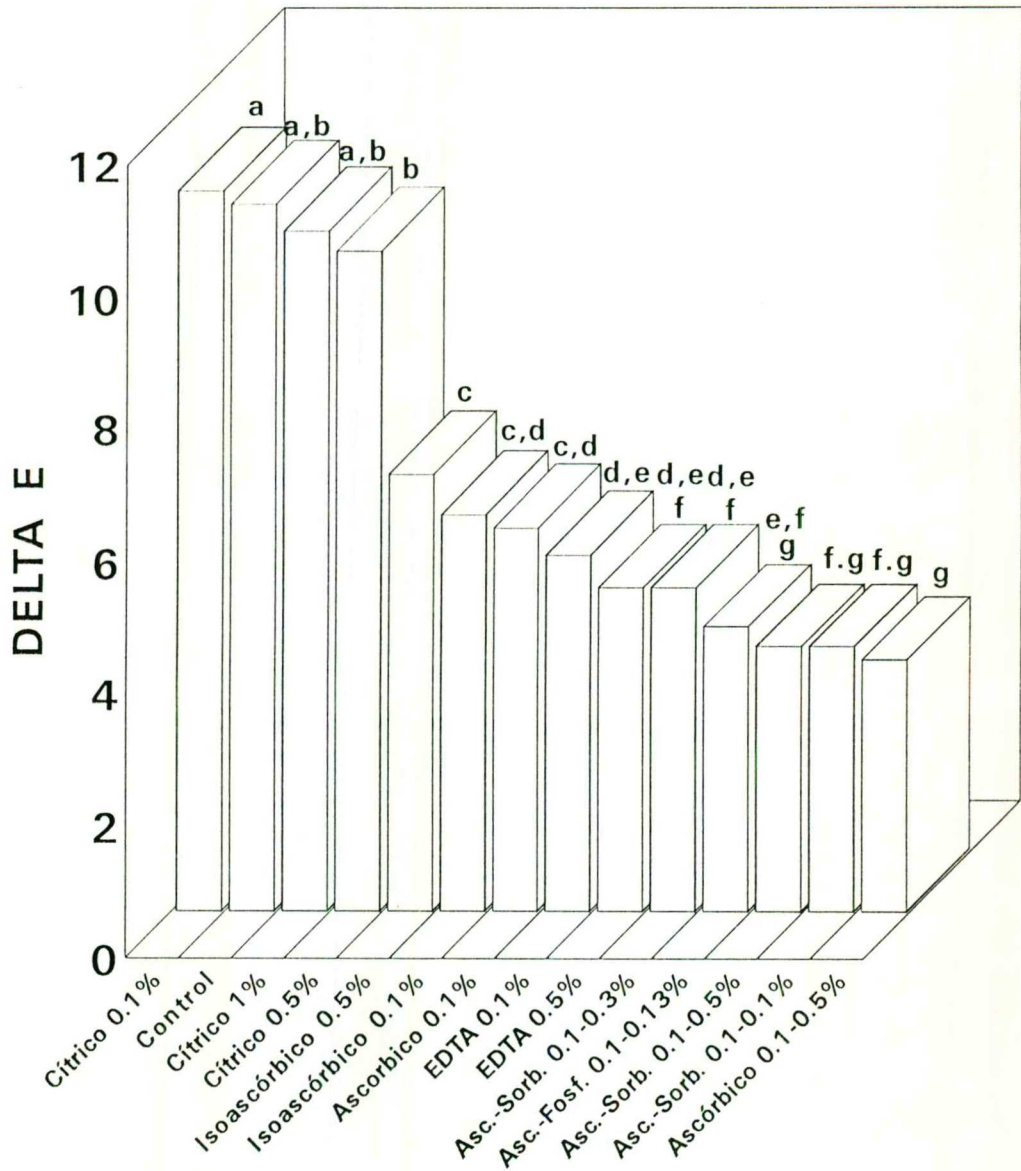
se requiere de continuar con estudios que revelen mezclas óptimas de estos solventes para lograr los mejores resultados con la factibilidad deseada.

Por último en pruebas de estabilidad para el extracto del pigmento de garambullo con Etanol-HCl 1%: Agua se observaron valores máximos de 11 para Delta E, equivalentes a los obtenidos para la extracción realizada con Etanol:Agua (Figura 10), donde también es fácil ver que las mezclas de ácido ascórbico-fosfórico 0.1-0.3%; ascórbico presentan los valores más pequeños de Delta E 4.3, 4.4 y 3.8 respectivamente en relación con el control para esta misma solución que presenta un valor de 10.7, es decir nuevamente los agentes estabilizantes ofrecen una protección del 35% aproximadamente.

Para esta solución de Etanol-HCl1% Agua se observaron las mismas reacciones posteriores a la degradación de 40°C por 24 hrs. Como las que mostró la extracción de etanol HCl1% solo que no tan marcadas, esto es, en la solución primera se observó turbidez y desde luego no se descarta el incremento de costo en esta extracción al ser comparada contra el agua.

Ambas extracciones mostraron estabilidad favorable para betaninas, sin embargo, dicha estabilidad se debe a que de las soluciones obtenidas directamente de la fermentación se llevaron a concentraciones muy pequeñas de betanina con respecto a la solución diluyente que para estos casos fue agua. La razón principal de esta decisión es que tanto para la solución extractora de etanol-HCl 1%:agua y etanol: agua solo una cuarta parte de ellas correspondía a etanol acidificado y etanol respectivamente. Por otra parte el proceso de concentración involucra un gasto innecesario si se considera de antemano el empleo de

Figura 10. Estabilidad del pigmento de garambullo extraído con etanol-HCl 1%:agua en presencia de diferentes agentes estabilizantes



a, b, c, d, e, f y g denotan diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

soluciones con concentraciones menores a las obtenidas directamente de la extracción y purificación.

En general para todas las pruebas de estabilidad el ácido ascórbico mostró en las diferentes condiciones a las que se le sometió muy buena protección al pigmento. Químicamente su comportamiento es de agente reductor, derivándose de esta propiedad un buen número de sus aplicaciones practicadas en la industria de alimentos, especialmente en aquellos casos como el presentado, en que determinadas acciones oxidantes conducen a la alteración del pigmento por efecto de temperatura y pHs desfavorables en dichos productos durante su conservación, en este caso directamente la pérdida del color.

El ácido ascórbico es termoestable, sin embargo en solución acuosa es inestable en presencia del oxígeno del aire, acelerándose su destrucción por la temperatura y por la presencia de iones férricos y cúpricos, así como por la enzima llamada ascorbinasa. Su estabilidad en soluciones también está relacionada con el pH, siendo mayor aquella cuanto más bajo es este último. Lo anterior nos explica la gran protección ofrecida en las soluciones extractoras que contenían Etanol y/o HCl de este agente.

Como se ha informado anteriormente las extracciones que contenían etanol confirieron aromas y sabores indeseables al concentrado. Dicho concentrado debía de aplicarse directamente a el producto, por tal motivo se decidió continuar los análisis con el producto de la extracción acuosa concentrado ya que además de ser barato, de fácil manejo y obtención, brindó mayor estabilidad al pigmento ya concentrado por la neutralidad de ella y no afectar la degradación del mismo.

C. DETERMINACIÓN DE pH DE MÁXIMA ESTABILIDAD DEL PIGMENTO

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente se puede sugerir que el pH juega un papel muy importante en la estabilidad de múltiples de los pigmentos extraídos ya que debido a el pH que desarrollan los agentes estabilizantes dependía en gran medida la estabilidad de las betalaínas.

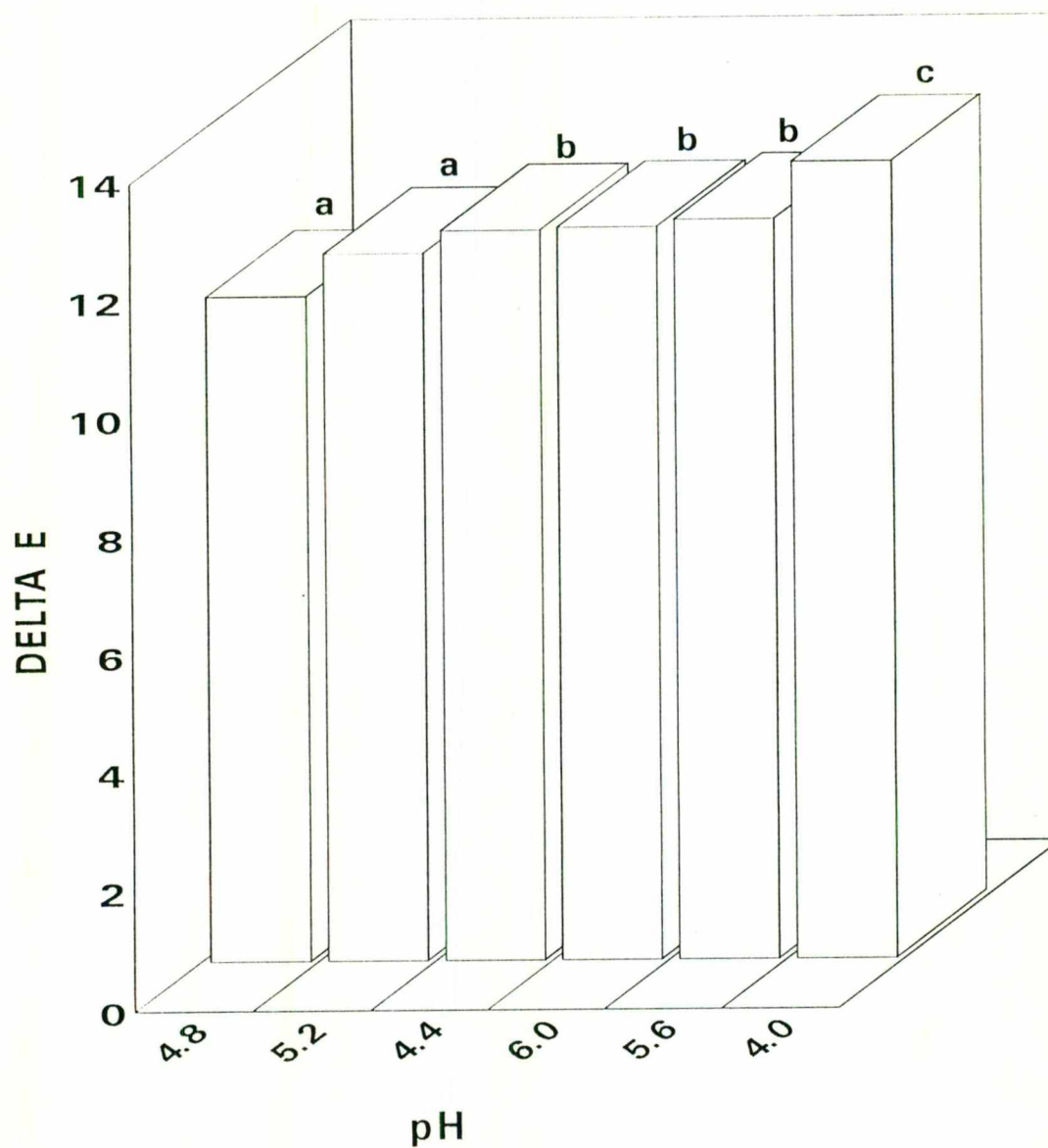
Por debajo de pH 3 el color cambió a violeta en donde la máxima absorción se presentó a 534-536 nm., con un ligero incremento en la absorbancia en el intervalo de 570 a 640. Arriba de pH 7 el color de la solución de las betalaínas fue azul intenso.

Reynoso en 1995 informó que los valores de pH más estables para el pigmento de garambullo se encontraron en el intervalo entre 4 y 5, en base al parámetro a^* siendo los de menor estabilidad las soluciones de pH 3 y 8.

Tomando como referencia los resultados de estabilidad del pigmento obtenido con las diferentes soluciones extractoras y a las características desagradables de sabor conferidos por los extractos etanólicos, los siguientes estudios se continuaron solo con la solución acuosa.

En la Figura 11 se observa el efecto del pH sobre la estabilidad del pigmento, en el intervalo que se estudió se muestra menor degradación en los pHs 4.8 y 5.2, los cuales son muy cercanos al que presenta el fruto de manera natural (4.7). Estos datos concuerdan con lo ya informado por von Elbe et al (1974 b) en el sentido de que la máxima estabilidad de las betalaínas a 40°C se encuentra cercano a pH 5.

Figura 11. Efecto del pH sobre betalaínas extraídas con agua del fruto de garambullo



a,b y c indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05\%$)

Saguy (1979) encontró que para betanina y vulgaxantina a temperaturas superiores a 60°C el pH de mayor estabilidad es de 5.8.

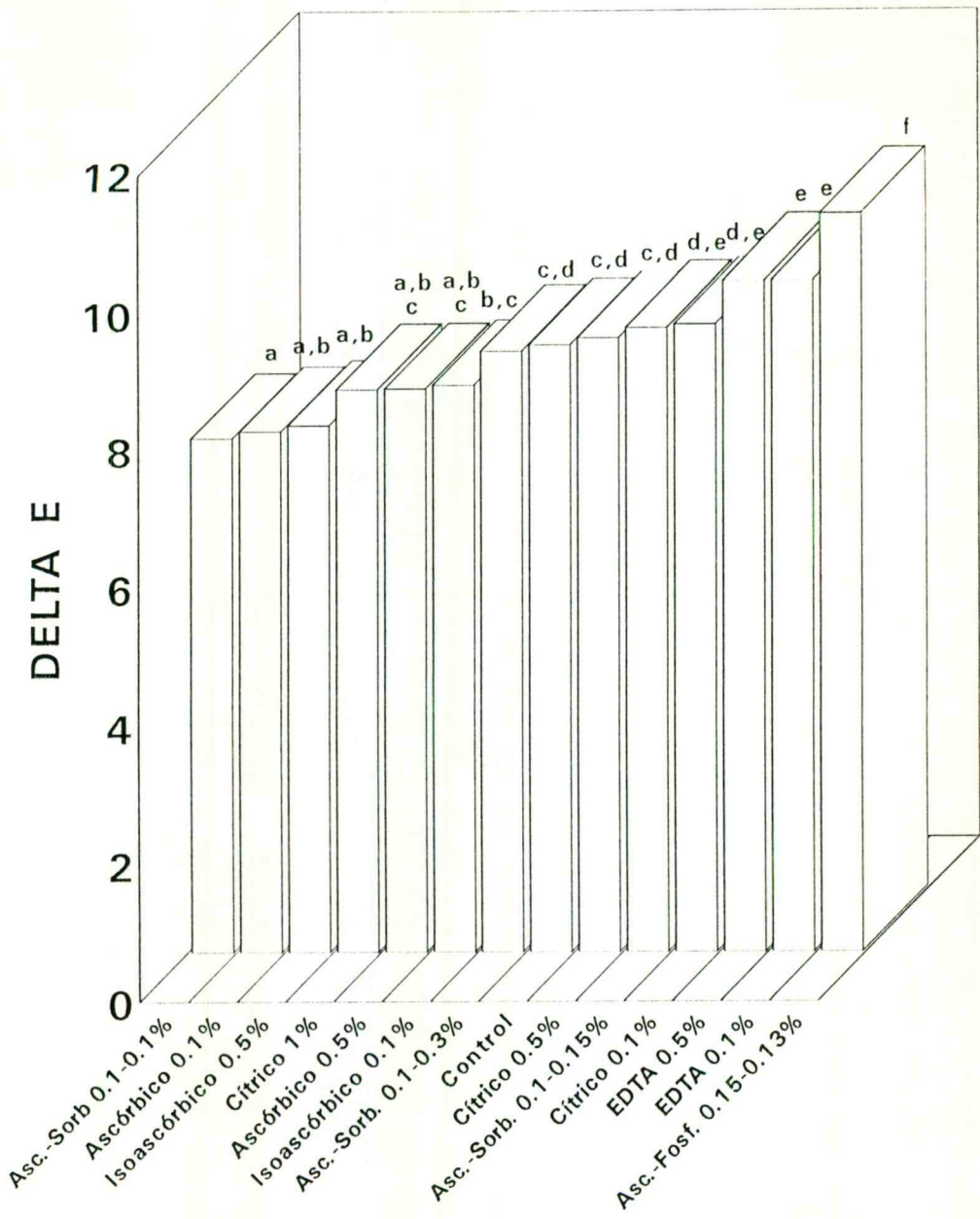
Huang y von Elbe (1987) informa para betabel un pH óptimo de estabilidad de 5.5 y para betaninas en presencia de oxígeno un rango de máxima estabilidad de 5.5 a 5.8.

La máxima regeneración de las betaninas esta influenciada por el tipo de solución reguladora y la temperatura de almacenamiento después de calentamiento obteniéndose de un 54 a 92%, a pH de 4.75 si se mantiene a temperatura ambiente después de calentamiento por 130 min. La mayor estabilidad la reporta a pHs de 4 y 6 donde la regeneración no esta incluida.

D. CÁLCULO Y EVALUACIÓN DE TIEMPOS DE VIDA MEDIA, CONSTANTES DE VELOCIDAD Y ENERGÍA DE ACTIVACIÓN

Las soluciones del pigmento de garambullo se ajustaron a pH 4.8 en presencia de los diferentes agentes estabilizantes mostrados en la figura 2; se observó una mayor protección de las betalainas en este valor de pH (Figura12), en comparación con las soluciones a las cuales se mantuvo el pH originado por dichas sales (Figura 7). Los mejores agentes estabilizantes fueron ascórbico-sórbico (asc-sor) 0.1-0.1%, ascórbico 0.1 y 0.5%, isoascórbico 0.5% y cítrico 1%, con valores para Delta E menores de 6.7 para la solución ajustada a pH 4.8.

Figura 12. Efecto de agentes estabilizantes a pH de máxima estabilidad de betalaínas extraídas con agua del fruto de garambullo



a, b, c, d, e y f indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05\%$)

Al ser graficados los porcentajes (15 valores) de pigmento remanente con respecto al tiempo, para un comportamiento semilogarítmico, se obtuvieron para las diferentes pendientes calculadas los valores que se informan en el Cuadro 3. Con base en ellos es posible evaluar los tiempos de vida media cuyos valores varían según actúen los diferentes aditivos sobre la estabilidad del pigmento de garambullo a valor de pH 4.8 (Cuadro 4). El tiempo de vida media del pigmento de garambullo se incrementó en presencia de ácido ascórbico al 0.1%, comparado con los otros agentes estabilizantes. Se obtuvo un aumento de seis veces a 4°C con respecto al control y de dos veces a temperaturas de 25°, 40° y 60°C (Tabla 5). Como puede observarse con ácido ascórbico al 0.1%, se presentó una ligera disminución en la velocidad inicial de degradación del pigmento, con un coeficiente de correlación superior a 0.9 el cual resultó estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Este cambio en la velocidad de degradación se debe a la capacidad antioxidante que tiene el ácido ascórbico de atrapar oxígeno en sistemas cerrados.

A concentraciones de 0.05% de ácido ascórbico, el efecto estabilizador fue menor comparado con el logrado para 0.10%. Esta disminución en prevenir la degradación se atribuye a la cantidad inadecuada de ascorbato en la solución. Savolainen y Kuusi (1978) encontraron que cuando se adicionó ácido ascórbico entre 0.01-0.05% se observaron efectos dañinos en la estabilidad de las betalaínas, sugiriendo que el peróxido de hidrógeno formado, durante la oxidación del ácido ascórbico, era el responsable de la pérdida del pigmento.

El ácido isoascórbico y el ácido cítrico no tuvieron un efecto significativo sobre los tiempos de vida media comparados con el control, a excepción del registrado a 40°C para el ácido isoascórbico al 0.05%. Estos resultados difieren de los encontrados por Bilyk et al (1981) quienes concluyeron que el ácido

Cuadro 3. Constante de velocidad del pigmento de garambullo, adicionado con diferentes agentes estabilizantes

ESTABILIZANTE	TEMPERATURA					
	0°C	25°C	40°C	60°C	80°C	100°C
	K [E-6]	K[E-5]	K[E-4]	K[E-3]	K[E-2]	K[E-1]
Control	19.90	7.21	2.99	9.18	1.33	4.84
Ac. Ascórbico / Sórbico 0.1%	2.97	4.03	1.80	4.54	0.89	5.04
Ac. Cítrico 1.0%	18.72	6.32	2.76	8.29	1.15	5.01
Ac. Ascórbico 0.5%	6.24	4.95	1.32	4.32	1.13	4.83
Ac. Ascórbico 0.1%	3.10	3.22	1.19	3.47	1.08	4.37
Ac. Isoascórbico 0.5%	18.72	5.20	1.78	7.94	1.40	3.92

Cuadro 4. Efecto de agentes estabilizantes sobre el tiempo de vida media del pigmento de garambullo a pH 4

Estabilizante	Tiempo (min)					
	4°C	25°C	40°C	60°C	80°C	100°C
Control	37012.0 ^a ± 3218.4	11413.6 ^a ± 982.6	2507.6 ^a ± 163.8	83.5 ^a ± 7.4	6.0 ^a ± 0.9	1.3 ^a ± 0.3
Ascórbico 0.1%	222897.7 ^c ± 8382.4	21493.7 ^c ± 1869.0	5224.1 ^d ± 181.0	199.3 ^c ± 10.1	6.4 ^a ± 0.4	1.3 ^a ± 0.2
Ascórbico 0.05%	111037.6 ^b ± 9654.5	13026.4 ^a ± 1449.9	4643.7 ^c ± 271.8	160.1 ^b ± 13.4	6.0 ^a ± 0.9	1.4 ^a ± 0.2
Cítrico 1.0%	39012.5 ^a ± 3546.6	13314.6 ^a ± 1634.1	3314.7 ^a ± 491.7	92.6 ^a ± 8.8	6.1 ^a ± 1.2	1.4 ^a ± 0.4
Asc-Sor ¹ 0.1-0.1%	233265.0 ^c ± 19926.5	17194.9 ^b ± 1570.0	3843.0 ^a ± 282.8	152.8 ^b ± 11.6	6.7 ^a ± 1.3	1.4 ^a ± 0.3
Isoascórbico 0.05%	316416.0 ^a ± 3246.7	13995.9 ^a ± 973.6	3872.7 ^b ± 402.9	87.2 ^a ± 6.9	5.9 ^a ± 0.9	1.7 ^a ± 0.4

¹Asc-Sor = Ascórbico-Sórbico

Diferentes letras significan diferencias estadísticas (p<0.05) por columna.

Las muestras del pigmento retuvieron de 52-65% su estabilidad después de 30 días de almacenamiento bajo condiciones de luz a 25°C. Mientras que en el caso de betabel la pérdida de un 70% se da casi inmediatamente después de 24 horas. Asimismo Pasch y von Elbe (1979) encontraron que el ácido cítrico incrementó los valores de vida media de las betalaínas en 1.5 veces, cuando este fue utilizado al 1% a pH 5, y a concentraciones de 0.1 y 0.01% no observaron ningún beneficio. Probablemente esta discrepancia en resultados se debe a que el pigmento de betabel y el de garambullo presentan una composición cualitativa y cuantitativa diferente en sus componentes betaláinicos.

A temperaturas de 80° y 100°C no hubo protección de ningún agente estabilizante, presentando tiempos de vida media de 5.9-6.4 min y de 1.3-1.7 min respectivamente. En otro estudio realizado en nuestro laboratorio se encontró que a concentraciones de 0.04% de betalaínas de garambullo de un pigmento secado por aspersión y con maltodextrinas, pH de 5.5, se obtuvo un tiempo de vida media de 21 min para 80°C y de 5 min a 100°C sin agentes estabilizantes (*Reynoso, 1995*). La estabilidad del pigmento decreció en forma significativa con respecto a la temperatura independientemente del tratamiento utilizado. La velocidad de deterioro del pigmento aumentó más rápidamente en presencia de ácido ascórbico al aumentar la temperatura. Aparentemente existe también un efecto debido a la concentración inicial de las betalaínas.

Conociendo los valores de la constante de activación a dos temperaturas diferentes respectivas, es posible evaluar la energía de activación, se denota como E_a y significa la energía mínima que absorben los reactivos para quedar activados y reaccionar, es decir la energía mínima necesaria para producirse una reacción. En este caso para que se lleve a cabo el inicio de la degradación del pigmento. Al

conocer y calcular varios valores, como los obtenidos en este estudio al graficar el log de k contra el inverso de la temperatura se obtiene una línea recta con una pendiente igual a $-E_a$ por el producto de 2.303 y R. Esta última dada en calorías, equivalente a un valor de 1.9872 (Maron y Prutton, 1992).

Así calculados los valores de energía de activación para cada uno de los mejores agentes estabilizantes, oscilaron entre 25.8 ± 2.8 y 22.1 ± 3.3 Kcal/mol fueron más altos para todas las muestras que contenían ácido ascórbico, siendo mayor para la concentración de 0.1% con un valor de 25.8 Kcal/mol comparado con 22.1 Kcal/mol para el control. Sin embargo no presentaron diferencias estadísticas significativas para ninguno de los tratamientos (Cuadro 5). Esto es, que ninguno de los agentes estabilizantes utilizados fue capaz de mejorar la estabilidad del pigmento de garambullo en solución acuosa, en el intervalo de temperaturas utilizado. Esta energía de activación es mayor comparada con la obtenida para las betacianinas del betabel (18.8 Kcal/mol) (Saguy, 1979), la diferencia puede deberse a la composición química de estos pigmentos. En los pigmentos del fruto de garambullo se han identificado filocactinas, betaninas e isobetaninas, mientras que el betabel solo contiene betaninas e isobetaninas.

Los resultados del presente estudio sugieren que se puede prolongar la vida de anaquel del pigmento betalaínico de garambullo extraído con agua si se adiciona ácido ascórbico al 0.1%.

Cuadro 5. Energía de activación del pigmento de garambullo en presencia de diferentes agentes estabilizantes

Agente Estabilizante	Energía de Activación Kcal/mol Ó		Correlación r
Control	22.1	± 3.3	0.95
Ascórbico 0.1%	25.8	± 2.8	-0.97
Ascórbico 0.05%	24.1	± 3.3	-0.96
Cítrico 1.0%	22.5	± 4.0	-0.96
Asc-Sor ¹ 0.1-0.1%	23.2	± 3.4	-0.95
Isoascórbico 0.05%	23.0	± 2.6	-0.94

p<0.05

¹Asc-Sor = Ascórbico-Sórbico

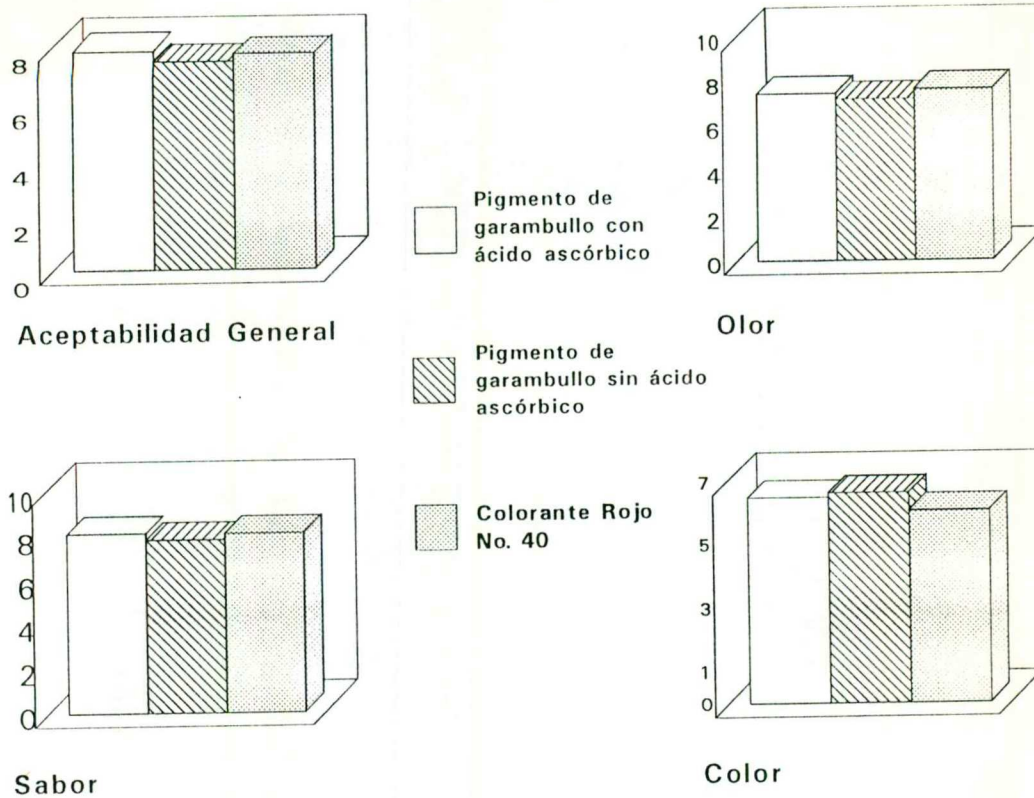
E. ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE HELADO A NIVEL LABORATORIO

En la elaboración y evaluación del helado se prepararon tres litros de mezcla o base para helado los equivalentes a 6 l de helado congelado. La base se dividió en tres lotes a dos de los cuales se les adicionó el pigmento de garambullo en 100 ppm y para uno de ellos el ácido ascórbico al 0.1%. Al lote restante se adicionó de rojo No. 40 en 200 ppm, estas concentraciones fueron evaluadas previamente en el laboratorio con muestras pequeñas y diferentes cantidades de cada uno de los pigmentos utilizados.

Los resultados de la evaluación sensorial de estos helados, se muestran en la Figura 13 y son los obtenidos a nivel laboratorio. En esta figura se puede observar que la evaluación fue similar para cada uno de los helados demostrando que no existieron diferencias con el preparado con el colorante artificial. Se otorgaron calificaciones en cuanto a aceptabilidad general de 7.5 y 7.47 para el helado adicionado de pigmento de garambullo con y sin ácido ascórbico y de 7.40 para el adicionado de rojo No. 40.

Un punto importante a evaluar fue la calificación con respecto al sabor que pudiera ser impartido por el pigmento de garambullo. Al realizar este análisis se observó que no impartió sabor desfavorable al alimento, ya que los valores de sabor fueron de 7.63 y 8.05 para el adicionado con pigmento de garambullo y rojo no. 40. Asimismo respecto al color se dieron evaluaciones aceptables (6.50, 6.65 y 6.06) para las tres muestras probadas que son pigmento adicionado con ácido ascórbico, sin ácido y con rojo no. 40.

Figura 13. Evaluación sensorial del helado de crema (preparación a nivel laboratorio)



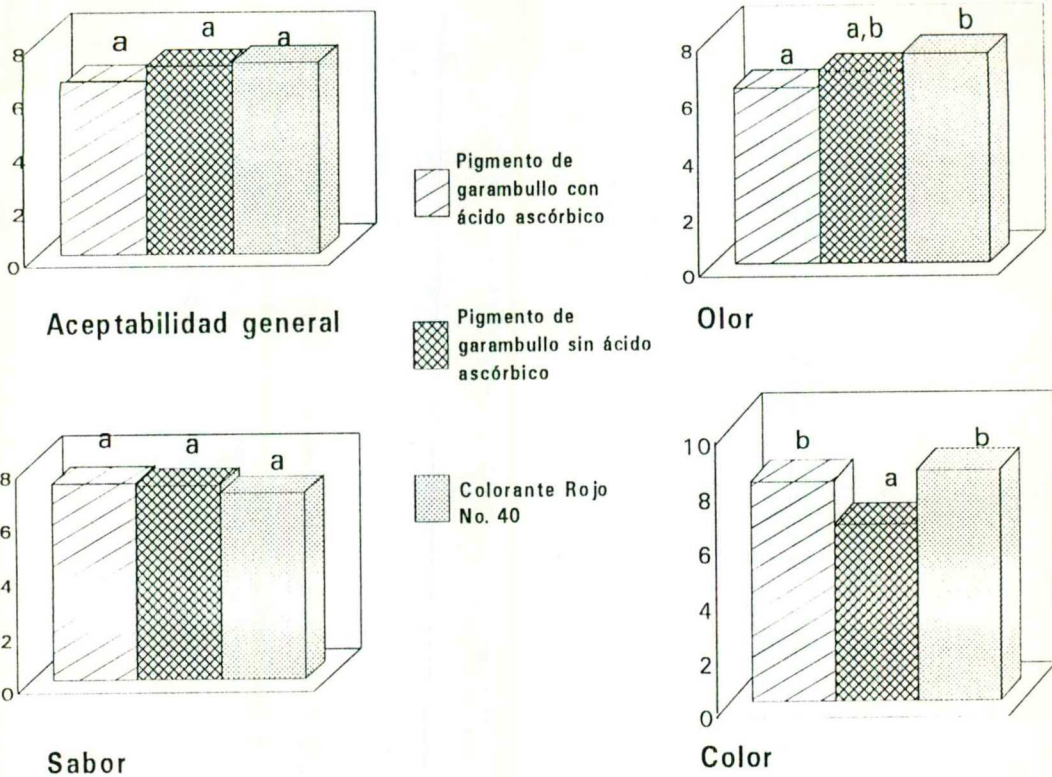
F. PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DEL HELADO COMERCIAL

Para la aplicación del pigmento en el helado, el líquido claro que se obtuvo de la extracción del pigmento fue sometido a un proceso de concentración al vacío a 40°C, hasta obtener una décima parte aproximadamente del total del líquido, es decir, se incorporó el pigmento concentrado (50 mg/kg).

En esta prueba la casa comercial elaboró los helados de acuerdo a estándares propios, previamente establecidos. El pigmento se adicionó en la proporción que ellos emplean para este producto. Mientras que los tiempos de batido y la cantidad de fruta adicionados, fueron equivalentes para los tres diferentes helados elaborados.

Se logró igualar el color del helado con pigmento de garambullo al comercial, para lo cual se adicionaron 25 ppm del pigmento de garambullo. Dichas concentraciones de betalainas son similares a las informadas para su aplicación en helados en países europeos que consideran niveles de 15-25 mg/l (*Hendry, 1992*). En la figura 14 se puede observar que la aceptabilidad general y el sabor no muestran diferencia estadística significativa entre ambos colorantes. Para el parámetro de color, el helado adicionado del colorante comercial y el que contenía pigmento de garambullo con ácido ascórbico tampoco presentaron diferencias estadísticas, calificaciones de 8.5 -9, respectivamente. En el caso del helado adicionado únicamente de pigmento de garambullo disminuyó la calificación para el color (7 en promedio), siendo un valor aceptable aunque más bajo en comparación con sus análogos.

Figura 14. Evaluación sensorial del helado de crema comercial adicionado de pigmento de garambullo



a y b denotan diferencia significativa ($p < 0.05\%$)

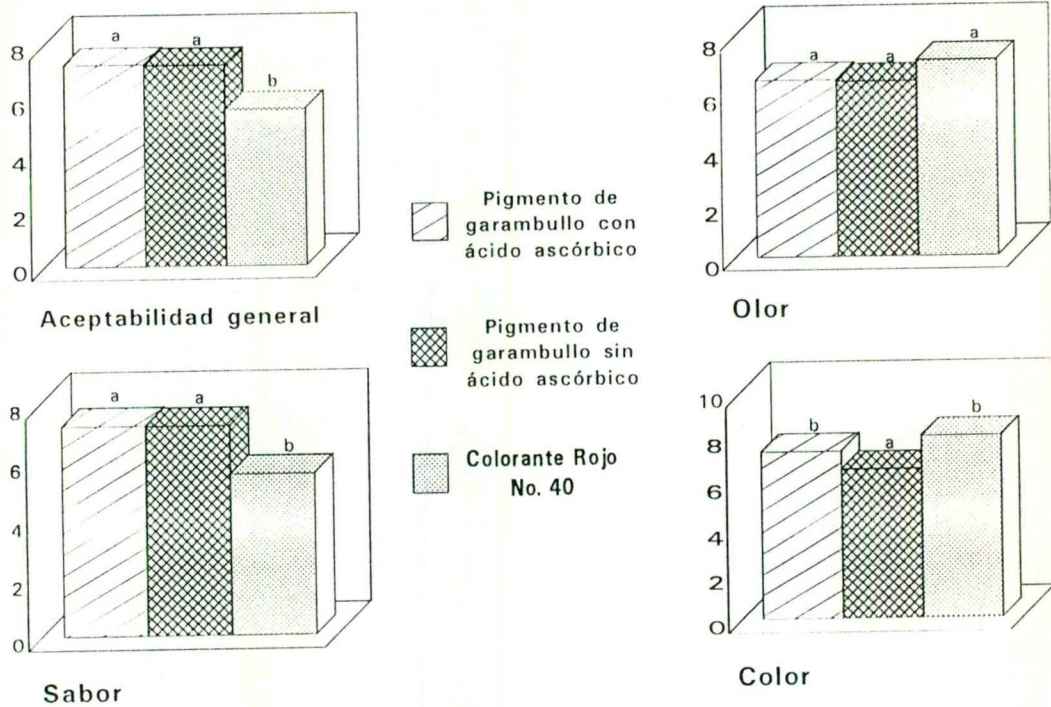
Con los resultados obtenidos para sabor es importante destacar que el pigmento de garambullo que se extrajo no presentó sabores característicos propios del fruto, de haber sido de manera contraria, dichos compuestos hubieran impartido al helado adicionado de este fruto sabores indeseables, ya que dicho fruto presenta un sabor dominante aún en concentraciones muy pequeñas.

G. VIDA DE ANAQUEL

En la Figura 15 se presentan los resultados de la evaluación sensorial para un helado de crema comercial después de almacenamiento durante 8 días a 4°C. Se observó una significativa pérdida en la aceptabilidad general para el pigmento comercial directamente relacionado al sabor, obteniendo a calificaciones de 5 en promedio. Por el contrario los helados adicionados del pigmento de garambullo obtuvieron calificaciones de 8 lográndose mayor aceptación general y de sabor.

Respecto al color se observó diferencia estadística significativa entre el helado que solo contenía el pigmento de garambullo, el adicionado de pigmento de garambullo mas ácido ascórbico y el colorante comercial se obtuvieron calificaciones para estos últimos hasta de 8 y 9, lo cual demuestra que antes y después del almacenamiento el pigmento de garambullo sin ácido ascórbico no reúne las expectativas del consumidor. Sin embargo en contraparte el helado preparado con el colorante artificial muestra después del almacenamiento; pérdida de aceptación en cuanto al sabor, probablemente por la formación de algunos compuestos de degradación del colorante artificial.

Figura 15. Evaluación sensorial del helado de crema comercial adicionado de pigmento de garambullo después de su almacenamiento (8 días)



a y b denotan diferencia estadística significativa ($p < 0.05\%$)

En resumen, el presente trabajo de investigación proporciona información tecnológica sobre la utilización de un pigmento no convencional que puede ser incorporado en diferentes alimentos. Dejando de manifiesto, las pruebas de tipo sensorial en combinación con las de tipo instrumental y constantes fisicoquímicas, logrando perfiles cada vez más detallados en lo que a análisis de este tipo de aditivos en alimentos se refiere. Asimismo, es complemento del esfuerzo constante en la búsqueda de productos que cada día nos brinden mayor seguridad para su consumo. Llegando a impactar de manera importante en el desarrollo industrial y promoción de estas áreas.

VIII. CONCLUSIONES

- . La solución extractora de etanol-HCl 1% permitió obtener el mejor rendimiento en cuanto a concentración de betalaínas, logrando obtener un 9.5%. Por el contrario disminuye las características que favorecen la estabilidad de estos pigmentos.
- . El pigmento betalaínico del garambullo ofreció mayores ventajas de costo en relación a su vida de anaquel cuando la extracción se realizó con agua.
- . Se logró aumentar la cantidad de pigmento extraído al efectuar extracciones consecutivas y lograr una relación final 1:3 del fruto:solvente.
- . Un pH de 4.8 favoreció la estabilidad del pigmento del fruto de garambullo en solución acuosa.
- . El ácido ascórbico al 0.1% mostró efectos favorables al ser adicionado al pigmento incrementando la vida media, comparado con los otros agentes estabilizantes utilizados. La energía de activación resultó estadísticamente igual al control (25.8 ± 2.8 Kcal/mol y 22.1 ± 3.3 Kcal/mol respectivamente).
- . La mejor estabilidad del pigmento de garambullo se presenta a temperaturas menores de 40°C.
- . El pigmento de garambullo no presentó sabores desfavorables característicos propios del fruto, que impidieran su óptima aplicación en helados.

-
- . Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial para el helado de crema, adicionado con este pigmento presenta una tonalidad y sabor similares con las preferencias comerciales del consumidor.
 - . Se confirma que el fruto de garambullo es una fuente potencial de pigmentos naturales para la industria alimentaria.
 - . Se recomienda especialmente en productos que no requieren ser sometidos a procesos térmicos altos ó excesivos, como es el caso de productos lácteos (congelados).

IX. BIBLIOGRAFÍA

ANÓNIMO. (1988) La Vitamina C y su utilización en las industrias de bebidas refrescantes Rev. Tecnol Aliment. 15: 1821.

ATTOE, L. E. y von ELBE, J. H. (1985). Oxygen involvement in betanine degradation: Effect of antioxidants. *J Food Sci.* 50:106-110.

ADUI D. (1989). "Pigmentos" En: Química de los Alimentos Eds. Alhambra Mexicana, México .pp.. 273-275.

BERSET C., CLERMONT H. y CHEVALS (1995). "Natural Red Colorant Effectiveness as Influenced by Absorptive Supports" *J. Food Sci.* 60:858-861

BILYK A. (1979). "Extractive Fractionation of Betalains" *J. Food Sci.* 44:1249-1251.

BILYK, A., MYRON, A. KOLODIJ, A. y SAPERS M. G. (1981). Stabilization of red beet pigments with ascorbic acid. *J Food Sci.* 16:1616-1617.

BRAVO, H. H. 1978. Las cactáceas de México, Vol. 1. México. Universidad Nacional Autónoma de México.

BIRREN F.(1963) "Color & Human Apetite". *Food Technology* 1:112

COHEN, E .y SAGUY, I. (1983). Effect of water activity and moisture content on the stability of beet power pigments. *J Food Sci.* 48:703-707.

CORONADO, M. y Vega S.(1990) "Aprovechamiento de Recursos Silvestres en Zonas Aridas y Semiáridas de México, Garambullo (*Myrtillocactus Geometrizans*). Cuadernos de Nutr. 8: 34-40.

CZYGAN C. (1980) "Betalains" En *Pigments in plants*. Eds Stuttgart New York. pp 370-389.

DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (1988) "Reglamento de la ley general de salud en materia de control sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios" Tomo CDXII. México D.F.

DOMÍNGUEZ LÓPEZ, A. (1995). Empleo de los frutos y de los cladodios de la chumbera (*Opuntia* spp.) en la alimentación humana. *Food Sci Technol Int.* 1:65-74.

DRDAK, M, Altamirano R.C. Rajniakova A, O P. Karovicova J. y Benkovska Simk D. (1992) "Red Beet Pigment Composition Efectt of Fermentation by Different Strains of *Saccharomyces Cerevisiae*" *J. Food Sci.* 57:935-936.

DUXBURY, D.D.(1990). "Replacement Colors and Blends for Banned Fd C. Red #3 Lake" *Food Processing.* pp. 63-70.

DZIEZAK J.D. (1987)."Aplications of Food Colorants" *Food Technol.* 41:78-88.

FENNEMA O.R. (1993) "Pigmentos y Otros Colorantes" en : *Química de los alimentos* Eds. Acribia, España. p.p. ,643-647.

FRANCIS, F. J. (1987) " Lesser-Known Food Colorants" *Food Technology.* 41:62-68

FRANCIS, F. J (1989)."Food colorants. Anthocyanins." *Cri Rev Food Sci Nutr.* 28:273-314

FRAZIER, W.C. (1976). "Cambios quimicos causados por microorganismos". En: *Microbiología de los alimentos* eds. Acribia, España. p.p. 36, 38, 178-180.

FURIA, T.T. (1990) "Color Additives in Food". En : *Hand Book of Food Additives* Ed. Press. pp. 587-615.

GROSS, J. (1991) "Pigments in Vegetables, Chlorophylls and Carotenoids". Eds. Avi (Van Nostrand Reinhold) New York.

HENDRY, G.A. (1992). "Anthocyanins And Betalains". En: Natural Food Colorants. Ed. Avi Publ. Blackie & Glasgow. London . p.p. 182-241

HUANG, S. A. y von ELBE, H. J. (1987). Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *J Food Sci.* 52:1689-1693.

MAGA J.A. y KIM C.H. (1990) " Stability of Natural Colorants (Annato, Beet, Paprika, Tumeric) During Extrusion Cooking " *Food Sci Human Nutr.*5: 427-432

MAHONEY J.R. y GRAF E. (1986) "Role of Alpha-Tocopherol, Ascorbic Acid, Citric Acid and EDTA as Oxidants In Model Systems" *J. Food Sci.* 51:1293-1296

MARON H. y PRUTTON F. (1992) "Cinetica de las reacciones homogéneas" en *Fundamentos de Fisicoquímica* Eds. LIMUSA, México pp. 557-581.

MEGGOS H.N. (1994). "Effective Utilization of Food Colors" *Food Technology* 48:112.

MORRISON T.R. BOYD N.R. (1990) "Carbohidratos I. monosacaridos" en : *Química Orgánica* Eds. Addison-Wesley Iberoamericana, Sitesa. p.p. 1265.

MEGGOS H.N. (1984) "Colors" *Key Food Ingredients Food Technology* 1: 70-74.

MULTON J.L. y CEPATRE F. (1988) "Colorantes Alimentarios" En: *Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las Industrias Agroalimentarias*; Eds. Acribia S.A. pp. 275-293.

MURAI K y WILKINS D. (1990) "Natural Red Color Derived from Red Cabbage" *Food Techn.* 44:131.

PASCH, J. H. y von Elbe, J. H. (1979). Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants or sequestrants. *J Food Sci.* 44:72-75.

PEDRERO, 1992 "Evaluación Sensorial de los Alimentos" eds Limusa pp. 4-32,45-60

PIATELLI M e IMPELLIZERI, G. (1968) Betacianins from Lampranthus 5 p. (Aroaceae) Phytochemistry, 8: 1595-96.

PIATELLI M. y MINALE L. (1964) "Pigments of Centrospermae-II, Distribution of Betacyanins" Phytochemistry, 3:547-557

POTTER N.N. (1978) "Leche y productos Análogos " En la Ciencia de los Alimentos. Eds. Edutex, México. p.p. 397-407.

REYNOSO C. R. (1995) "Extracción, caracterización, estabilidad y pruebas toxicológicas del pigmento de garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.

RODRIGUEZ, P. F. (1985)."Las betalainas como colorantes naturales en alimentos." Industria Alimentaria. 7:9-13.

RODRIGUEZ P.F. y HERBERT W.W. (1990) "Aditivos de Origen Natural en la Industria Alimentaria, una alternativa frente a los Artificiales" En Rev. Soc. Quim. 33:118-121.

ROSSETA L. (1986). "Food Colors" Food Technology. 40:49-56.

SAGUY, I. (1979). Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin-I) :Influence of pH and temperature. *J Food Sci.* 44:1554-1555.

SANTOS (1989) " Introducción" En. Avances en aditivos para la Industria de alimentos. Eds Pual México p.p. 1-111.

SAVOLAINEN, K. y KUUSI, T. 1978." The stability properties of golden beet and red pigments: Influence of pH, temperature and some stabilizers". *Z. lebensmitt, Unters-Forsch.* 166:19-22.

SIMON, P., DRDÁK, M. y CRUZ ALTAMIRANO, R. (1993). Influence of water activity on the stability of betanine in various water/alcohol model systems. *Food Chem.* 46:155-158.

von ELBE, H. J., KLEMENT, J. T., Amudson, H. C. Cassens, S. R. y Lindsay, C. R. (1974 a). "Evaluation of betalain pigments as sausage colorant". *J Food Sci.* 39:128-132.

von ELBE, J. H., YOUNG-MAING, I. y AMUDSON, C. H. (1974 b). Color stability of betanine. *J Food Sci.* 39:334-337

WALFORD ,(1984) "Natural Colours in Food" En: *Developments In Food Colours-2*. Eds. Elsevier Applied Science Publishers London/New York pp. 159-206, 207-230.