

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**Influencia de las condiciones de lixiviación en la extracción y
estabilidad de colorantes de remolacha (*Beta vulgaris*)**

TRABAJO MONOGRAFICO PRESENTADO POR:

Br. Sofía Tereza Argeñal Muñiz

Br. Scarleth Gabriela Guido Alvarez

PARA OPTAR AL TITULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

TUTOR:

Ing. Juan Alonso Santos

Managua, Nicaragua, Octubre 2023

DEDICATORIA

Quiero dedicar y agradecer en primer lugar este éxito a Dios, quien me ha llenado de bendiciones, por haberme dado salud, fuerzas y sabiduría necesaria para seguir adelante y culminar mi carrera. A él la gloria y la honra por siempre.

Para mis queridos padres Sofía Muñiz Franco y Roberto Argeñal Rubio, que son el pilar fundamental de mi vida, por todo su amor, apoyo y los sacrificios que han hecho para lograr culminar mi carrera. ¡Los amo mucho!

Agradezco a mi familia el apoyo que me han brindado siempre y por ser lo más valioso que poseo.

A mi compañera de tesis y amiga, por su apoyo durante este proyecto, ¡Gracias por todo, Dios te bendiga!

También agradecida con amistades especiales, que en todo este proceso fueron mi compañía e impulso para continuar y terminar una etapa importante en mi vida.

Concluyo con esta cita bíblica “Pon todo lo que hagas en manos de Dios y tus planes tendrán éxito” Proverbios 16:3

Sofía Argeñal Muñiz

Dedico esta tesis a Dios por ser mi más grande guía en todo momento, a mi familia por siempre estar a mi lado brindándome su apoyo y motivación para terminar este capítulo, a mi amiga y compañera de tesis por sus aportes a este proyecto.

Scarleth Guido Álvarez

AGRADECIMIENTOS

Saber que este documento representa el último peldaño para alcanzar con éxito y satisfacción una meta de gran importancia en nuestras vidas, nos llena de nostalgia y a la vez alegría de cumplir el compromiso y empezar una nueva etapa en la vida profesional.

Es importante agradecer a Dios por bendecirnos y darnos la oportunidad de llegar a culminar con éxito la carrera de Ingeniería Química, además de guiarnos por el buen camino, darnos fuerzas y sabiduría para seguir adelante, superar los obstáculos y adversidades que se presentaron

A nuestros maestros por compartir sus conocimientos y sabiduría a lo largo de la formación académica

Agradecemos de manera especial a nuestro tutor, al Ing. Juan Alonso Santos que, gracias a su experiencia profesional, aporte intelectual y participación constante en esta investigación, han permitido encaminar de manera excelente su desarrollo.

Nuestra gratitud a la Facultad de Ingeniería Química, por brindarnos su apoyo durante esta trascendental trayectoria, en especial a los encargados del Laboratorio de Ingeniería de Procesos.

A los jurados por sus críticas y apreciaciones para lograr un buen trabajo.

OPINION DEL CATEDRÁTICO GUIA

La agroindustria tiene un papel protagónico en la economía de nuestro país. Muchos cultivos como la remolacha se producen con el objetivo de su consumo directo por parte de la población, habiendo poco procesamiento de los mismos para obtener productos con valor agregado. Asimismo, existen muchos residuos no aprovechados y que son generados con el consumo de estos alimentos como por ejemplo cáscaras y otras partes del vegetal.

El presente trabajo de investigación nace con la idea de aprovechar estos residuos agroindustriales, para dar un valor agregado al procesamiento de estos alimentos y se enfoca con el aprovechamiento de los residuos de la remolacha, en particular con la extracción de betalaínas de la raíz, tanto de las cáscaras como de la pulpa.

Esta investigación contempla el estudio de las mejores condiciones en las cuales es más conveniente realizar el proceso de lixiviación tanto para betacianinas como betaxantinas de remolacha de la variedad Boro F1 que es la más común en nuestro país. Para esto, las jóvenes Scarleth Guido y Sofía Argeñal desarrollaron un estudio comprensivo que incluye varios diseños experimentales.

En primer lugar, se planteó determinar los factores que influyen significativamente en el proceso de extracción sólido-líquido mediante un diseño de cribado de Plackett-Burman para posteriormente utilizar estos factores para plantear un diseño factorial mixto que permitiera un análisis exhaustivo y completo de las condiciones más adecuadas, aplicando herramientas estadísticas que permitieron dar respuesta a estas preguntas de investigación.

Finalmente se investigó el comportamiento cinético de la degradación de las betalaínas, las cuales se sometieron a condiciones de almacenamiento a distintas temperaturas, tiempos y pH, para determinar su estabilidad. Además, se ajustaron modelos cinéticos para describir la cinética de degradación.

Los resultados son muy optimistas en cuanto al aprovechamiento de los residuos de remolacha pues se obtuvieron más del doble de colorantes en la cáscara que en la raíz, favoreciendo un proceso orientado a la economía circular pues las cáscaras de remolacha pueden usarse para obtener colorantes alimenticios naturales, en sustitución de los artificiales.

Tomando en cuenta todo el trabajo y esfuerzo que las tesis plasmaron en este estudio, incluyendo una extensa revisión de literatura, iniciativa para resolver problemas, aplicación de diseños experimentales, trabajo experimental ordenado y acucioso, aplicación de conceptos aprendidos durante sus estudios de grado y aprendizaje de nuevos conocimientos doy fe que Sofía y Scarleth han contribuido para desarrollar un trabajo de calidad a como lo dictan los estándares de nuestra institución.

Por todo lo mencionado anteriormente, solicito a los honorables miembros del jurado calificador valorar con la mayor calificación posible el presente trabajo que ha sido fruto del arduo esfuerzo, iniciativa y compromiso de las Bachilleres Sofía Argeñal y Scarleth Guido y se les otorgue el título de Ingeniero Químico.

Ing. Juan Manuel Alonso Santos
Tutor

RESUMEN

En la presente investigación se estudió la influencia de los factores y condiciones de lixiviación en la extracción de colorante de remolacha (*Beta vulgaris*), variedad boro F1, así como la estabilidad de los colorantes extraídos, siendo seleccionada esta variedad por su excelente color y por ser una de las que más se encuentran en el país.

Se llevaron a cabo experimentos donde se identificaron los factores que influyen en la lixiviación para la extracción de betalaínas a partir de la remolacha, para ello fueron propuestos 7 factores seleccionados de acuerdo a la literatura abordada, con estos factores se establecieron condiciones y se propuso un diseño de cribado tipo Plackett-Burman de resolución III. Este tipo de diseño permitió identificar los factores más importantes los cuales fueron la temperatura, disolvente y parte de la raíz.

Para la determinación de las condiciones específicas de lixiviación se propuso un diseño factorial mixto, con los 3 factores identificados como influyentes en la lixiviación, se establecieron nuevas condiciones o niveles, lo que permitió enriquecer el estudio para maximizar el contenido de betalaínas.

Los resultados indican que las mejores condiciones de lixiviación son: utilizando la cáscara como materia prima, temperatura de extracción de 40 °C, etanol al 25% como disolvente, uso de secuestrante EDTA al 1%, tiempo de extracción 1 hora, la muestra se debe preparar rayada y la agitación debe ser de 120 rpm. A estas condiciones los contenidos máximos teóricos que estima el optimizador que se pueden obtener son 203.80 mg/100 g de cáscara para betacianinas y 137.31 mg/100 g de cáscara para betaxantinas.

Para la estimación de la cinética de degradación de las betalaínas, con respecto al tratamiento térmico, tiempo de almacenamiento y pH, se encontró que tanto las betacianinas como betaxantinas tienden a presentar una cinética de degradación de primer orden y que las betalaínas son muy sensibles a las altas temperaturas, tiempos de almacenamiento prolongados a temperatura ambiente y a pH fuera del rango de 5 a 6. Se recomienda por lo tanto su almacenamiento en condiciones de refrigeración (4°C), protegidas de la luz solar a pH de 5 y que su extracción se realice a una temperatura máxima de 40°C.

Tanto betacianinas como betaxantinas sufren una degradación similar a los mismos pH, tiempos de almacenamiento y temperaturas. Un caso en particular fue a condiciones de pH 5, donde las betalaínas presentaron un comportamiento que tiende a la estabilidad en lugar de la degradación.

Con los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que las cáscaras de remolacha son una excelente fuente de betalaínas, habiendo más del doble de estos colorantes en la cáscara que en la pulpa siendo este un indicador favorable hacia un modelo de aprovechamiento de estos residuos de remolacha en los mercados o lugares de consumo. Hay factores influyentes en la extracción y condiciones que favorecen tanto la extracción como la estabilidad, por lo tanto, se recomienda procesar las cáscaras y darle un valor agregado en vez de desecharlas para orientar el modelo agrícola de este producto hacia una economía circular.

INDICE

Contenido	pagina
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GENERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 MARCO TEÓRICO	13
3.1 BETA VULGARIS.....	13
3.1.1 <i>Botánica y Morfología de la remolacha, variedad Boro F1</i>	13
3.1.2 <i>Cultivo de remolacha en Nicaragua</i>	14
3.1.3 <i>Composición química y nutricional</i>	14
3.1.4 <i>Efectos adversos o tóxicos</i>	15
3.1.5 <i>Consumo y uso de la remolacha industrialmente</i>	15
3.2 COLORANTES.....	16
3.2.1 <i>Colorantes Naturales</i>	16
3.2.2 <i>Clasificación de los colorantes naturales</i>	16
3.2.3 <i>Regulación de colorantes</i>	16
3.2.4 <i>Importancia del color en los alimentos</i>	17
3.3 COLORANTES NATURALES PRESENTES EN LA REMOLACHA	18
3.3.1 <i>Betalaínas</i>	18
3.3.2 <i>Estructura</i>	19
3.3.3 <i>Propiedades físicas</i>	19
3.3.4 <i>Propiedades químicas</i>	19
3.3.5 <i>Clasificación de las betalaínas</i>	19
3.3.6 <i>Betacianinas</i>	19
3.3.7 <i>Betaxantinas</i>	20
3.4 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BETALAÍNAS	20
3.4.1 <i>Espectrofotometría UV Visible</i>	21
3.4.2 <i>Obtención de un espectro de absorción</i>	22
3.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE BETALAÍNAS	23
3.6 FACTORES QUE GOBIERNAN LA ESTABILIDAD DE LAS BETALAÍNAS.....	24
3.6.1 <i>Efecto del pH</i>	24
3.6.2 <i>Efecto de la temperatura</i>	24
3.6.3 <i>Efecto de secuestrantes</i>	24
3.7 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETALAÍNAS	25
3.8 RENDIMIENTO DE BETALAÍNAS	26
3.9 USO DE LAS BETALAÍNAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	26
3.10 PROCESO DE OBTENCIÓN DE COLORANTE DE BETA VULGARIS	27
3.11 EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO: LIXIVIACIÓN.....	27
3.11.1 <i>Factores que influyen en la lixiviación</i>	29
3.11.2 <i>Solventes utilizados en la lixiviación de Beta Vulgaris</i>	29
4 HIPÓTESIS	31
5 METODOLOGÍA.....	32

5.1	MATERIAL VEGETAL.....	32
5.1.1	<i>Acondicionamiento del material vegetal</i>	32
5.2	IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES QUE INFLUYEN SIGNIFICATIVAMENTE EN LA EXTRACCIÓN COLORANTE.....	32
5.3	ETAPAS DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DEL COLORANTE NATURAL.....	33
5.3.1	<i>Selección y lavado</i>	33
5.3.2	<i>Reducción de tamaño</i>	34
5.3.3	<i>Lixiviación</i>	34
5.3.4	<i>Filtración del extracto acuoso</i>	34
5.3.5	<i>Identificación de betalaínas</i>	35
5.3.6	<i>Cuantificación de betalaínas</i>	35
5.3.7	<i>Preparación del blanco</i>	35
5.3.8	<i>Lectura de muestras</i>	35
5.4	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ESPECÍFICAS DE LIXIVIACIÓN QUE FAVOREZCAN EL CONTENIDO DE BETALAÍNAS.....	35
5.5	ESTIMACIÓN DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETALAÍNAS PRESENTES EN EL COLORANTE EXTRAÍDO.....	36
5.5.1	<i>Degradación con respecto al tiempo de almacenamiento</i>	37
5.5.2	<i>Degradación con respecto a la Temperatura de 78°C</i>	37
5.5.3	<i>Degradación con respecto al pH</i>	37
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.1	IDENTIFICACIÓN DE LAS BETALAÍNAS EN EL COLORANTE.....	38
6.2	FACTORES QUE INFLUYEN SIGNIFICATIVAMENTE EN EL CONTENIDO DE BETALAÍNAS DURANTE EL PROCESO DE LIXIVIACIÓN.....	38
6.3	DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ESPECÍFICAS DE LIXIVIACIÓN QUE FAVOREZCAN EL CONTENIDO DE BETALAÍNAS (BETACIANINAS Y BETAXANTINAS).....	42
6.4	ESTIMACIÓN DE LA CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE BETALAÍNAS PRESENTES EN EL COLORANTE EXTRAÍDO.....	48
6.4.1	<i>Estabilidad frente al tiempo de almacenamiento</i>	48
6.4.2	<i>Estabilidad frente al tratamiento térmico</i>	50
6.4.3	<i>Estabilidad frente al pH</i>	51
7	CONCLUSIONES.....	55
8	RECOMENDACIONES.....	56
9	BIBLIOGRAFÍA.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 3.1 Clasificación taxonómica de la remolacha	13
Tabla 3.2 Composición química de <i>Beta vulgaris</i> para cada 100 gramos comestibles	15
Tabla 3.3 Clasificación de los colorantes naturales según su naturaleza química.....	17
Tabla 3.4 Colorantes naturales permitidos por la FDA.....	18
Tabla 5.1 Tabla de factores y niveles propuestos para identificar los factores que influyen significativamente en el contenido de betalaínas	32
Tabla 5.2 Diseño experimental de Cribado utilizado para la identificación de los factores que influyen significativamente en la calidad y rendimiento del colorante.	33
Tabla 5.3 Diseño experimental para la determinación de las condiciones específicas de lixiviación que favorezcan el contenido de betalaínas	36
Tabla 6.1 Resultados del contenido de betalaínas y rendimiento.....	39
Tabla 6.2 Resultados del optimizador de respuesta para los experimentos de cribado	41
Tabla 6.3 Resultados del diseño factorial mixto para determinar las mejores condiciones de lixiviación	42
Tabla 6.4 ANOVA para el contenido de Betacianinas	42
Tabla 6.5 ANOVA para el contenido de Betaxantinas.....	44
Tabla 6.6 Condiciones recomendadas para extraer colorantes de remolacha (betacianinas y betalaínas).....	47
Tabla 6.7 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas con el tiempo a temperatura ambiente.....	49
Tabla 6.8 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas con el tiempo a 4°C	50
Tabla 6.9 Parámetros cinéticos para la degradación térmica de betalaínas a 78°C	51
Tabla 6.10 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 3	53
Tabla 6.11 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 5	53
Tabla 6.12 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 6.8	53
Tabla 6.13 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 8	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 Partes de la remolacha, adaptado de (Moreiras et al., 2013).....	14
Figura 3.2 Estructura química de la betalaína (García, 2008).	19
Figura 3.3 Estructuras químicas de derivados de betaxantina (izquierda) y de betacianina (derecha): (a) indicaxantina, (b) vulgaxantina, (c) betanidina, (d) betanina.	20
Figura 3.4 Estructura química de las betacianinas (Mancha et al., 2019)	21
Figura 3.5 Estructura química de las betaxantinas (Herbach et al., 2006)	21
Figura 3.6 Esquema de un Espectrofotómetro UV-VIS	22
Figura 3.7 Identificación de betacianinas y betaxantinas mediante un espectro de absorción..	23
Figura 3.8 Cinética de la degradación de compuestos betalámicos (mg /100 g. b.s) de dos variedades de quinuas (rosada pasankalla y negra collana) en diferentes tiempos de cocción, Fuente: (Llamo et al. 2015)	25
Figura 3.9 Mecanismos de degradación de betacianinas y betaxantinas según distintos factores (Fennema, 2000).....	26
Figura 3.10 Flujograma de proceso para la obtención del colorante de <i>Beta vulgaris</i> , Fuente: Elaboración propia.....	28
Figura 3.11 Esquema de la extracción solido-liquido: 1 (solvente), 2 (matriz sólida), 3 (solute), 4 (sólido inerte), 5 (mezcla soluto-solvente) Fuente: Elaboración propia.....	28
Figura 5.1 Esquema del arreglo experimental con plancha de calentamiento con agitación para la lixiviación	34
Figura 6.1 Espectro de absorción versus longitud de onda del extracto acuoso de remolacha (<i>Beta vulgaris</i>). Fuente: elaboración propia.	38
Figura 6.2 Influencia de los factores de lixiviación en el contenido de betacianinas.....	40
Figura 6.3 Influencia de los factores de lixiviación en el contenido de Betaxantinas.....	41
Figura 6.4 Influencia de los factores dominantes en la lixiviación en el contenido de betacianinas	43
Figura 6 5 Influencia de los factores dominantes en la lixiviación en el contenido de betaxantinas	44
Figura 6.6 Gráfica de interacciones que indica las mejores combinaciones en cada factor para betacianinas	45
Figura 6.7 Gráfica de interacciones que indica las mejores combinaciones en cada factor para betaxantinas	46
Figura 6.8 Optimizador de respuesta para a) Betaxantinas (arriba) y b) Betacianinas (abajo) .	47
Figura 6.9 Cambio en el espectro de absorción UV-Vis de las betalaínas debido a su degradación.....	48
Figura 6.10 Cinética de degradación de las betalaínas almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente (30°C).....	49
Figura 6.11 Cinética de degradación de los colorantes de la remolacha sometidos a tratamiento térmico de 78°C	50
Figura 6.12 Cinética de degradación de Betacianinas ante distintos pH.....	52
Figura 6.13 Cinética de degradación de Betaxantinas ante distintos pH.....	53

1 INTRODUCCIÓN

Los colorantes alimentarios se han usado a lo largo de la historia para mejorar la imagen y apariencia de los alimentos. Desde el punto de vista de la legislación europea son “sustancias que dan color a un alimento o le devuelven su color original (Calvo, 2018).

Según Marín and Mejía (2012) en Latinoamérica los países que producen y exportan colorantes naturales son: Argentina, México, Perú, Bolivia, entre otros. Con una demanda creciente por la preferencia y exigencia de los consumidores en que los alimentos sean lo más naturales posibles; en consecuencia, la elaboración de colorantes naturales está también en crecimiento.

Una de las fuentes de colorante natural son las hortalizas, entre las que se destaca a la remolacha por poseer excelentes propiedades que derivan de sus componentes nutritivos, así como de otra serie de sustancias, cuyas propiedades son objeto de estudio.

De la remolacha se extraen colorantes hidrosolubles llamados Betaínas que comprende mayoritariamente dos familias de compuestos: las Betacianinas (Rojas) y Betaxantinas (amarillas) sin embargo la estabilidad de estos pigmentos se ve afectada por factores como temperatura, pH, actividad de agua y presencia de oxígeno y luz, siendo más afectados por procesos donde se emplean altas temperaturas (Wilson, 2017).

En la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) de la Universidad Nacional de Ingeniería no se encontraron estudios dedicados al procesamiento de la remolacha para la obtención de betaínas, por lo que fue uno de los motivos para llevar a cabo esta investigación.

Orellana (2015), realizó una extracción y caracterización de los pigmentos naturales presentes en beta Vulgaris (remolacha) para la propuesta de una formulación cosmética y evaluación de su estabilidad fisicoquímica y microbiológica, donde concluyeron que los pigmentos presentes en el tubérculo de la remolacha tienen una capacidad colorante evidente, también lograron la extracción y secado de los pigmentos de Beta Vulgaris a partir de material vegetal fresco y reportaron un porcentaje de rendimiento considerable (7.00%).

El trabajo de Yanchapanta (2011), consistió en la “Obtención de un colorante natural la betaína a partir de la remolacha (Beta vulgaris) para su aplicación en alimentos y bebidas, sin que sus propiedades organolépticas (sabor y olor) afecten su utilidad” donde se llevaron a cabo ciertos métodos de obtención como es la Fermentación y la Cristalización utilizando la remolacha (Pulpa y Raíz), obteniendo un satisfactorio resultado con las raíces y con el método de cristalización.

Córdoba (2014), obtuvo un colorante orgánico para la industria alimentaria a partir del fruto pitahaya (*Hylocereus undatus*), estudio realizado en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (Unan-Managua) durante enero a junio 2014. Concluyó que la determinación de betaínas en el fruto de pitahaya, indica que el color característico se debe al mayor contenido Betacianinas que Betaxantinas de acuerdo a las concentraciones y porcentajes obtenido.

Benites (2015), realizó una comparación de los solventes agua y etanol en la extracción de betaínas a partir de las brácteas de buganvilla, en su estudio concluyó que el solvente que mostró mejor rendimiento en la extracción de Betacianinas y Betaxantinas fue el agua destilada a un pH de 4.5 y a una temperatura de extracción de 20 °C, donde obtuvo un rendimiento 1.50 mg/ml de extracto para Betacianinas y para Betaxantinas 0.60 mg/ml de extracto.

En cuanto a la cinética de degradación de las betalaínas, muchos de los actores citados en el capítulo 3 coinciden con que las betalaínas se degradan siguiendo una cinética de primer orden, y que el principal factor causante de la inestabilidad de dicho colorante es la temperatura.

Nicaragua a pesar de ser un país favorecido en gran medida por el rubro agrícola y el sector primario (15.5 % del PBI en 2018, según el banco mundial) existen muchas materias primas que no se aprovechan, sobre todo a los desechos o subproductos. En el caso de la remolacha no se le da ningún valor agregado, simplemente se consume de manera directa ya sea en ensaladas o jugos.

En la presente investigación se estudió la remolacha como fuente natural de colorante, y se determinaron las condiciones de lixiviación que favorecen tanto la extracción como el contenido de betalaínas, algo muy interesante encontrado en este estudio, es que la cascara de remolacha contiene mayor contenido de betalaínas, siendo de gran importancia conocer esto, ya que es un desecho que puede aprovecharse, procesándose, para generar un producto natural que sustituya productos colorantes artificiales que resultan ser perjudiciales para la salud.

La lixiviación como método de extracción fue aplicada en este estudio debido a que es uno de los métodos más adecuados para la obtención de betalaínas, considerando que no se necesitan altas temperaturas ni largos tiempos de extracción, que resultan ser perjudiciales para los compuestos presentes en el colorante, ya que por su naturaleza suelen ser inestables.

La estabilidad del colorante, también fue objeto de estudio y se determinaron los factores que la afectan, lográndose estimar la cinética de degradación para factores como la temperatura, pH y tiempo de almacenamiento.

Una razón fundamental para realizar esta investigación, ha sido el importante aporte que genera conocer como darle un valor agregado a esta hortaliza, materia prima local y al mismo tiempo aprovechar sus desechos que hoy por hoy simplemente se desechan. Otra de las razones es que el presente estudio permite conocer qué condiciones de operación favorecen el contenido de betalaínas y que factores afectan su estabilidad, ya que un requisito primordial de los colorantes naturales es su estabilidad a largo plazo, debiendo resistir no sólo los procesos industriales a los cuales están sometidos los alimentos como a las condiciones de pH e interacción con otros componentes de los alimentos en los cuales se encuentra.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Determinar la influencia de las condiciones de lixiviación en la extracción y la estabilidad del colorante de remolacha (*Beta vulgaris* L), variedad Boro F1.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar los factores que influyen significativamente en el contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) durante el proceso de extracción.
- Determinar las condiciones específicas de lixiviación que favorezcan el contenido de betalaínas presentes en el colorante de remolacha.
- Estimar la cinética de degradación de las betalaínas presentes en el colorante extraído debido al tiempo de almacenamiento, tratamiento térmico y pH.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 *Beta vulgaris*

La remolacha fue considerada desde tiempo antiguo como una planta alimenticia. En 1747, un farmacéutico berlinés llamado A. Markgraf encuentra que en su composición interviene la sacarosa, la misma sustancia proveniente del azúcar de caña. Con respecto a la denominación científica *Beta*, la misma deriva del formato en que se doblan los tallos en su parte superior cuando están cargados de simientes, asemejando a la letra griega (Orellana, 2015).

La remolacha es una hortaliza perteneciente a la familia *Chenopodiaceae*, género *Beta*, especie *vulgaris*. Es una planta bianual, es decir, que el primer año se forma la parte comestible y en el segundo ocurre la emisión de tallos florales y la consiguiente formación de frutos y semillas. El tallo es corto durante el primer año y forma la corona de la planta; de esta nacen numerosas hojas anchas, que tienden a tener una coloración violácea cuando la planta está próxima a madurar (Caiza, 2017)

Tabla 3.1 Clasificación taxonómica de la remolacha

Clasificación taxonómica	
Reino	Vegetal
División	Spermatophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Arquiclamidea
Orden	Centrospermae
Familia	Chenopodiaceae
Genero	<i>Beta</i>
Especie	<i>vulgaris</i>
Nombre científico	<i>Beta vulgaris</i> , L
Nombre común	Remolacha, Betabel

3.1.1 Botánica y Morfología de la remolacha, variedad Boro F1 (remolacha de mesa)

Según la sociedad cooperativa general agropecuaria, en la remolacha durante el primer año se pueden distinguir en la planta cultivada tres partes principales: Raíz, corona y hojas, (Moreiras et al., 2013).

Raíz: Pivotante, de forma cónica o tronco-cónica. A los lados se encuentran dos surcos, uno frente a otro, en los que nacen raicillas abundantes. Son los llamados surcos sacaríferos. Está constituida aproximadamente por un 75% de agua y un 25% de materia seca.

Corona: Parte de la remolacha donde se insertan las hojas. Es una zona que carece totalmente de azúcar y por eso se elimina junto con las hojas.

Hojas: Son pecioladas, ovales-acorazonadas u ovales-romboidales. El limbo es rugoso y abarquillado. En cuanto al porte, las más jóvenes se conservan erguidas y, a medida que pasa

el tiempo y nacen nuevas hojas, las más viejas se van cayendo, llegando las más externas a quedar apoyadas en el suelo. Se producen por encima de sesenta hojas a lo largo del primer año de vida de la remolacha.



Figura 3. 1 Partes de la remolacha, adaptado de (Moreiras et al., 2013)

La remolacha de mesa es de ciclo mucho más rápido que la remolacha azucarera, prefiere los climas templados y húmedos, aunque resiste tanto el calor como el frío. La mejor calidad la alcanza cuando su cultivo se realiza en períodos fríos. Esta variedad posee una raíz profunda, grane y carnosa que crece en la planta, se trata de una raíz esférica de forma globosa, con un diámetro entre 5 y 10 cm y puede pesar entre 80 a 200 gramos.

La pulpa suele ser de color rojo oscuro y puede presentar en ocasiones círculos concéntricos de color blanco, el sabor es dulce debido a que se trata de una raíz en la que se acumulan gran cantidad de azúcares

3.1.2 Cultivo de remolacha en Nicaragua

En Nicaragua se cosecha la remolacha de mesa en el departamento de Matagalpa principalmente, con un rendimiento de 70 quintales por cada media manzana cultivada, y es distribuida en los mercados de Matagalpa, Estelí, Managua, entre otros, según reportes del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria, (INTA, 2018).

3.1.3 Composición química y nutricional

La remolacha es un alimento de moderado contenido calórico, ya que, tras el agua, los carbohidratos son el componente más abundante, lo que hace que esta sea una de las hortalizas más ricas en azúcares. Es una buena fuente de fibra.

De sus vitaminas se destacan los folatos y ciertas vitaminas del grupo B, como B1, B2, B3 y B6. La vitamina B2 o riboflavina se relaciona con la producción de anticuerpos y de glóbulos rojos y colabora en la producción de energía. La vitamina B3 o niacina colabora con el funcionamiento del sistema digestivo. La vitamina B6 participa en el metabolismo celular y en el funcionamiento del sistema inmunológico (Ortega, 2011).

De acuerdo a un estudio citado por Urbano (2014), el consumo de jugo o zumo de remolacha podría reducir la presión arterial y es muy útil como desintoxicante y depuradora de la sangre. El tamizaje fotoquímico de la remolacha roja (*Beta vulgaris*) muestra la presencia de sacarosa,

pigmentos (fundamentalmente betalaína), colina, glutamina, vitaminas A, B y C, saponósidos y fitoestrógenos. Se muestra en tabla 5.2 la composición química de la remolacha (*Beta vulgaris*).

3.1.4 Efectos adversos o tóxicos

Generalmente la remolacha es muy bien tolerada en el ser humano, aunque deberán tomarse algunos recaudos en aquellos casos en que se observen trastornos intestinales de tipo diarreico o en presencia de hipotiroidismo, debido a la presencia de glucosinolatos. No se han observado signos de intolerancia, adversidad ni cambios en los parámetros hematológicos de pacientes asténicos tratados durante 9 días con 120 ml/día de jugo de raíz de remolacha.

Tabla 3.2 Composición química de *Beta vulgaris* para cada 100 gramos comestibles

Composición	Cantidad	Composición	Cantidad
Agua	87.5 g	Magnesio	23 mg
Energía	43 kcal	Hierro	0.91 mg
Grasa	0.17 g	Zinc	0.35 mg
Proteínas	1.61 g	Vitamina C	4.9 mg
Carbohidratos	9.56 g	Vitamina E	0.300 mg
Fibra	2.58 g	Vitamina A	36 IU
Potasio	325 mg	Vitamina B2	0.040 mg
Sodio	78 mg	Vitamina B6	0.067 mg
Fosforo	40 mg	Niacina	0.334 mg
Calcio	16 mg	Folacina	109 mcg

Fuente:(Moreiras et al., 2013)

3.1.5 Consumo y uso de la remolacha industrialmente

La remolacha es aún muy poco industrializada, para sus usos se ha utilizado por partes de la hortaliza y en dependencia de las costumbres ancestrales.

Raíz fresca: Esta se consume en fresco para preparar ensaladas y refrescos combinados con limón, se cocina como vegetal en ensaladas.

Raíz procesada: Es utilizada para la extracción de sacarosa y fabricación de azúcar, se pueden obtener subproductos del procesamiento que dan lugar a la obtención de alcoholes, levaduras para la industria panadera y para la industria farmacéutica.

Generalmente, la variedad remolacha forrajera es utilizada para la alimentación de ganado, la pulpa es la parte que se utiliza para la preparación de melazas como suplemento.

La remolacha deshidratada y rojo concentrados de zumo, son aplicables como pigmentos rojos naturales que son solubles en el agua en muchos sistemas de alimentos y se utilizan como colorantes naturales para mejorar el enrojecimiento de diferentes productos tales como productos lácteos, helados, mermeladas, tomate en pasta, bebidas y postres.

3.2 Colorantes

Los colorantes son sustancias que cuando se aplican a un alimento, fármaco o cosmético, o para el cuerpo humano, es capaz (solo o por medio de reacciones con otras sustancias) de impartir color.

Son compuestos químicos que imparten color, pueden ser definidos como las sustancias obtenidas de los vegetales, animales o minerales, o por síntesis, empleada para impartir o acentuar el color de los alimentos (Badui, 2006)

3.2.1 Colorantes Naturales

Son aquellos colorantes exentos de certificación para pureza química por parte de la FDA, que se obtienen de fuentes naturales como vegetales, animales o minerales. Ejemplos de éstos son los carotenoides, clorofilas, antocianinas, flavonoides y betalaínas, entre otros (Wissgott and Bortlik, 1996).

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales, son permitidos sin restricciones.

Los colorantes naturales se pueden dividir en los siguientes grupos:

Colorantes naturales: Productos que se adicionan a los alimentos para proporcionarles un color específico y hacerlos más agradables a la vista.

Tintes naturales: Son los productos utilizados para el teñido de telas, madera, fibras y cuero.

Pigmentos naturales: Compuestos responsables del color de una planta, utilizados principalmente por la industria farmacéutica.

Al escoger una planta para extraer su colorante, se debe considerar: que sea disponible a un precio razonable, proceso de extracción no muy costoso y técnicamente factible con el menor impacto ambiental obteniendo un producto que satisfaga las necesidades industriales y los requerimientos legales. Los colorantes naturales son considerados inocuos y tienen menos limitaciones para usarse que los sintéticos, (Marín and Mejía 2012).

3.2.2 Clasificación de los colorantes naturales

Hay considerable interés en el desarrollo de los colorantes naturales, esto se debe, por un lado, a la necesidad de expansión de la variedad de colorantes y por otro a la implicación de que son naturales y por ello, seguros. Los colorantes naturales son objeto de más desarrollo que los sintéticos ya que 356 patentes fueron para colorantes naturales, mientras que para colorantes sintéticos solamente 71 han sido patentizados (Córdoba, 2014)

Según Llamo et al. (2015), estos colorantes pueden clasificarse según su naturaleza química.

3.2.3 Regulación de colorantes

La Unión Europea se basa en tres principios importantes, protección de la salud del consumidor, prevención de fraudes, eliminar barreras de comercialización.

La tabla 3.4 muestra los colorantes que han sido permitidos por la *Food Drug Administration* (Fennema, 2000).

Las autoridades legislativas de la antes Comunidad Económica Europea (CEE) intentaron uniformizar la legislación para aditivos colorantes de los países del Mercado Común para lo cual a cada colorante permitido se ha asignado la letra “E” seguido por un número.

En Estados Unidos a partir de 1938, el uso de colorantes está controlado por la *Food Drug Administration* (FDA) y se refiere a dos categorías de colorantes: colorantes certificados y colorantes exentos de certificación. Para los colorantes certificados el proceso de certificación consiste en realizarles análisis químicos, bioquímicos, toxicológicos y médicos, los cuales deben garantizar la salud de los consumidores.

Tabla 3.3 Clasificación de los colorantes naturales según su naturaleza química.

Naturaleza química	Algunos ejemplos	Color predominante	Absorción (nm)
Tetrapirroles (lineales y cíclicos)	Ficoblinas	Azul-verde Amarillo-rojo	610-650 Fitocianinas 540-570 Ficoeritrinas 640-660
	Clorofilas	verde	
Carotenoides	Carotenoides	Amarillo-anaranjado	400-500
Flavonoides	Flavonas	Blanco- crema	310-350
	Flavonoles	Amarillo-blanco	330-560
	Chalconas	Amarillo	340-390
	Auronas	Amarillo	380-430
	Antocianinas	Rojo-azul	480-550
Xantonas	Xantonas	Amarillo	340-400
Quinonas	Naftoquininas	Rojo-azul-verde	420-460
	Antraquininas	Rojo-purpura	
Derivados Indigoides e índoles	Indigo	Azul-rosado	470-485
	Betalainas	Amarillo-rojo	Betacianinas 540 Betaxantinas 480
Pirimidinas sustituidas	Pterinas	Blanco-amarillo	
	Flavinas	Amarillo	
	Fenozacinas	Amarillo-rojo	
	Fenazinas	Amarillo-purpura	

3.2.4 Importancia del color en los alimentos

El color es uno de los parámetros más importantes en la industria de alimentos, resulta ser un índice de calidad, como puede alertar cuando un producto está deteriorado o ha sufrido algún tipo de cambio en su composición, así como también puede ser un indicativo de su aporte nutricional e indica y anticipa otras compensaciones como el olor y sabor (Moreno, 2017).

Tabla 3.4 Colorantes naturales permitidos por la FDA.

Nombre	No de la EE	CEE	CANADA	JAPON
Antocianinas, zumo concentrado	E163	+	+	+
Pigmento de remolacha (rojo remolacha)	E162	+	+	+
Negro carbón	E153	+	+	+
β -apo-8-Carotenal	E160e	+b	+	-
Extracto de bija	E160b	+	+	+
β - Caroteno	E160a	+	+	+
Clorofila	E140	+d	+	+
Complejos de cobre de la clorofila	E141	+	-	+
Caramelo	E150	+	+	+
Cochinilla	E120	+d,e	+	+
Riboflavina	E101	+	+	+
Curcumina	E100	+	+	+

(+) Permitido su uso en los alimentos en algunos países limitado a alimentos específicos; Prohibido para uso en alimentos. ^b Prohibido en Portugal. ^c Prohibido en Australia y Noruega. ^d Prohibido en Finlandia. ^e Prohibido en Suecia.

3.3 Colorantes naturales presentes en la remolacha

A partir de la remolacha se extrae el pigmento natural, que le confiere su color rojo característico, estos pigmentos son vacuolares hidrosolubles llamados betalainas.

3.3.1 Betalainas

El término betalainas se refiere a un grupo de aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles, con estructuras de glucósidos, derivados del ácido betalámico, y que se han dividido en dos grandes grupos: los rojos o betacianinas, y los amarillos o betaxantinas.

Las betalainas son uno de los pigmentos autorizados como aditivos por la FDA de Estados Unidos y también está admitido en la Unión Europea con la designación de E-162, comercializándose de dos maneras, como polvo de remolacha, que incluye el pigmento y estabilizantes como azúcares y proteínas y antioxidantes, y como extracto líquido concentrado (García, 2008).

Wohlpart y Mabry introdujeron por primera vez el nombre “betalaina” durante 1968 para describir estos pigmentos como derivados del ácido betalámico identificado en la planta de remolacha (*Beta vulgaris*), la cual es la mayor fuente comercial de betalainas (Orellana, 2015).

A inicios de 1876, Bischoff en su tesis hace mención a ciertas antocianinas como pigmentos vegetales que contienen nitrógeno, pero son similares a verdaderas antocianinas. Debido a estas similitudes, los pigmentos, si son rojos se ha mencionado en la literatura como “antocianinas nitrogenadas” o “betacianinas”, y son amarillos como “flavocianinas” o “betaxantinas”. Para lograr la uniformidad en la nomenclatura, Wyler y Dreiding sugirieron que los pigmentos rojos fueran conocidos como betacianinas y los amarillos como betaxantinas (Thimmaraju, 2005).

3.3.2 Estructura

La estructura de las betalaínas es diferente a la de otros pigmentos encontrados en el reino vegetal, ya que ésta contiene nitrógeno, su estructura básica está formada por la condensación de una amina primaria o secundaria como el triptófano y un aldehído llamado ácido betalámico.

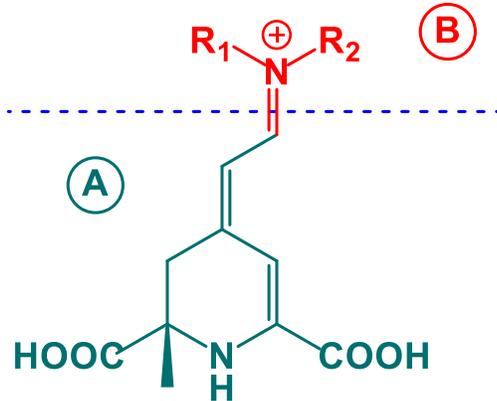


Figura 3.2 Estructura química de la betalaína (García, 2008).

3.3.3 Propiedades físicas

Las betalaínas absorben fuertemente la luz, el valor de la absorptividad molar es de 1,120 para la betanina (una betacianina) y 750 para vulgaxantina (una betaxantina), lo cual sugiere una fuerte y alta capacidad tintórea en estado puro (Fennema, 2000).

Se ha observado que las betacianinas exhiben un máximo de absorción de luz aproximadamente a 537-538 nm y las betaxantinas en 480 nm (Von Elbe et al., 1981)

3.3.4 Propiedades químicas

Según De Ugaz (1997), las betalaínas son compuestos orgánicos solubles en agua, tienen un peso molecular entre 400 y 500 g/mol.

3.3.5 Clasificación de las betalaínas

Las betalaínas se clasifican en dos grupos las betacianinas y betaxantinas, a la fecha se conocen alrededor de 50 betacianinas y de 25 betaxantinas y todas ellas poseen la misma estructura básica. En la figura 3.3 se muestran ejemplos de estructuras para cada familia de compuestos colorantes.

3.3.6 Betacianinas

Las betacianinas son pigmentos de color rojo violeta, son más estables que las betaxantinas, se consideran glucósidos, su principal componente es la betanina (hasta un 95% del total de las betacianinas en la remolacha). Todas las betacianinas pueden ser derivadas de dos núcleos básicos, la betanidina y la isobetanidina, por glicosidación de uno de los grupos hidroxilos localizados en la posición cinco o seis (Mancha et al., 2019).

La betacianina más conocida es la betanina. La betacianina se isomeriza fácilmente a isobetacianinas por calentamiento. En medio alcalino se hidroliza produciendo ciclodopa-5-0-glucósido y ácido betalámico (Herbach et al., 2006).

3.3.7 Betaxantinas

Empleando las palabras de Herbach et al. (2006), las betaxantinas son pigmentos amarillos relacionados estructuralmente con las betacianinas. Se caracterizan por tener grupos R y R' que no extienden la conjugación del cromóforo 1,7-diazaheptametino, de la remolacha se han aislado dos betaxantinas llamadas vulgaxantina I y II, Ambas difieren en que la prolina ha sido sustituida por glutamina y ácido glutámico respectivamente.

3.4 Identificación y Cuantificación de betalaínas

Para identificar y cuantificar las betalaínas se emplea la espectrofotometría, esta técnica permite realizar conjuntamente un análisis cualitativo y cuantitativo (Von Elbe et al., 1981)

La principal ventaja de esta técnica es que incluso se puede determinar trazas de sustancias de una manera sencilla y exacta, que no es posible hacerlo con los métodos clásicos de análisis como son los procedimientos gravimétricos y volumétricos.

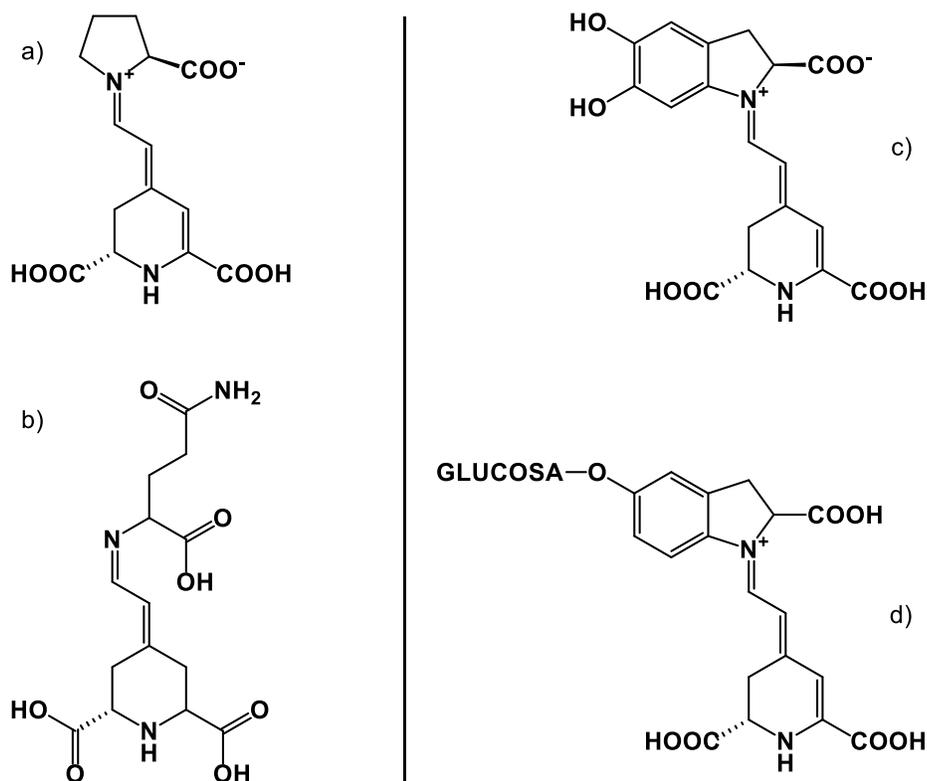


Figura 3.3 Estructuras químicas de derivados de betaxantina (izquierda) y de betacianina (derecha): (a) indicaxantina, (b) vulgaxantina, (c) betanidina, (d) betanina.

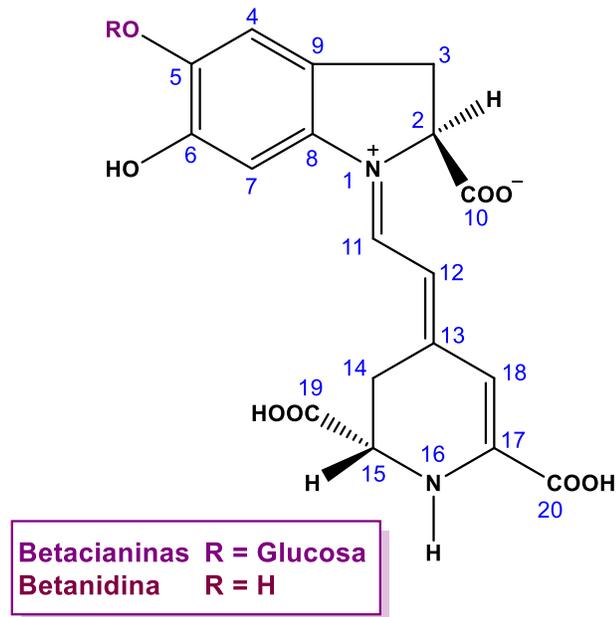


Figura 3.4 Estructura química de las betacianinas (Mancha et al., 2019)

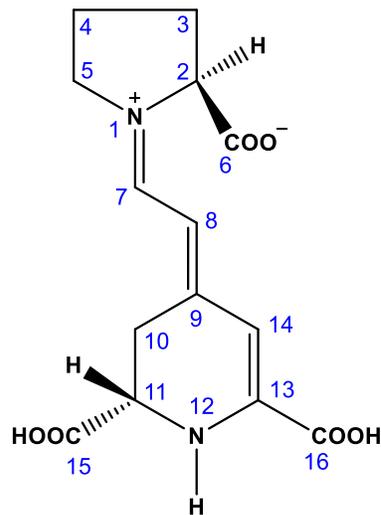


Figura 3.5 Estructura química de las betaxantinas (Herbach et al., 2006)

3.4.1 Espectrofotometría UV Visible

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro (véase en la fig.3.6), en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Díaz et al., 2010).

En la práctica, lo que se mide no es propiamente la intensidad de luz absorbida sino otras magnitudes relacionadas con ella como son: la transmitancia y la absorbancia.

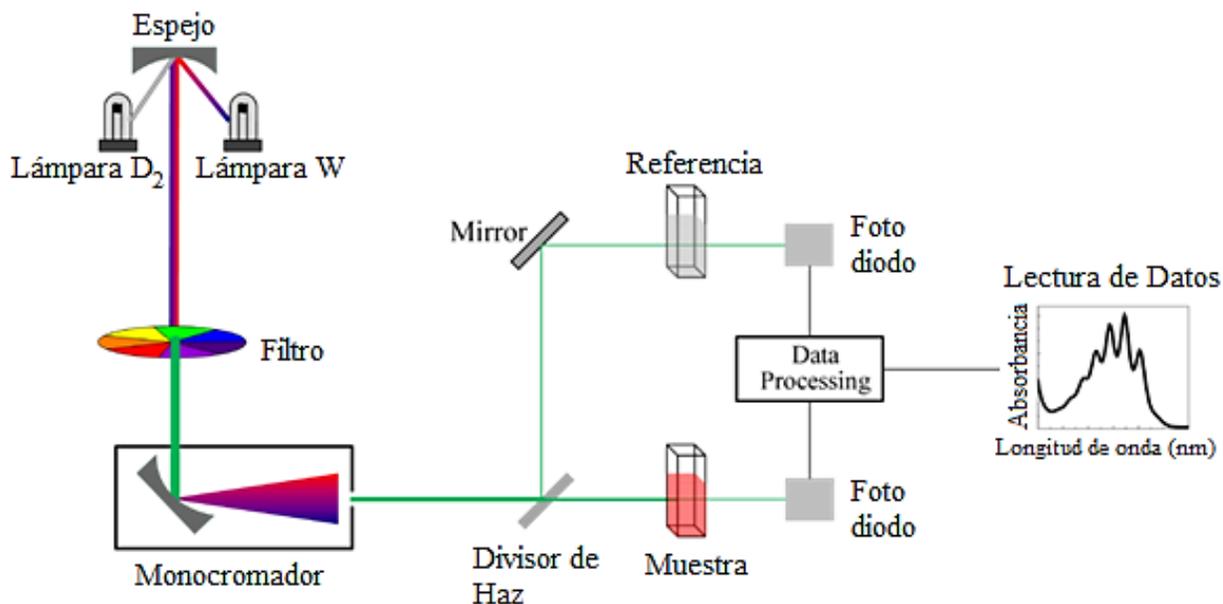


Figura 3.6 Esquema de un Espectrofotómetro UV-VIS

La **absorbancia (A)** es un concepto más relacionado con la muestra puesto que nos indica la cantidad de luz absorbida por la misma.

3.4.2 Obtención de un espectro de absorción

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida (ϵ) a diferentes valores de λ .

A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia (λ_{\max}), dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.

De acuerdo con su composición química particular, cada sustancia absorbe luz de diferentes colores, es decir, absorbe determinadas longitudes de onda del espectro luminoso. Se dice, por lo tanto, que cada sustancia tiene un espectro de absorción propio, conocer el espectro de absorción de una sustancia nos permite medir su concentración en una solución.

En las betacianinas, la conjugación se extiende a un sustituyente aromático y el cromóforo muestra un desplazamiento batocrómico hasta 540 nm, las betaxantinas absorben a una longitud de onda máxima de 480 nm (Herbach et al., 2006, Barzola et al., 2018).

La figura 3.7 representa los dos picos más altos de absorbancias máximas, donde se identificaron betacianinas y betaxantinas, los pigmentos presentes en un extracto acuoso obtenido a partir de buganvilla (Benites, 2015).

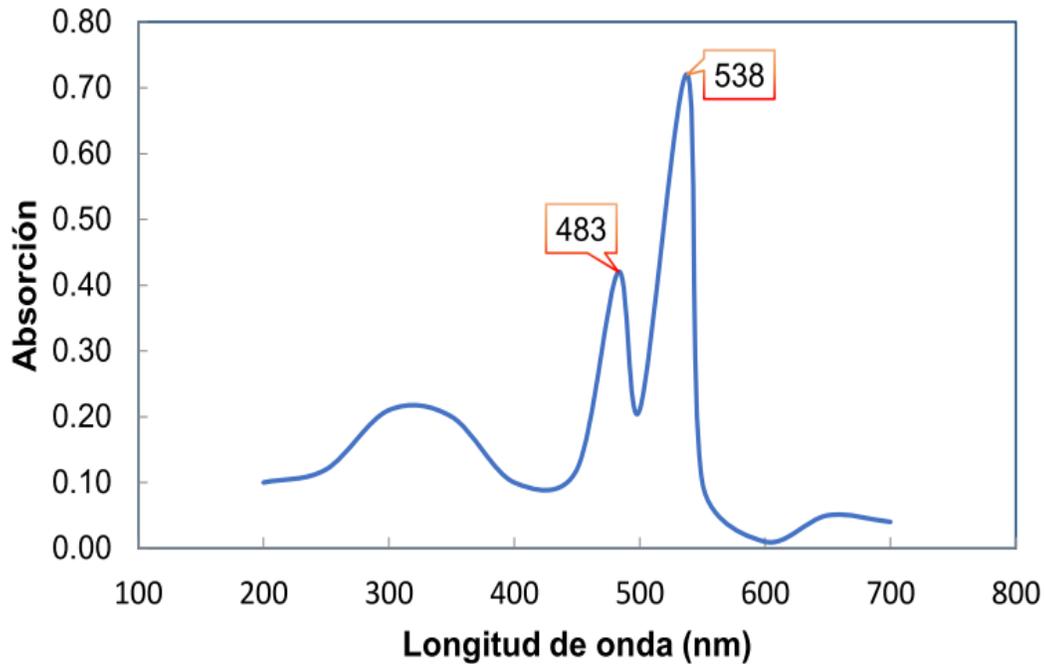


Figura 3.7 Identificación de betacianinas y betaxantinas mediante un espectro de absorción

3.5 Determinación del contenido de betalaínas

Para la conversión de las unidades de absorbancia en unidades de concentración, y para cuantificar tanto la betacianinas como betaxantinas contenidas en la remolacha se usa la siguiente expresión (Castellanos and Yahia, 2008).

$$CB_c = \frac{A_{538} \times MW_{Bc} \times V \times DF}{\epsilon \times L \times W_s} \times 100 \quad (3.1)$$

$$CB_x = \frac{A_{483} \times MW_{Bx} \times V \times DF}{\epsilon \times L \times W_s} \times 100 \quad (3.2)$$

Donde:

- CB_c, CB_x = Contenido de betacianina o betaxantina [mg/100g remolacha].
- A₅₃₈ y A₄₈₃ = Absorbancia a 538 nm para betacianinas y 483 nm para betaxantinas.
- FD = factor de dilución de la muestra que se lee en el espectrofotómetro.
- MW = peso molecular de los compuestos betalámicos (betacianina = 550 g/mol y betaxantina = 308 g/mol).
- V = volumen inicial del extracto en ml.
- ε = coeficiente de extinción molar L/mol*cm
- L = anchura de la cubeta (1cm).
- W_s = masa del sólido utilizada en la lixiviación.

Los valores de extinción molar (ε) son parámetros que definen cuán fuertemente las betalaínas absorben la luz a una dada longitud de onda, por lo que las longitudes para el caso de

betacianinas es 538 nm y para la betaxantinas es de 483 nm. Los valores de extinción molar son constantes para las betalaínas: 60000 L/mol*cm para las betacianinas y de 48000 L/mol*cm (Yizhong et al., 2001).

3.6 Factores que gobiernan la estabilidad de las betalaínas

Uno de los problemas mayores que tienen los colorantes naturales, encontrados hasta el momento es su baja estabilidad. En el caso de las betalaínas, las betaxantinas se degradan con mayor rapidez que las betacianinas, además, por su color amarillo en general se enmascaran con las betacianinas u otros compuestos presentes. Todas las reacciones de degradación se aceleran por la acción catalítica de algunos metales, principalmente el cobre.

Al igual que otros pigmentos naturales, las betalaínas se ven afectadas por diversos factores que se mencionan a continuación.

3.6.1 Efecto del pH

El cambio de color con el pH es a nivel general, menos marcado que el que presentan las antocianinas. El color permanece inalterado en un intervalo de pH de 3 a 7; por debajo del pH 3.0 el color cambia a violeta, y su intensidad decrece. Por encima del pH 7.0, el color es más azulado debido a un efecto batocrómico o desplazamiento hacia el rojo, la mayor intensidad de azul se observa a un pH 9.0 (Badui, 2006).

Las betalaínas, al ser ionizables en medio ácido, sufren cambios de color tanto a un pH por debajo de 3.5 pero no se hidrolizan por lo cual se pueden utilizar para alimentos ácidos y su máxima estabilidad está entre pH 5 y 6 (Wilson, 2017).

Muñoz (2003), en su investigación de antocianinas y betalaínas en colorantes naturales de betarraga, reporta valores de estabilidad máxima a pH 4 con un contenido de 1.32 mg/ml de extracto.

3.6.2 Efecto de la temperatura

Indudablemente es el factor que más afecta la estabilidad de las betalaínas, acelerando las reacciones de hidrólisis que dan como productos el ácido betalámico incoloro y otros productos de color marrón (Wilson, 2017).

Las betalaínas se muestran estables a temperaturas inferiores a 25 °C y en condiciones de pH entre 3 y 7, la presencia de oxígeno y luz en cambio, las desestabilizan (Benites, 2015).

En relación a la influencia de la temperatura sobre la estabilidad de las betalaínas se ha descrito que el calentamiento produce oscurecimiento oxidativo, (Moreno et al., 2002).

3.6.3 Efecto de secuestrantes

De acuerdo con Huang and Von Elbe (1987), en solución incrementa la estabilidad de las betalaínas. El efecto del pH dependiente siendo más efectivo entre pH 2 y 5. El mecanismo por el cual el ácido etilendiaminotetraacético reduce la oxidación de las betalaínas puede ser explicado en parte por su habilidad para quelar cationes metálicos polivalentes. También protege a las betalaínas por directa interacción con su centro electrofílico.

3.7 Cinética de degradación de betalaínas

Los modelos cinéticos constituyen una importante herramienta para la descripción cuantitativa de los cambios que ocurren en un alimento como una función de tiempo. El conocimiento de los parámetros cinéticos, como el orden de reacción, la constante de velocidad y la energía de activación, es vital para predecir el comportamiento de los componentes de alimentos y la optimización de procesos a fin de alcanzar la máxima calidad del producto alimenticio (Barzola et al., 2018)

En cuanto a la cinética de degradación, se ha demostrado que la velocidad de degradación de las betaninas responde a una cinética de primer orden, ya sea en los jugos, la pulpa, los polvos o en las soluciones modelos. De hecho, el color de las betaninas resulta más estable en los extractos que en las formas purificadas (Huang and Von Elbe, 1987).

Moreno and Betancourt (2007), señala que para determinar la degradación de las betalaínas (pigmento mayoritario) en el tiempo, se grafica la concentración de betalaínas totales en función de los días de almacenamiento.

Llamo et al. (2015), evaluó la cinética de degradación de compuestos fenólicos durante el proceso de cocción de dos variedades de quinua (pasankalla y collana). Encontrando que la degradación de fenoles y betalaínas siguen una cinética de primer orden, esto se puede evidenciar en la figura 3.8, mostrada a continuación.

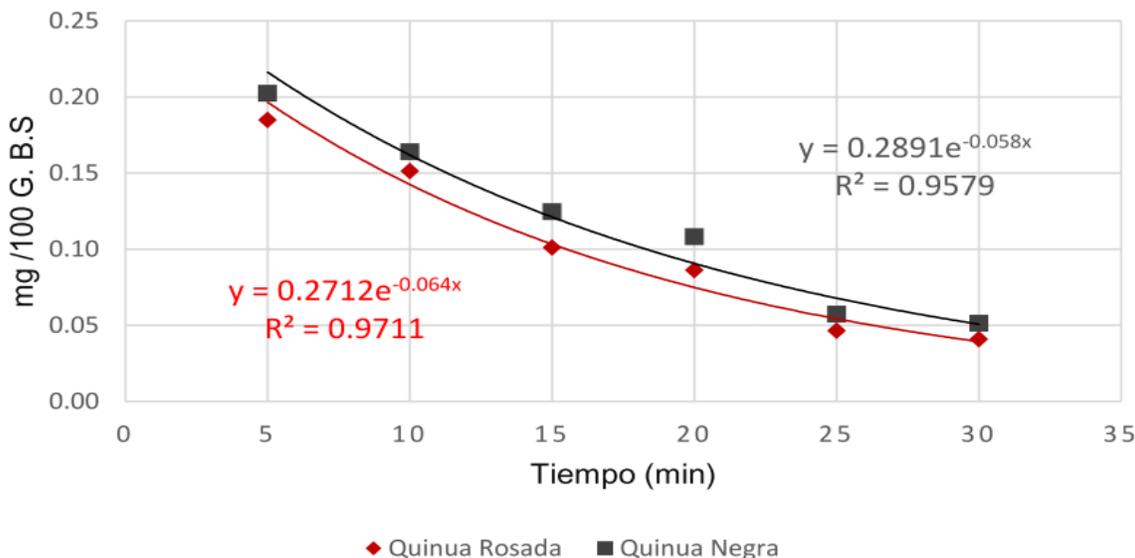


Figura 3.8 Cinética de la degradación de compuestos betalámicos (mg /100 g. b.s) de dos variedades de quinuas (rosada pasankalla y negra collana) en diferentes tiempos de cocción, Fuente: (Llamo et al. 2015)

En la figura 3.9 se muestran los procesos de degradación de betacianinas y betaxantinas de acuerdo al pH del medio, exposición al oxígeno, calor y enzimas. Puede observarse que estos colorantes pueden sufrir distintos tipos de degradación a varios compuestos intermedios como

el ácido betalámico o a otros productos que modifican totalmente el color inicial como las melanoidinas que pardean el color.

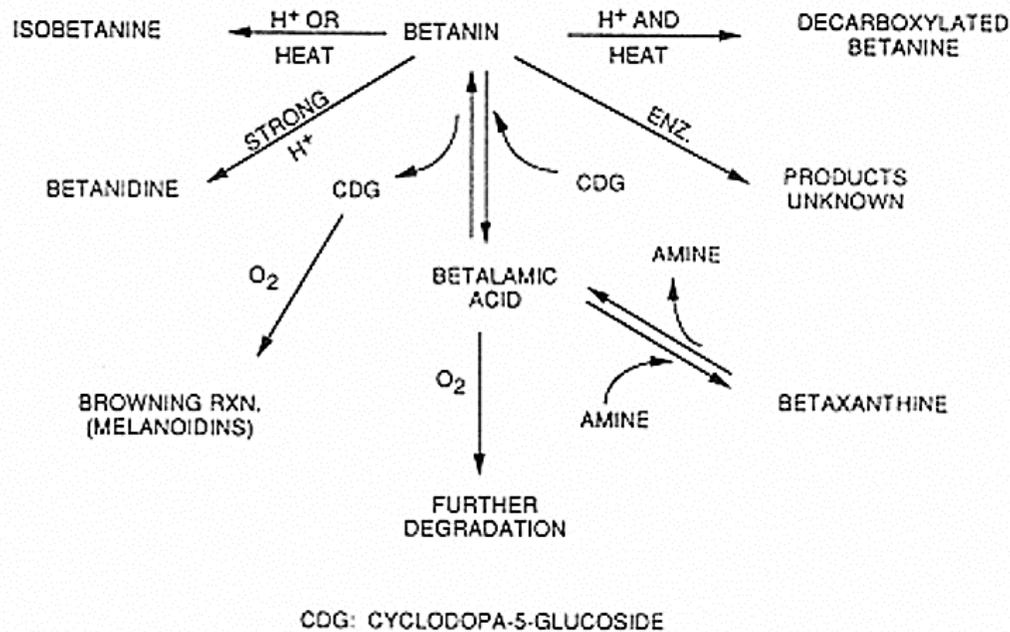


Figura 3.9 Mecanismos de degradación de betacianinas y betaxantinas según distintos factores (Fennema, 2000)

3.8 Rendimiento de betalaínas

Según Wilson (2017), el rendimiento de pigmentos es 0.04 – 0.21% en el caso de betacianinas y 0.02–0.14% para betaxantinas.

Orellana (2015), menciona que el contenido de betanina en la remolacha varía de 100 mg/100 g de producto fresco a 16-38 mg/100 gramos de producto vegetal seco.

3.9 Uso de las betalaínas en la industria alimentaria

Estudios de toxicidad y seguridad indican que las betalaínas pueden ser alternativas viables para colorantes sintéticos, sin embargo, por las limitaciones de su estabilidad, su uso se restringe a ciertos productos en los que el pigmento se conserva más fácilmente; es decir en alimentos que reciben mínimo tratamiento térmico durante el procesado y mínima exposición a luz y humedad durante su empaçado.

Las betalaínas en forma de extractos concentrados o liofilizados, se utilizan para modificar el color de una amplia variedad de productos. Estos aditivos denominados E-162 se adicionan en niveles de 0,1 a 1% basado en el peso del producto final y los encontramos en yogures, cremas o helados, pero también en salchichas y jamón cocido, pasando por galletas, dulces, zumos y productos secos y no se recomienda aplicar en alimentos como caramelos duros, productos de panadería y jugos, porque estos productos presentan inestabilidad (Castellanos and Yahia, 2008, Moreno et al., 2002).

Según Calvo (2018) los métodos de extracción de los pigmentos vegetales de su fuente original son muy variados, existen sistemas sólido-líquido como maceración, ultrasonido, microondas, lixiviación, entre muchos otros, que están disponibles para la extracción de estos compuestos. No hay un método universal de extracción mejor que los otros, pero sí se enfoca en reducir el tiempo de extracción, la cantidad de solventes, los costos de energía y los patrones de degradación.

3.10 Proceso de obtención de colorante de Beta vulgaris

En la figura 3.9 se muestran las operaciones unitarias que se realizarán durante la extracción de betalaínas de la remolacha.

3.11 Extracción sólido-líquido: lixiviación

La lixiviación es una operación de transferencia de masa, donde un disolvente o mezcla de estos, extraen selectivamente uno o varios solutos que se hallan dentro de una matriz sólida. El componente o componentes que se transfieren se denominan "solute" y el sólido insoluble se denomina "inerte", la operación recibe también el nombre de lixiviación (Palacios, 2008).

La lixiviación puede verificarse por métodos de contacto continuo o discontinuo. En la lixiviación discontinua, el disolvente y el sólido son inicialmente cargados en un recipiente. Se permite que haya contacto por un cierto tiempo, con o sin agitación, y finalmente se separan el extracto y el sólido agotado. Como se emplea una cantidad finita de disolvente, la extensión de la extracción estará limitada por el equilibrio sólido-líquido. Parte del extracto queda atrapado por el sólido por lo cual solo se lograra una remoción parcial del soluto (Ramírez, 1996).

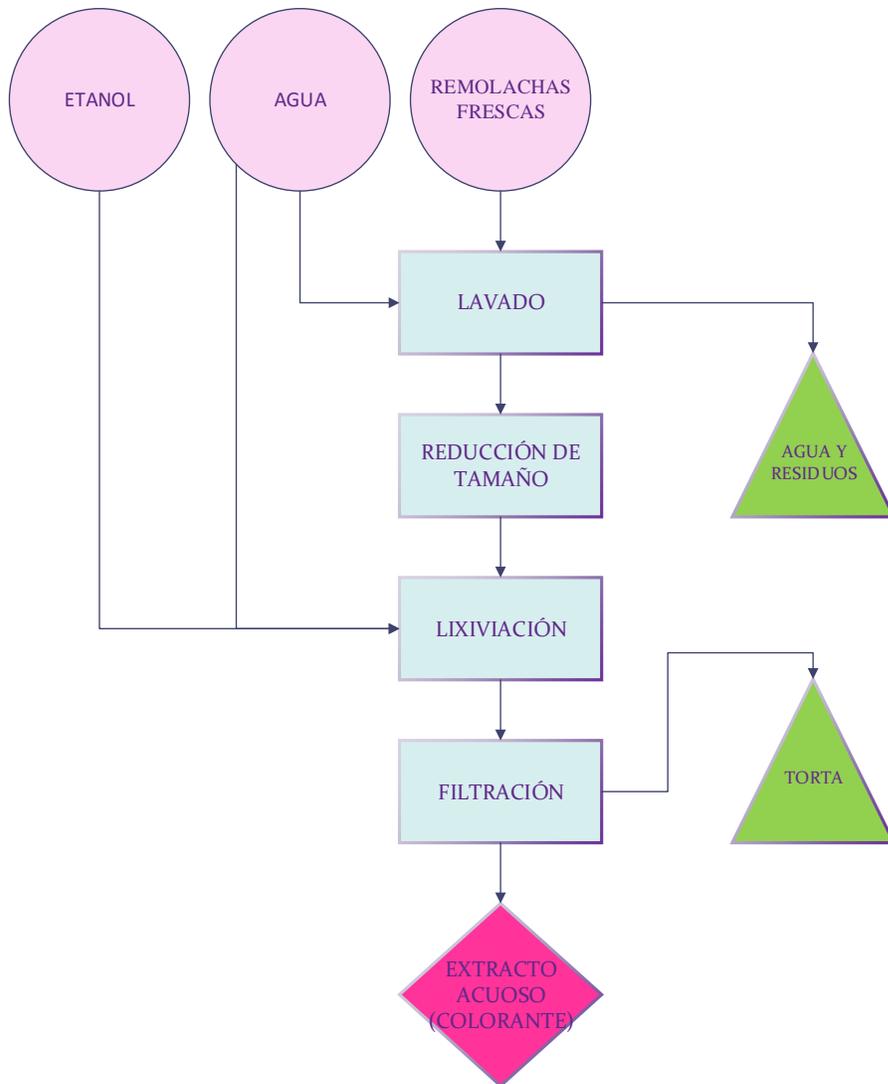


Figura 3.10 Flujograma de proceso para la obtención del colorante de *Beta vulgaris*, Fuente: Elaboración propia

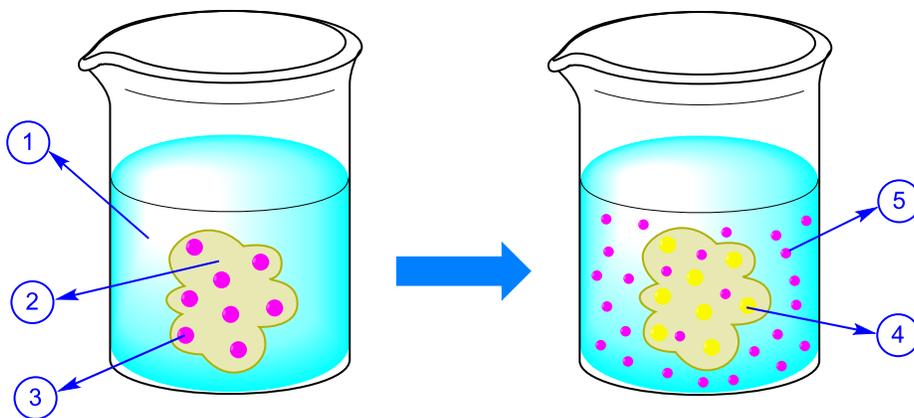


Figura 3.11 Esquema de la extracción sólido-líquido: 1 (solvente), 2 (matriz sólida), 3 (soluto), 4 (sólido inerte), 5 (mezcla soluto-solvente) Fuente: Elaboración propia

3.11.1 Factores que influyen en la lixiviación

Según Palacios (2008), la eficiencia en la extracción del soluto en materiales orgánicos, inorgánicos, animales y vegetales depende del tamaño de las partículas, del tipo de solvente, pH y la temperatura.

Temperatura de extracción

Las operaciones a temperaturas altas no pueden ser permisibles debido a las pérdidas inaceptables de solventes y por consideraciones de seguridad. Existe la necesidad de tener experiencia en la selección de una temperatura adecuada. Las temperaturas altas producen solubilidades superiores del soluto en el solvente y por consiguiente la concentración del soluto es alta en el extracto. Sin embargo, es necesario precisar que, en el tratamiento a temperaturas altas en el caso de algunos materiales de origen natural, como el café, té, remolachas, resulta una extracción excesiva de materiales no deseados.

Tamaño de partícula

El tamaño de la partícula afecta la velocidad de extracción de diversas maneras; cuanto más pequeño es el tamaño, mayor es el área de contacto entre el sólido y el líquido y por tanto mayor la velocidad de transferencia de masa; pero partículas en forma de polvo muy fino causan problemas de apelmazamiento, evitando de esta manera la transferencia de masa, por lo que es necesario determinar una granulometría adecuada.

Tipo de solvente

El solvente es una sustancia que puede disolver y producir con otra una mezcla homogénea, son producidos y utilizados en grandes cantidades bajo una gran variedad de denominaciones comerciales y químicas en casi todas las industrias. Las propiedades de un solvente como su punto de ebullición, densidad y viscosidad afectan su conveniencia y selectividad para efectuar un extracto más completo y barato del soluto deseado

Criterios de selección del solvente:

- De penetración fácil en las partículas.
- No higroscópico.
- No tóxico, ni cancerígeno para su uso en productos alimenticios.
- Bajo punto de ebullición.
- Ambientalmente seguro.
- Fácilmente recuperables para reciclaje.
- No corrosivo ni inflamable.
- Económico. Estar siempre disponible en el mercado.

3.11.2 Solventes utilizados en la lixiviación de Beta Vulgaris

La utilidad de los solventes varía mucho en función de las propiedades que presentan y la cantidad a utilizar en un determinado proceso. Yurivilca (2014) y (Benites, 2015), coinciden en que el mejor solvente para la extracción de betalainas es el agua destilada ya que muestra un mayor rendimiento en la extracción.

El agua destilada tiene las ventajas de ser natural, económica, no inflamable ni tóxico, es un excelente disolvente ya que las moléculas polares de agua destilada tienden a separar sustancias iónicas, como el cloruro de sodio, en sus iones constituyentes, estas se aglomeran alrededor de

los iones con carga y los separan unos de otros, es por ello que a este se le considera uno de los mejores solventes en la extracción de colorantes; pero las desventajas es que no es muy selectiva, además fácilmente alterable por la acción de microorganismos y presenta el inconveniente de tener una baja solubilidad con las resinas.

Agua destilada

El agua destilada es aquella sustancia cuya composición se basa en la unidad de moléculas de H_2O y ha sido purificada o limpiada mediante destilación, es considerado como disolvente polar prótico ya que contienen un enlace del O-H, este es considerado como la mejor elección como disolvente, desde un punto de vista medioambiental, por su facilidad para formar puentes de hidrógeno hacen que el agua destilada sea un excelente disolvente.

Etanol

El etanol es conocido como alcohol etílico, es un alcohol que se presenta en condiciones normales de presión y temperatura como un líquido incoloro, es considerado como un disolvente polar prótico ya que contienen un enlace del O-H etanol (CH_3-CH_2-OH). Este tiene las ventajas de ser más selectivo, poseer cierta acción antimicrobiana e inactivar enzimas; pero las desventajas es que no es económico.

La ventaja de usar etanol radica en que permite la extracción de ciertas moléculas polares con grupos hidrófobos y puede favorecer la extracción de betalaínas dada su estructura molecular. En este estudio se analizará el efecto del solvente primeramente realizando las extracciones con etanol y agua puros y luego se buscará el valor de concentración más adecuado en la disolución etanol – agua que permita una extracción con altas concentraciones de colorantes y a la vez se reduzcan los costos del proceso en caso de no requerir etanol puro como solvente.

4 HIPÓTESIS

Hipótesis nula 1

H₀₁: Ninguno de los factores influyen significativamente en el contenido de betalaínas durante el proceso de extracción.

Hipótesis alternativa 1

H_{a1}: Al menos uno de los factores influye de manera significativa en el contenido de betalaínas durante el proceso de extracción.

Hipótesis nula 2

H₀₂: Ninguna de las condiciones específicas de lixiviación favorecen el contenido de betalaínas presentes en el colorante de remolacha.

Hipótesis alternativa 2

H_{a2}: Al menos una de las condiciones específicas de lixiviación favorece el contenido de betalaínas presentes en el colorante de remolacha.

Hipótesis nula 3

H₀₃: En ninguno de los factores a estudiar (tiempo de almacenamiento, tratamiento térmico y pH) la degradación de las betalaínas responde a una cinética de primer orden

Hipótesis alternativa 3

H_{a3}: En al menos uno de los factores a estudiar (tiempo de almacenamiento, tratamiento térmico y pH) la degradación de las betalaínas responde a una cinética de primer orden

5 METODOLOGÍA

El presente acápite aborda la metodología que fue utilizada para llevar a cabo la fase experimental, lo que corresponde al estudio de los factores y niveles que incidieron en la operación de extracción, así como la estimación de la cinética de degradación de las betalaínas presentes en el colorante extraído con respecto al tiempo de almacenamiento, tratamiento térmico y pH.

5.1 Material vegetal

En esta investigación se consideró estudiar la remolacha (*Beta vulgaris*), variedad Boro F1 o remolacha de mesa por su excelente color externo e interno, para la extracción de colorante natural, debido a que diversos estudios evidencian que es una excelente fuente de betalaínas, quienes constituyen indudablemente una opción interesante dado su gama de colores, desde el anaranjado amarillento al rojo violáceo. Por otra parte, hay evidencia creciente de interesantes actividades biológicas, entre ellas su actividad antioxidante.

5.1.1 Acondicionamiento del material vegetal

Las remolachas frescas fueron recolectadas en un mercado local en la ciudad de Managua, el colorante se extrajo de las cascaras y pulpa de la remolacha con el fin de darle el máximo provecho a la materia prima.

5.2 Identificación de los factores que influyen significativamente en la extracción colorante

Para lograr este objetivo se realizó un diseño experimental por el método cribado. Se estudiaron los factores considerados más importantes, de acuerdo a la revisión bibliográfica, una vez identificados estos factores se procedió a determinar las condiciones de extracción que favorecen el contenido de betalaínas.

La tabla 5.1 muestra los factores que se identificaron y los niveles propuestos para realizar el diseño experimental

Tabla 5.1 Tabla de factores y niveles propuestos para identificar los factores que influyen significativamente en el contenido de betalaínas

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Temperatura	30	50
Tiempo	1 h	2h
Agitación	60 rpm	120 rpm
Disolvente	Agua destilada	Etanol
Preparación de la muestra	Rayada	Láminas
Secuestrantes	Sin secuestrantes	EDTA
Parte de la raíz	Cáscara	Pulpa

Haciendo uso del software *Minitab® 18*, y con los datos contenidos en la tabla 5.1 se ha realizado un diseño experimental de cribado, donde se seleccionó un diseño Plackett-Burman de resolución III con 12 experimentos ya que al incluir más experimentos se pueden obtener resultados más confiables.

La tabla 5.2 muestra el número de experimentos que se hicieron de manera aleatoria.

Tabla 5.2 Diseño experimental de Cribado utilizado para la identificación de los factores que influyen significativamente en el contenido de betalaínas.

No. Exp.	Temp. (°C)	Tiempo (horas)	Agitación (rpm)	Disolvente	Prep. Muestra	Secuestrante	Parte de la raíz
4	50	1	120	Etanol	Rayado	EDTA	Cáscara
2	50	2	60	Etanol	Rayado	Ninguno	Cáscara
3	30	2	120	Agua	Laminas	Ninguno	Cáscara
6	50	2	120	Agua	Laminas	EDTA	Cáscara
8	30	1	120	Etanol	Laminas	Ninguno	Pulpa
12	30	1	60	Agua	Rayado	Ninguno	Cáscara
10	50	1	60	Agua	Laminas	EDTA	Pulpa
7	30	2	120	Etanol	Rayado	EDTA	Pulpa
5	50	2	60	Etanol	Laminas	Ninguno	Pulpa
1	50	1	120	Agua	Rayado	Ninguno	Pulpa
9	30	1	60	Etanol	Laminas	EDTA	Cáscara
11	30	2	60	Agua	Rayado	EDTA	Pulpa

5.3 Etapas del proceso para la obtención del colorante natural

En la figura 3.9 mediante un flujograma se representa el proceso para la obtención del extracto acuoso colorante de remolacha (*Beta vulgaris*). Para esta primera fase experimental se estableció como base 25g de material vegetal (remolacha), los parámetros de extracción de cada uno de los 12 experimentos que se realizaron están descritos en la tabla 5.2 fueron realizados en ese mismo orden aleatorio.

5.3.1 Selección y lavado

Se seleccionaron las remolachas más frescas, sin golpes y las que presentaron color uniforme, luego se procedió a lavarlas con agua para eliminar partículas indeseables, una vez lavadas fueron secadas con papel absorbente.

5.3.2 Reducción de tamaño

Se realizó la reducción de tamaño del material vegetal, para la cáscara y pulpa, con un rayador plástico, y los cortes en forma de láminas fueron realizados con cuchillo acerado, (Anexo, figuras C-3 Y C-4).

Del material vegetal rayado y en láminas se tomaron y pesaron 25 ± 0.1 gramos y se colocaron en matraces de 250 ml.

5.3.3 Lixiviación

La etapa de lixiviación se realizó en una plancha de calentamiento con agitación, Isotemp Fisher Scientific. Se hizo uso de una relación de 1:5, el alcohol etílico se preparó al 80%, tomándose como referencias estudios anteriores por Yurivilca (2014) y Benites (2015).

Cada uno de los experimentos se realizó a sus debidas condiciones de extracción y en el mismo orden descritas en la tabla 5.2. Las muestras de 25 ± 0.1 gramos del material vegetal se depositaron en matraces de 250 ml y se pusieron en contacto con el disolvente correspondiente. Los matraces fueron puestos en baño maría cada uno a sus respectivas condiciones de extracción. Para los experimentos 4, 6, 10, 7, 9 y 11 se les aplicó una solución secuestrante (EDTA) en niveles de 1ppm.



Figura 5.1 Esquema del arreglo experimental con plancha de calentamiento con agitación para la lixiviación

5.3.4 Filtración del extracto acuoso

Los extractos acuosos obtenidos se dejaron reposar por un tiempo aproximado de 2 horas y luego fueron filtrados con el fin de eliminar los componentes no deseables. Esta etapa se llevó a cabo mediante un sistema de filtración al vacío que fue montado en el laboratorio, (Anexo, figura C-8).

Los extractos acuosos filtrados, se depositaron en recipientes de vidrio ámbar de 60 ml para protegerlo de la luz, y evitar la degradación de las betalaínas, ya que posteriormente fueron preparados para los análisis correspondientes.

5.3.5 Identificación de betalaínas

Para identificar los tipos de betalaínas presentes los extractos acuosos obtenidos se realizó un procedimiento descrito por Benites (2015), el cual consistió en aplicar el método de espectrofotometría de absorción que permitió determinar la longitud de onda absorbida por el extracto acuoso y comparar con la longitud de onda característica de las betacianinas y betaxantinas, que van en el rango de 200 hasta 700 nm.

Se tomaron 2 ml del extracto de referencia obtenido a temperatura ambiente y con su propio pH, posteriormente se preparó con etanol hasta que se obtuvo una concentración adecuada que permitió realizar los barridos espectrofotométricos, en un espectrofotómetro GENESYS 6 UV-VIS. Se obtuvieron 2 espectros de absorción con picos máximos a longitudes de onda de 483 y 538 nm.

5.3.6 Cuantificación de betalaínas

Para cuantificar las betalaínas se usó el mismo método de análisis espectrofotometría UV-VIS, obteniéndose las absorbancias que posteriormente fueron convertidas a valores de concentraciones, aplicando las ecuaciones (3.1) y (3.2).

5.3.7 Preparación del blanco

El blanco para la lectura de las muestras se tomó a partir de solvente etanol diluido al 50 % con agua, se extrajo 1 ml de este solvente con una pipeta volumétrica y se agregó directamente a la celda de lectura del equipo.

5.3.8 Lectura de muestras

Para la identificación y cuantificación de betalaínas en los extractos acuosos obtenidos, fue necesario obtener la absorbancia a través de la Betacianinas y las Betaxantinas a longitudes de ondas 538 nm y 438 nm respectivamente, para expresarlos en términos de concentración.

Cada uno de los extractos obtenidos se prepararon a una concentración estándar v/v de 1:21, luego se extrajeron con una pipeta volumétrica, 2 ml de las muestras diluidas, se agregaron a la celda y se procedió a realizar la lectura de absorbancias en el equipo.

5.4 Determinación de las condiciones específicas de lixiviación que favorezcan el contenido de betalaínas

Para determinar las mejores condiciones de extracción se consideraron únicamente los factores que influyen significativamente en el contenido de betalaínas.

Se realizaron nuevos ensayos experimentales, y se establecieron nuevas condiciones de extracción para determinar cuáles favorecen el contenido de betalaínas, se aplicó la misma metodología descrita de la sección 5.3 a 5.3.8.

Se realizó un diseño experimental factorial mixto, con tres factores identificados en la primera fase experimental. En la tabla 5.3 se muestran los factores y niveles con los que se obtuvieron 18 variables de respuestas, realizando por triplicado los ensayos experimentales con la finalidad de obtener resultados más confiables.

Tabla 5.3 Diseño experimental para la determinación de las condiciones específicas de lixiviación que favorezcan el contenido de betalaínas

Factor	Nivel bajo	Nivel medio	Nivel alto
Temperatura	30°C	45°C	60°C
Disolvente	25%	50%	75%
Parte de la raíz	Cáscara	-	Pulpa

5.5 Estimación de la cinética de degradación de betalaínas presentes en el colorante extraído

Para estimar la cinética de degradación de las betalaínas presentes, se establecieron condiciones de tiempo de almacenamiento, temperatura y pH.

Para el tiempo de almacenamiento se estudió el comportamiento degradativo de las betalaínas almacenadas a temperaturas de 4°C y 30°C, durante 30 días, se eligieron estas condiciones considerando que distintos alimentos son almacenados a esas condiciones.

En cuanto a la estimación de la influencia de la temperatura en la degradación del colorante extraído, se estableció una temperatura constante de 78°C, tomando en cuenta que esa es la temperatura de ebullición de disolvente presente en el extracto obtenido, ya que para separar este disolvente es necesario someter al extracto acuoso colorante a un proceso de separación lo que significa que se expondrán las betalaínas a altas temperaturas, lo que resulta poco favorable para estas. Así mismo en el caso de adicionar el colorante a alimentos, los cuales deban pasar por un proceso de pasteurización o esterilización donde se manejan altas temperaturas, lo que resultaría inconveniente.

Las condiciones de pH de 3.0, 5.0, 6.82 y 8.0 fueron estudiadas ya que se han hecho diversos estudios con pH distintos, por lo que es necesario conocer el comportamiento a estas condiciones propuestas, cabe mencionar que el pH 6.82 es propio del extracto, a partir de este fueron modificados a los demás valores de pH. También existen alimentos que se encuentran en esos rangos de pH por lo que resulta de mucho interés conocer el comportamiento de las betalaínas a esas condiciones.

La degradación de la betacianinas y betaxantinas fue seguida a través de mediciones de absorbancia a 483 y 538 nm respectivamente, empleando la metodología usada por (Moreno et al. 2002), se estableció orden de reacción en las cinéticas degradativas de betalaínas.

5.5.1 Degradación con respecto al tiempo de almacenamiento

Para determinar la degradación de las betalainas, se colocó el extracto acuoso obtenido con las mejores condiciones de extracción, sin modificar su pH, en 2 frascos de vidrio ámbar de 60 ml y se almacenaron durante 30 días, protegido de la luz, cerrados herméticamente a temperatura de 4°C y a temperatura ambiente 30°C.

Cada 2 días se tomaron muestras de 2ml para medir sus absorbancias, donde posteriormente fueron convertidas a términos de concentraciones (mg/100g de remolacha fresca).

5.5.2 Degradación con respecto a la Temperatura de 78°C

El método aplicado consistió en depositar el extracto acuoso obtenido con las mejores condiciones de extracción y sin modificar su pH en un matraz de 250 ml, el extracto fue sometido a tratamiento térmico, se le aplicó calentamiento a una temperatura constante de 78 °C durante 90 minutos.

Luego del extracto sometido a tratamiento térmico se tomaron muestras de 2 ml cada 15 minutos y se midieron las absorbancias a longitudes de onda de 538 nm y 483 nm, estos valores fueron convertidos a concentración (mg/100g de remolacha fresca).

5.5.3 Degradación con respecto al pH

La metodología utilizada consistió en regular con HCl 0.25 N a 3, 5 y con NaOH a pH 8, los extractos acuosos obtenidos con las mejores condiciones de extracción. Posteriormente en 3 envases de vidrio ámbar se colocaron los extractos con pH modificado y uno sin modificar, se cerraron herméticamente y se dejaron en ausencia de la luz reposar por 90 min, luego en un espectrofotómetro UV-VIS se midieron las absorbancias, los valores de absorbancias obtenidos fueron convertidos a valores de concentración (mg/100g), mediante las ecuaciones 3.1 y 3.2.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de las betalaínas en el colorante

Para conocer el contenido de betalaínas, fue necesario identificar los pigmentos presentes en el colorante de *Beta vulgaris*, para ello se obtuvo un extracto de referencia y se aplicó el método de espectrofotometría UV-Vis, donde se preparó una muestra diluyendo 1ml del extracto en 20 ml de etanol al 50% y se analizó en un espectrofotómetro UV-VIS, se obtuvo un espectro de absorción con los picos máximos donde se identificaron los tipos de betalaínas presentes.

Los datos de absorción máxima fueron 0.383 a una longitud de onda de 538 nm (Betacianinas) y 0.292 a una longitud de onda de 483 nm (Betaxantinas), lo que coincide con lo reportado en la literatura para estos colorantes naturales ya que esos son sus picos máximos de absorción y están representadas como los picos más altos en la figura 6.1

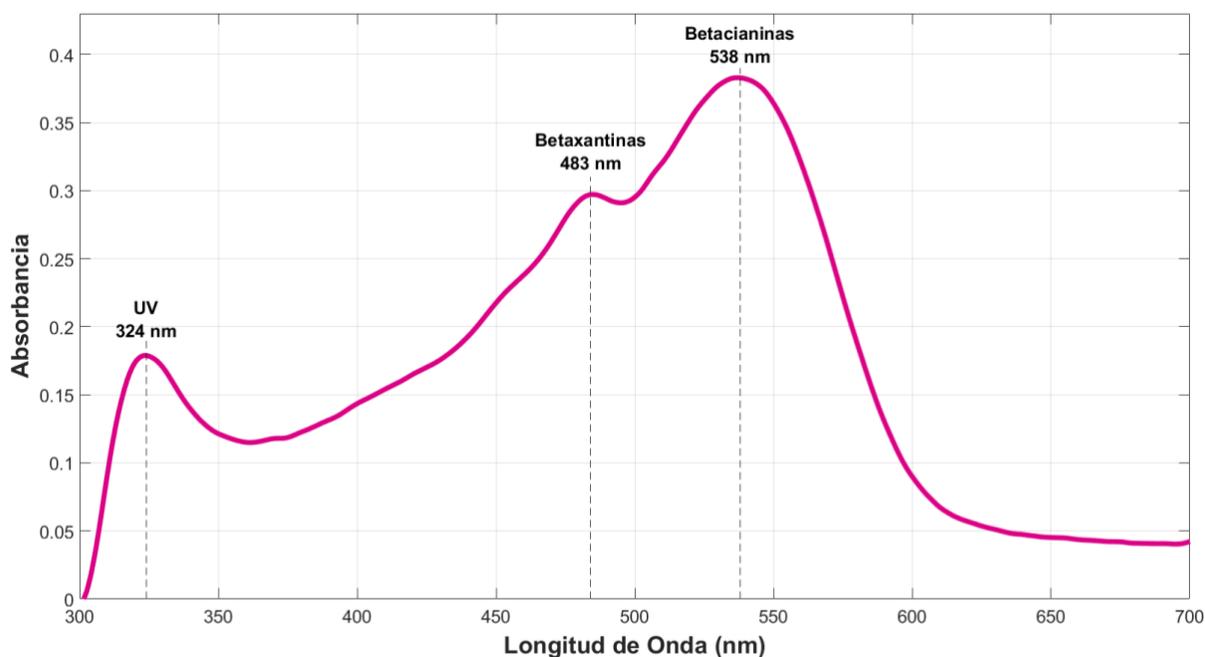


Figura 6.1 Espectro de absorción versus longitud de onda del extracto acuoso de remolacha (*Beta vulgaris*). Fuente: elaboración propia.

Estas longitudes de ondas máximas tanto para betacianinas como betaxantinas obtenidas son las mismas que las reportadas en las flores de buganvilla realizado por (Benites, 2015).

Cabe mencionar que existe un grupo de compuestos en el extracto de remolacha que absorben en el rango ultravioleta con un máximo a una longitud de onda de 324 nm pero con absorbancia relativa menor que las betacianinas y betaxantinas.

6.2 Factores que influyen significativamente en el contenido de betalaínas durante el proceso de lixiviación.

En la tabla 6.1 se muestran los resultados obtenidos luego de llevar a cabo los experimentos del diseño de cribado de la tabla 5.2, donde se propusieron 7 factores a estudiar con dos niveles para

cada factor en un diseño de Placket-Burman. En las últimas dos columnas se muestran los contenidos de Betacianinas y Betaxantinas calculados por cada 100 g de remolacha fresca.

Tabla 6.1 Resultados del contenido de betalaínas

No. Exp.	Temp (°C)	Tiempo (horas)	Agitación (rpm)	Disolvente	Prep. Muestra	Secues-trante	Parte de la raíz	(mg/100g) Betac	(mg/100g) Betax
4	50	1	120	Etanol	Rayado	EDTA	Cáscara	167.28	93.79
2	50	2	60	Etanol	Rayado	Ninguno	Cáscara	219.26	141.49
3	30	2	120	Agua	Laminas	Ninguno	Cáscara	57.75	26.48
6	50	2	120	Agua	Laminas	EDTA	Cáscara	169.30	102.61
8	30	1	120	Etanol	Laminas	Ninguno	Pulpa	102.31	56.56
12	30	1	60	Agua	Rayado	Ninguno	Cáscara	30.42	18.53
10	50	1	60	Agua	Laminas	EDTA	Pulpa	113.19	56.66
7	30	2	120	Etanol	Rayado	EDTA	Pulpa	189.71	86.31
5	50	2	60	Etanol	Laminas	Ninguno	Pulpa	64.01	53.23
1	50	1	120	Agua	Rayado	Ninguno	Pulpa	120.22	65.02
9	30	1	60	Etanol	Laminas	EDTA	Cáscara	108.76	96.48
11	30	2	60	Agua	Rayado	EDTA	Pulpa	79.70	42.45

Se obtuvieron 12 extractos acuosos de colorante de remolacha para cada una de las condiciones indicadas. Todas las muestras se diluyeron tomando 1 ml de extracto y disolviéndolo en 20 ml de etanol al 50%; por lo que la relación de dilución fue de 1:21.

A estas muestras diluidas se les midió la absorbancia en las longitudes de onda de 538 nm y 483 nm para calcular los contenidos de betacianinas y betaxantinas utilizando las ecuaciones 3.1 y 3.2. A continuación se ejemplifica el cálculo del contenido de estos colorantes en el experimento #4 (primera fila de la tabla 6.1):

$$CB_c = \frac{(1.738) \times \left(\frac{550 \cancel{g}}{\cancel{mol}} \right) \times \left(\frac{1000 mg_{colorante}}{1 \cancel{g}} \right) \times (0.125 \cancel{L}) \times (21)}{\left(\frac{60000 \cancel{L}}{\cancel{mol} \cdot \cancel{cm}} \right) \times (1 \cancel{cm}) \times (25 g_{remolacha})} \times 100 = 167.28 \frac{mg_{colorante}}{100 g_{remolacha}}$$

$$CB_x = \frac{(1.392) \times \left(308 \frac{\cancel{g}}{\cancel{mol}}\right) \times \left(\frac{1000 mg_{colorante}}{1 \cancel{g}}\right) \times (0.125 \cancel{L}) \times (21)}{\left(48000 \frac{\cancel{L}}{\cancel{mol} \cdot \cancel{cm}}\right) \times (1 \cancel{cm}) \times (25 g_{remolacha})} \times 100 = 93.79 \frac{mg_{colorante}}{100 g_{remolacha}}$$

Con estos los datos de la tabla 6.1 se procedió a analizar el Diseño de Cribado con el software estadístico Minitab 19®, obteniéndose los siguientes diagramas:

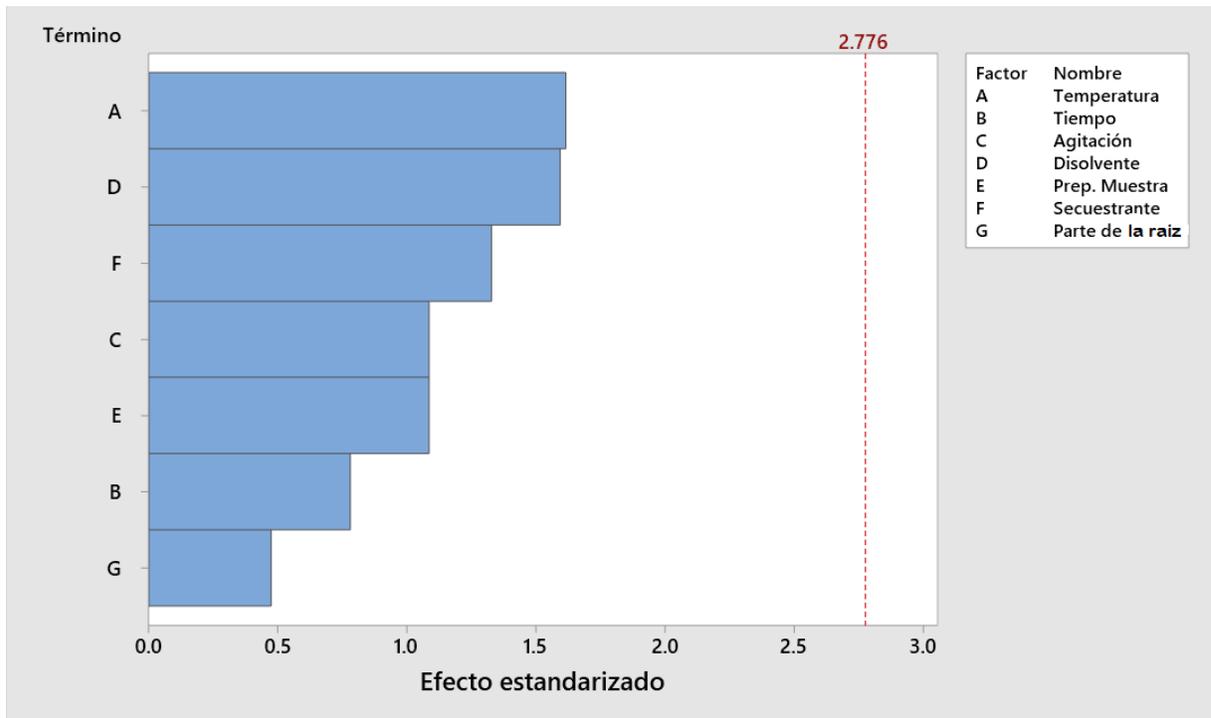


Figura 6.2 Influencia de los factores de lixiviación en el contenido de betacianinas

El diagrama de Pareto indica los factores más influyentes para la obtención de betacianinas en el proceso de lixiviación, siendo la **Temperatura** y el **Disolvente** los más importantes. En tercer lugar, puede haber un efecto con el uso del secuestrante durante la extracción. Los factores como tiempo, agitación, preparación de la muestra y parte de la raíz no tuvieron mucha influencia para el caso de las betacianinas.

En la figura 6.3 que corresponde a las betaxantinas se identificaron como factores más importantes durante la lixiviación el **Disolvente** y la **Temperatura**, coincidiendo que para ambos grupos de compuestos estos dos factores inciden principalmente; por lo que se propusieron en el siguiente estudio para un análisis de mayor profundidad. Como también existe la influencia en tercer lugar de la variable **Parte de la raíz** se decidió incluir este factor en el siguiente diseño que será de tipo factorial, y dejar al factor uso de secuestrante como factor fijo.

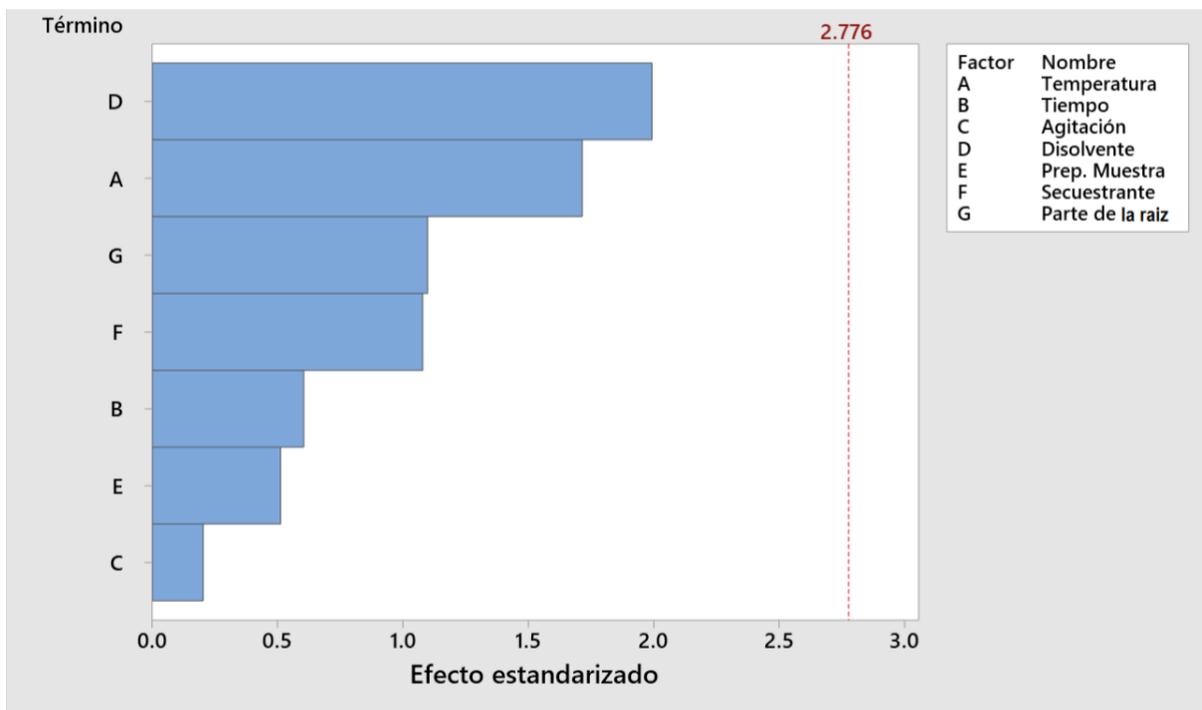


Figura 6.3 Influencia de los factores de lixiviación en el contenido de Betaxantinas

En la siguiente tabla se muestra la mejor combinación propuesta por el optimizador de respuesta con el software Minitab. A partir de esta información, se decidió dejar a un valor fijo los factores que no eran relevantes.

Tabla 6.2 Resultados del optimizador de respuesta para los experimentos de cribado

Solución	<i>Factores Significativos</i>			<i>Factores Fijos</i>			
	Temperatura	Disolvente	Parte de la raíz	Agitación	Tiempo	Secuestrante	Prep. Muestra
1	50 °C	Etanol	Cáscara	120 rpm	1 h	EDTA	Rayado
	Cont. Betax Estimada	Cont. Betac Estimada	Deseabilidad Compuesta				
	135.064	235.411	0.973531				

Como puede observarse en la tabla 6.2, los factores fijos para el siguiente diseño experimental se escogieron de las condiciones que se observaron que maximizaban el contenido de betacianinas y betaxantinas, las cuales fueron:

Tiempo: 1 hora
Agitación: 120 rpm
Secuestrante: EDTA
Preparación de la muestra: Rayado

Los factores que se estudiarán más a fondo serán la Temperatura, Disolvente y Parte de la raíz.

6.3 Determinación de las condiciones específicas de lixiviación que favorezcan el contenido de betalaínas (Betacianinas y Betaxantinas).

De los resultados de la sección 6.2 y como se evidencia en la tabla 5.3, los factores seleccionados fueron Temperatura (3 niveles), Disolvente (3 niveles) y Parte de la Raíz (2 niveles), correspondiendo a un Diseño Factorial Mixto completo. Se realizaron 3 ensayos para cada uno de los 18 tratamientos para un total de 54 experimentos.

En la tabla 6.3 se muestran los contenidos de betalaínas (mg/100g), que fueron obtenidos a distintas condiciones de lixiviación para determinar cuáles de estas condiciones son las más favorables, en esta fase experimental fueron tomados en cuenta únicamente los factores que se identificaron influyentes, tales como la temperatura, % de solvente y la parte de la raíz.

Tabla 6.3 Resultados del diseño factorial mixto para determinar las mejores condiciones de lixiviación

Exp No.	Temp (°C)	% Solvente	Parte de la raíz	Betacianinas (mg/100g)			Betaxantinas (mg/100g)		
09 27 45	60	50	Cáscara	147.84	147.84	147.94	131.65	131.65	131.45
10 28 46	60	50	Pulpa	43.70	43.70	43.70	50.80	50.73	50.73
04 22 40	40	50	Pulpa	44.47	44.28	44.66	51.27	51.34	51.47
03 21 39	40	50	Cáscara	179.60	179.60	179.60	116.76	116.69	116.76
01 19 37	40	25	Cáscara	203.67	203.86	203.86	137.31	137.31	137.31
08 26 44	60	25	Pulpa	51.98	52.07	52.07	52.49	52.55	52.62
05 23 41	40	75	Cáscara	99.62	98.56	99.62	72.83	72.09	72.43
06 24 42	40	75	Pulpa	54.86	55.25	54.86	49.18	49.86	49.72
18 36 54	80	75	Pulpa	3.08	3.08	3.08	20.68	20.48	20.55
17 35 53	80	75	Cáscara	80.95	81.72	81.24	89.47	89.41	89.61
16 34 52	80	50	Pulpa	30.90	31.19	31.09	39.68	39.89	40.02
11 29 47	60	75	Cáscara	115.40	115.02	115.02	107.60	107.13	107.80
13 31 49	80	25	Cáscara	133.79	133.79	133.69	95.34	95.67	95.27
14 32 50	80	25	Pulpa	34.07	34.46	34.55	34.16	34.36	34.50
12 30 48	60	75	Pulpa	53.52	53.71	53.80	56.33	56.53	56.66
07 25 43	60	25	Cáscara	135.33	135.71	135.71	103.02	103.02	103.08
02 20 38	40	25	Pulpa	92.11	92.40	92.40	64.34	64.75	64.61
15 33 51	80	50	Cáscara	58.33	58.04	58.33	71.62	71.96	71.82

A continuación, se muestran los resultados del Análisis de Varianza para el contenido de Betacianinas y Betalaínas:

Tabla 6.4 ANOVA para el contenido de Betacianinas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	19	161964	8524.4	111.01	0.000
Lineal	5	139651	27930.2	363.71	0.000
Temperatura	2	28919	14459.7	188.30	0.000
%Disolvente	2	12835	6417.6	83.57	0.000
Parte de la raíz	1	97897	97896.5	1274.82	0.000
Interacciones de 2 términos	8	12988	1623.6	21.14	0.000
Temperatura*%Disolvente	4	8892	2223.1	28.95	0.000
Temperatura*Parte de la raíz	2	2028	1013.9	13.20	0.000
%Disolvente*Parte de la raíz	2	2068	1034.2	13.47	0.000
Interacciones de 3 términos	4	9170	2292.4	29.85	0.000

Influencia de las condiciones de lixiviación en la extracción y estabilidad de colorantes de remolacha

Temperatura*%Disolvente*Parte de la raíz	4	9170	2292.4	29.85	0.000
Error	34	2611	76.8		
Total	53	164575			

La tabla anterior indica que todos los factores principales (temperatura, %disolvente y parte de la raíz) y la combinación de estos factores tienen influencia significativa ($p < 0.05$) en el contenido de betacianinas.

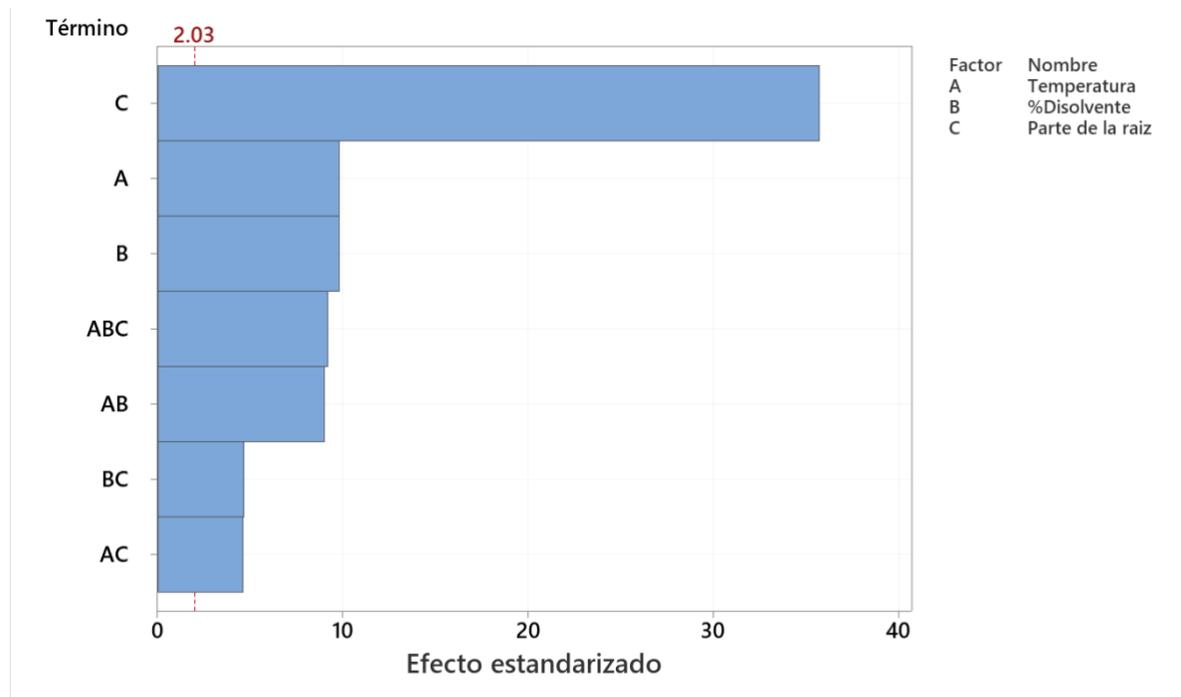


Figura 6.4 Influencia de los factores dominantes en la lixiviación en el contenido de betacianinas

La figura 6.4 permite comprender el impacto que tiene cada factor y sus interacciones en el contenido de betacianinas del extracto. Puede observarse que el factor por lejos más significativo es la parte de la raíz, es decir, hay un nivel de este factor que favorece mucho a obtener más betacianinas. Los demás factores (temperatura y %disolvente) también tienen un efecto, aunque relativamente menor. Además, la interacción de 3 factores (ABC) y las de dos factores (AB, BC, AC) también tienen implicación en el contenido de betacianinas del extracto. Esto significa que existe un comportamiento no lineal en los datos y que hay una combinación de los 3 factores que sobresale o destaca en la variable respuesta.

A continuación, se analizarán los resultados para el caso del contenido de betaxantinas:

En la tabla 6.5 se muestran los resultados del ANOVA luego de aplicar el diseño factorial mixto para determinar qué factores influyen y en qué medida en el contenido de betaxantinas. Al igual que como sucedió con las betacianinas, el valor p ($p < 0.05$) indica que todos los factores individuales, combinación de 2 factores y la combinación de los 3 factores son significativos. Es decir, los niveles considerados en cada factor (los valores de temperatura, %disolvente y parte de la raíz) dan resultados apreciablemente distintos y causan efectos sobre la variable de respuesta, en este caso el contenido de betaxantinas.

Tabla 6.5 ANOVA para el contenido de Betaxantinas

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	19	60390.0	3178.4	1949.28	0.000
Lineal	5	52416.2	10483.2	6429.22	0.000
Temperatura	2	7227.1	3613.6	2216.15	0.000
%Disolvente	2	2077.4	1038.7	637.00	0.000
Parte de la raíz	1	43111.8	43111.8	26439.79	0.000
Interacciones de 2 términos	8	4256.5	532.1	326.30	0.000
Temperatura*%Disolvente	4	3640.4	910.1	558.15	0.000
Temperatura*Parte de la raíz	2	194.3	97.1	59.58	0.000
%Disolvente*Parte de la raíz	2	421.8	210.9	129.35	0.000
Interacciones de 3 términos	4	3713.3	928.3	569.32	0.000
Temperatura*%Disolvente*Parte de la raíz	4	3713.3	928.3	569.32	0.000
Error	34	55.4	1.6		
Total	53	60445.5			

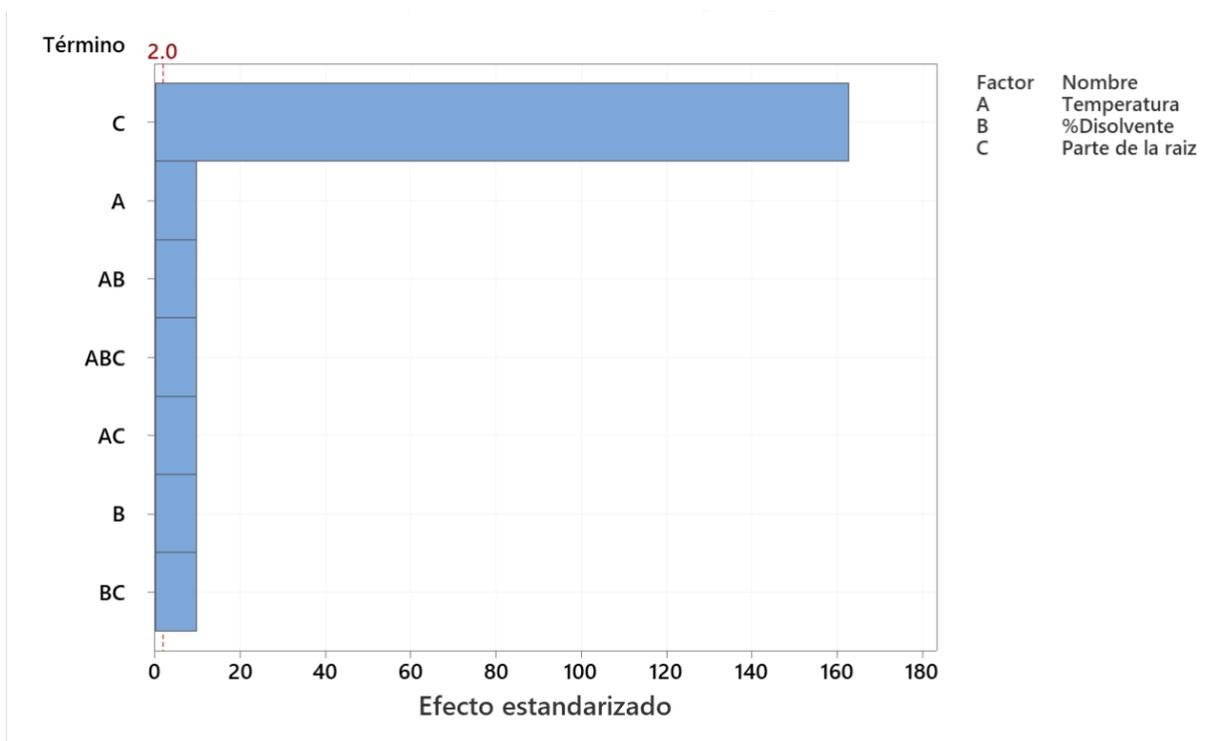


Figura 6.5 Influencia de los factores dominantes en la lixiviación en el contenido de betaxantinas

La figura 6.5 revela que al igual que en el caso de las betacianinas, el factor determinante es la parte de la raíz ya que esta variable tiene un impacto mucho mayor que incluso los demás factores combinados. Los demás factores y combinación de factores fueron significativos también. Para determinar las mejores condiciones que favorecen la obtención de mayores contenidos de colorantes de la remolacha, se necesita analizar los niveles de estos factores en las gráficas de interacciones.

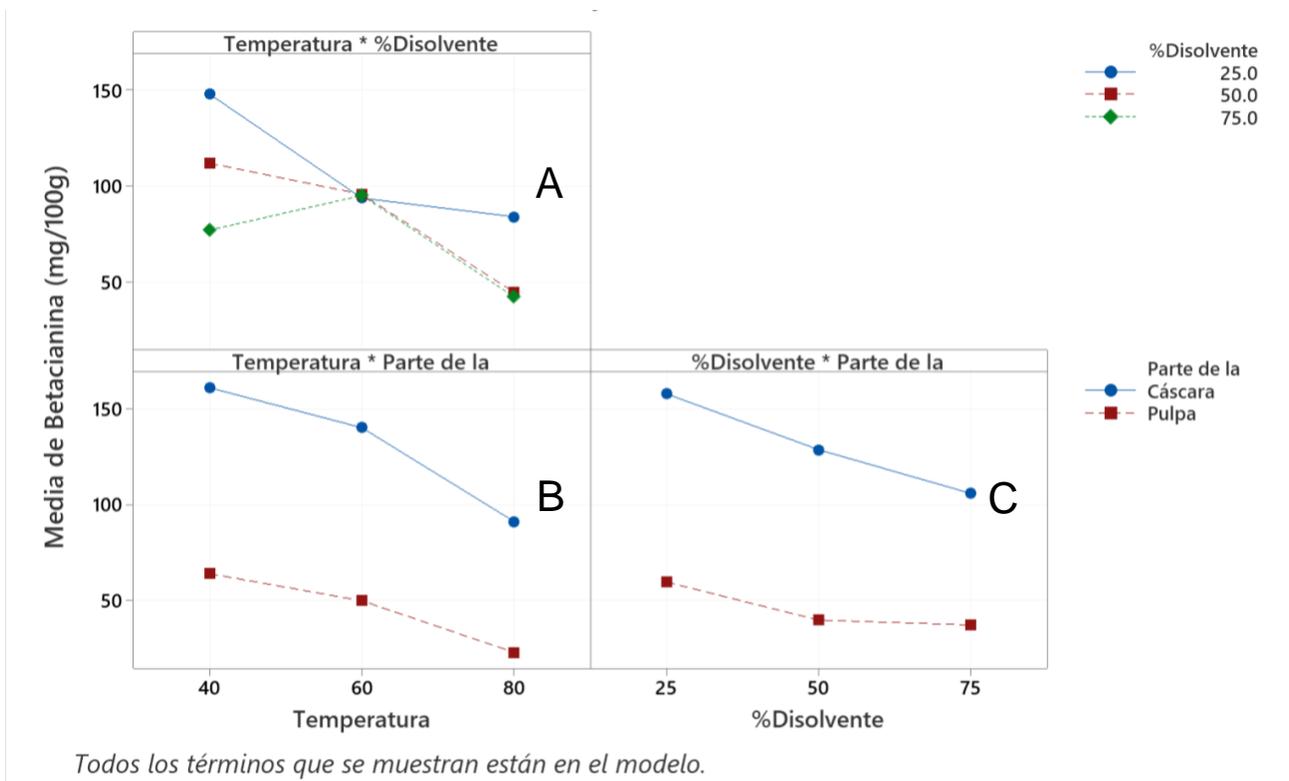


Figura 6.6 Gráfica de interacciones que indica las mejores combinaciones en cada factor para betacianinas

Las gráficas de interacciones muestran los resultados para la combinación de cada factor. En la gráfica 6.6A, se observa que el valor más alto se alcanza con una temperatura de 40°C usando etanol al 25% (el punto de arriba a la izquierda). Los demás valores decaen al aumentar la temperatura en general, es decir que una mayor temperatura favorece la degradación de los colorantes.

Las gráficas 6.6B y 6.6C indican la interacción entre temperatura y parte de la raíz, %disolvente y parte de la raíz, respectivamente. Se puede observar que el aumento de temperatura causa una disminución sensible en el contenido de betacianinas. Lo más importante es que en las gráficas B y C el factor parte de la raíz juega un papel predominante, siendo el contenido de betacianinas en la cáscara casi 3 veces mayor que en la pulpa.

En resumen, los niveles más favorables para la extracción de betacianinas resultan ser usando una temperatura de 40 °C, etanol al 25% como disolvente y la cáscara como materia prima.

La gráfica 6.7 corresponde a las betaxantinas. En la gráfica 6.7A, se observa que (al igual que como ocurría con las betacianinas) el valor más alto se alcanza con una temperatura de 40°C usando etanol al 25% (el punto de arriba a la izquierda). Un caso curioso es que con 50% y 75% de etanol como disolvente, el contenido de betaxantinas tiene un máximo a temperaturas medias de 60°C y luego decae a temperaturas altas, pero este valor no llega a ser superior que el caso de 40°C y 25% etanol.

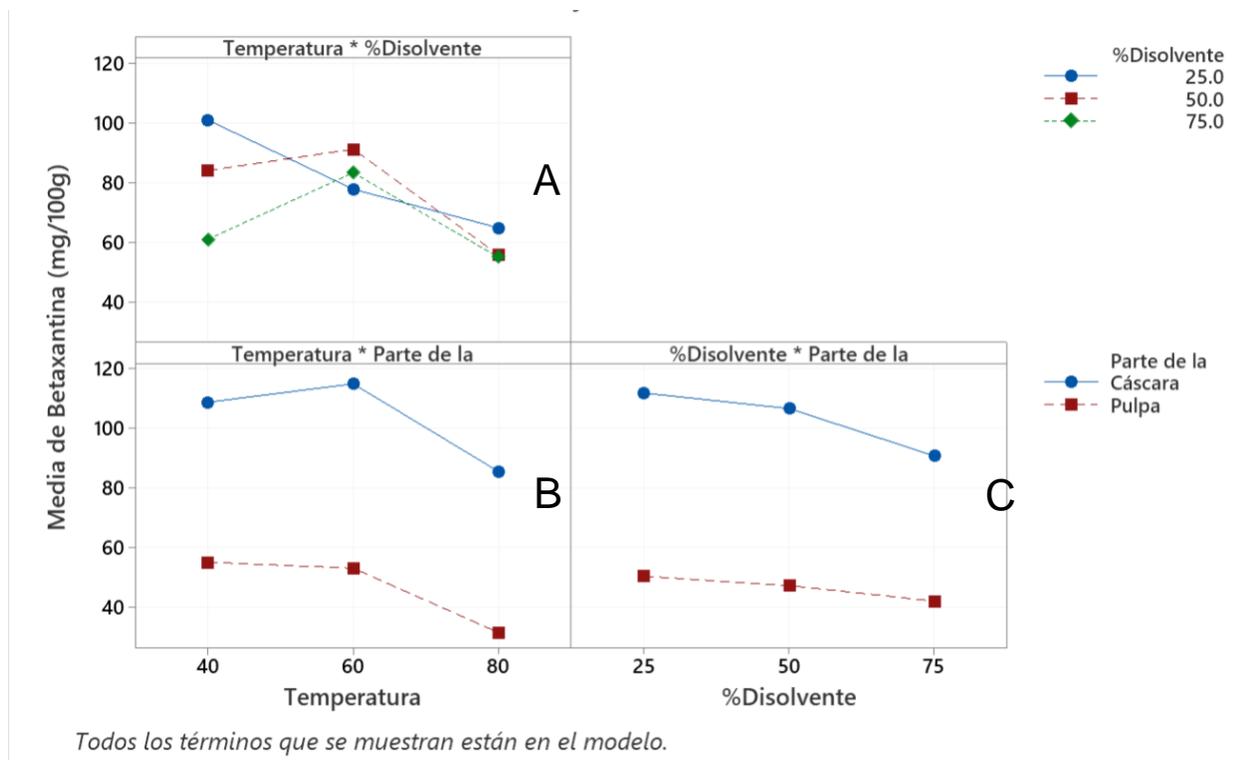


Figura 6.7 Gráfica de interacciones que indica las mejores combinaciones en cada factor para betaxantinas

La gráfica 6.7B indica la interacción entre temperatura y parte de la raíz, se puede observar que no hay mucha diferencia en el contenido de betaxantinas usando valores entre 40 y 60°C, pero si decae al usar 80°C. La combinación %Disolvente y Parte de la raíz en la gráfica 6.7C muestra un decaimiento lineal del contenido de betaxantinas al aumentar la temperatura. Tanto en las gráficas B y C es notable la diferencia al usar la cáscara que la pulpa, siendo el contenido de betaxantinas más de 2 veces mayor en la cáscara que en la pulpa, dando un resultado muy favorable pues indica que estos residuos (cáscaras) son las mejores fuentes para obtener las betalaínas y no compiten con los otros usos de la remolacha donde es la pulpa la que se aprovecha.

En la gráfica 6.8 se presenta el optimizador de respuesta que indica las condiciones que maximizan el contenido de betacianinas y betalaínas.

Puede observarse que, para ambos casos, las mejores condiciones son:

Temperatura: 40 °C

Disolvente: Etanol al 25%

Parte de la Raíz: Cáscara.

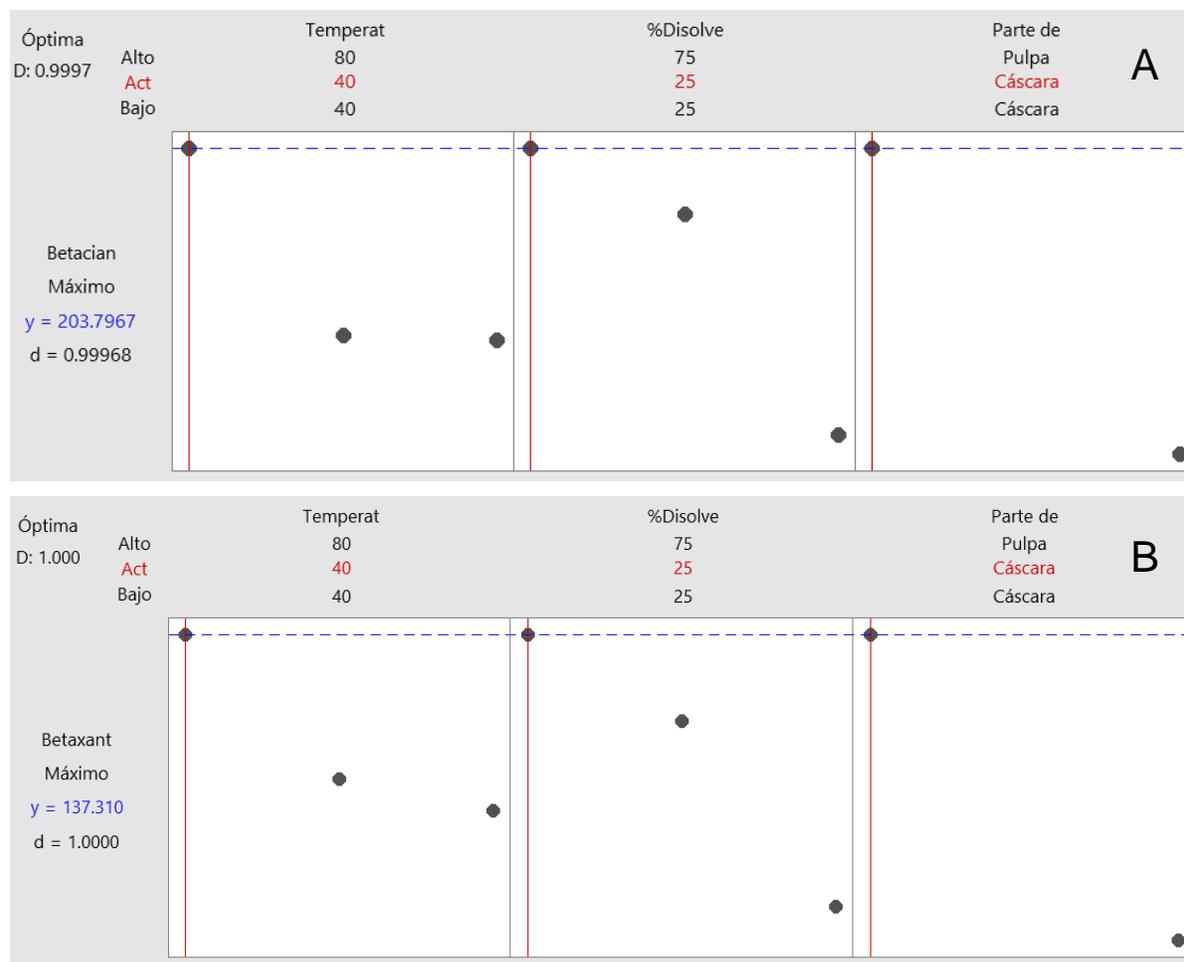


Figura 6.8 Optimizador de respuesta para a) Betaxantinas (arriba) y b) Betacianinas (abajo)

Los contenidos máximos teóricos que estima el optimizador que se pueden obtener en las mejores condiciones son:

Para Betacianinas: 203.80 mg / 100 g de cáscara.

Para Betaxantinas: 137.31 mg / 100 g de cáscara.

Estos valores dan una idea de los máximos rendimientos a las mejores condiciones estimadas en estos experimentos de lixiviación. En consecuencia, se presenta un resumen de las condiciones que maximizan el contenido de betalaínas de la remolacha, en orden de importancia:

Tabla 6.6 Condiciones recomendadas para extraer colorantes de remolacha (betacianinas y betalaínas)

Parte de la raíz	Cáscara
Temperatura	40 °C
Disolvente	Etanol al 25% en agua
Secuestrante	EDTA
Tiempo	1 hora
Preparación de la Muestra	Rayada
Agitación	120 rpm

6.4 Estimación de la cinética de degradación de betalaínas presentes en el colorante extraído

En la figura 6.9 se muestra cómo se modifican los espectros de absorción UV-Vis de las betalaínas cuando éstas se degradan. La identificación se hizo con un extracto acuoso, almacenado durante 30 días, se tomaron muestras para realizar el barrido durante los días 1, 15 y 30.

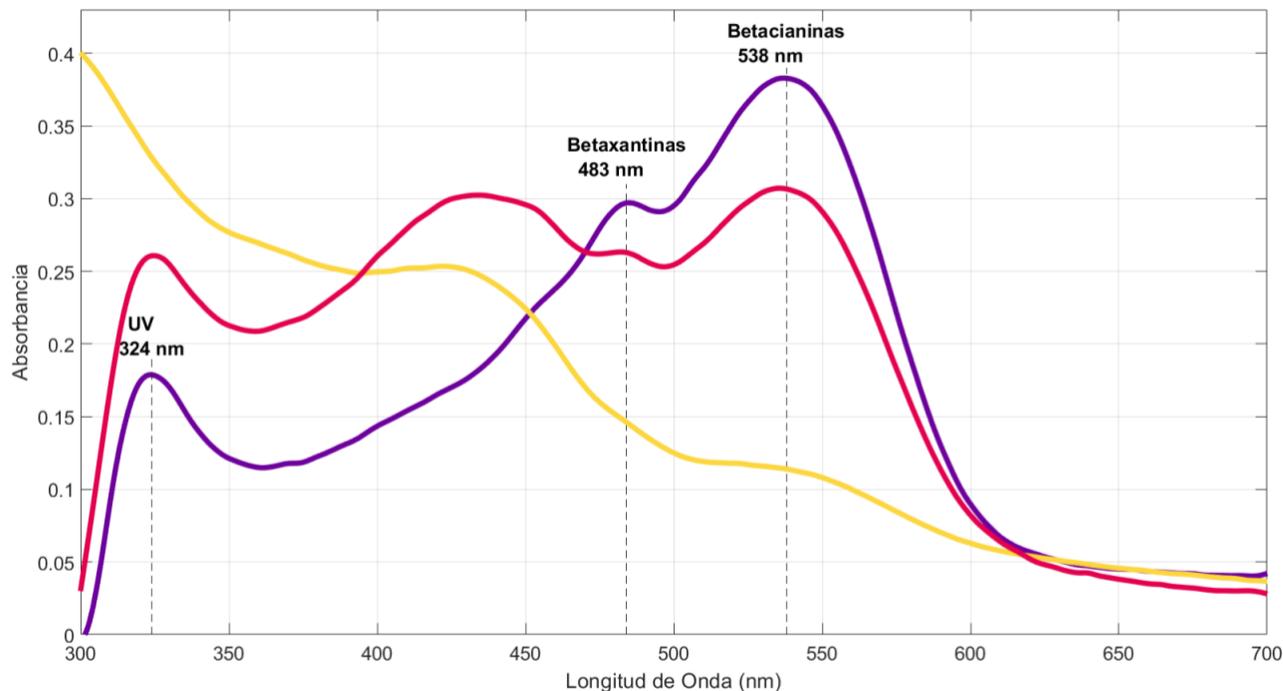


Figura 6.9 Cambio en el espectro de absorción UV-Vis de las betalaínas debido a su degradación

El espectro de absorción del colorante sin degradarse se representa con el color morado, el color rosado representa un espectro de betalaínas con una degradación media y el tono amarillo representa una completa degradación, donde no llegan a formarse los picos máximos de absorción a esas longitudes de onda a las que se identifican, indicando la ausencia de los compuestos betalámicos como los son las betacianinas y betaxantinas.

Puede observarse que, al degradarse estos colorantes, aumenta la cantidad de moléculas que absorben en el rango ultravioleta pues la absorbancia a longitudes menores a 400 nm incrementa.

6.4.1 Estabilidad frente al tiempo de almacenamiento

En la Figura 6.10 se observa que la degradación puede ser representada por curvas que decaen de forma exponencial para el almacenamiento a una temperatura ambiente (30°C), ya que la concentración decae bruscamente desde el día 1 hasta el día 20; mientras que para el almacenamiento a 4°C, se observa un ajuste de datos que siguen un modelo biexponencial, a causa del comportamiento de las betalaínas en los primeros 4 días, presentando un decaimiento rápido, para luego decaer levemente y mantenerse más o menos estables después del día 15.

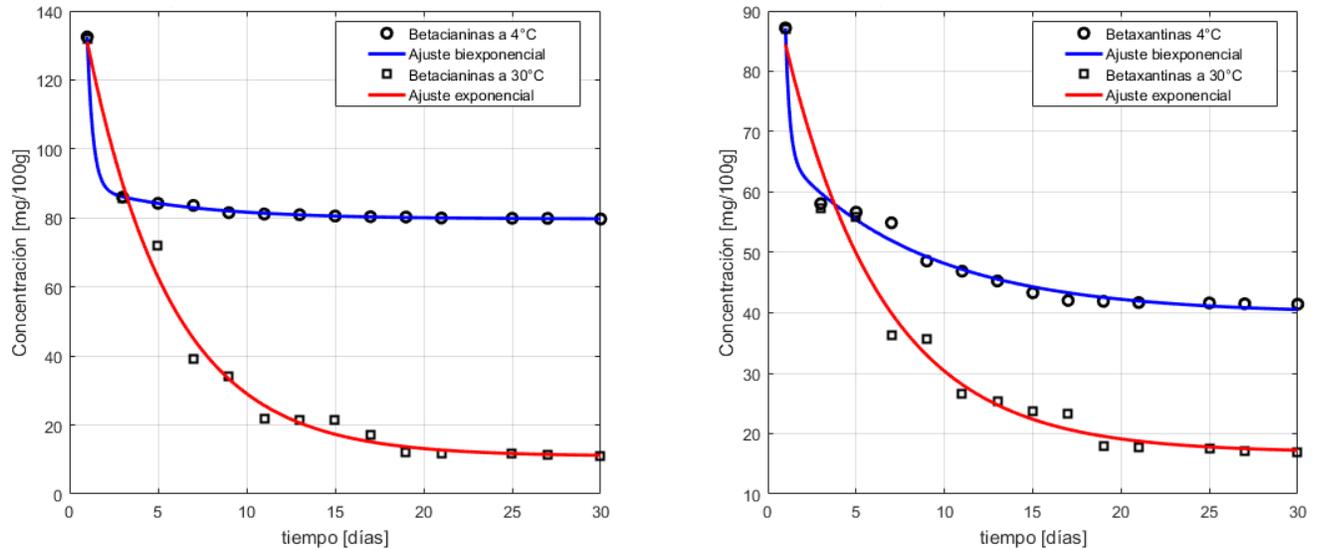


Figura 6.10 Cinética de degradación de las betalainas almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente (30°C)

En la tabla 6.7 se presentan los parámetros cinéticos de degradación de betacianinas y para betaxantinas almacenadas a temperatura ambiente, también nos proporciona los coeficientes de determinación (r^2). Puede observarse que ambas familias de colorantes se degradan significativamente luego de 1 mes de almacenamiento, siendo la degradación de betacianinas un 92% y betaxantinas 80% de su valor inicial.

Tabla 6.7 Parámetros cinéticos para la degradación de betalainas con el tiempo a temperatura ambiente 30°C

Modelo cinético	Betacianinas			Betaxantinas		
	Parámetros	Valores	r^2 ajustado	Parámetros	Valores	r^2 ajustado
$CB = a \times \exp(-b \times t) + c$	a	148.2	0.9874	a	80.86	0.9735
	b	0.2099		b	0.1792	
	c	10.95		c	16.88	

En la tabla 6.8 se representan los datos de ajustes de los parámetros cinéticos de degradación para las betalainas almacenadas a 4°C, y sus respectivos r^2 . Para este caso, los datos se ajustan mejor a una cinética biexponencial, puesto que se observan dos decaimientos en la degradación.

Estos decaimientos comprenden uno inicial rápido, representado por el coeficiente d , y uno consecuente lento, representado por el coeficiente b del término exponencial, con $d > b$.

Para el caso del almacenamiento a 4°C, la degradación de betacianinas se detuvo alrededor del día 10 y para betaxantinas alrededor del día 15. Las degradaciones en un lapso de 30 días fueron del 40% para betacianinas y 52% para betaxantinas, mucho menores que a temperatura ambiente. Además, a temperaturas de refrigeración, las betacianinas que son más inestables se lograron estabilizar antes que las betaxantinas y degradarse menos.

Tabla 6.8 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas con el tiempo a 4°C

Modelo cinético	Betacianinas			Betaxantinas		
	Parámetros	Valores	r ² ajustado	Parámetros	Valores	r ² ajustado
$CB = a \times \exp(-b \times t) + c \times \exp(-d \times t) + e$	a	10.48	0.9995	a	29.08	0.9866
	b	0.167		b	0.1251	
	c	976		c	1461	
	d	3.103		d	4.213	
	e	79.7		e	39.86	

6.4.2 Estabilidad frente el tratamiento térmico

La figura 6.11 muestra la línea de tendencia de la degradación de compuesto betalámicos (mg/100 g de cáscara). Se observa una cinética de degradación de primera orden, expresada como un decaimiento exponencial tanto para betacianinas como betaxantinas sometidas al tratamiento térmico. A un tiempo de 30 minutos, las betacianinas y betaxantinas se habían degradado un 45% y 50% respectivamente; mientras que, a 45 minutos, las betacianinas y betaxantinas se habían degradado ambas un 58%. A un tiempo de 90 minutos la degradación había alcanzado el 88% aproximadamente para ambos colorantes.

Puede observarse que temperaturas altas como las de los procesos de cocción afectan drásticamente a estos colorantes, por lo que no se recomiendan utilizar en alimentos previamente a procesos donde sean sometidos a temperaturas altas de procesamiento.

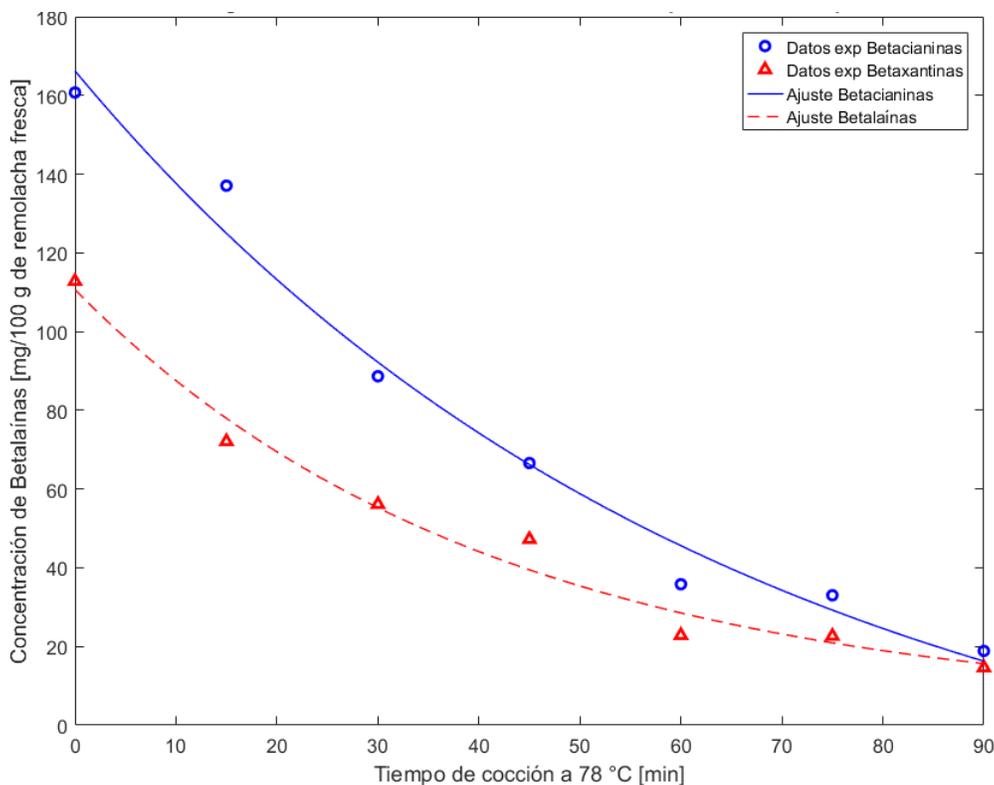


Figura 6.11 Cinética de degradación de los colorantes de la remolacha sometidos a tratamiento térmico de 78°C

Los parámetros del modelo cinético de primer orden ajustados a la curva de degradación de las betalaínas sometidas a tratamiento térmico están dados en la tabla 6.9.

Tabla 6.9 Parámetros cinéticos para la degradación térmica de betalaínas a 78°C

Modelo cinético	Betacianinas			Betaxantinas		
	Parámetros	Valores	r ² ajustado	Parámetros	Valores	r ² ajustado
CB = a×exp(-b×t)+c	a	199.8	0.9743	a	107	0.9717
	b	0.01543		b	0.0243	
	c	-33.56		c	3.635	

De acuerdo con estos parámetros cinéticos de degradación de betacianinas, a un tiempo aproximado de 116 minutos (casi 2 horas) ocurrirá la degradación total de las betacianinas.

En la figura C-13 (Anexos) se logra apreciar cómo cambia de color el extracto colorante cuando se expone a temperaturas altas, en el minuto 90 se obtuvo un colorante totalmente amarillo, lo que indica la ausencia de betalaínas, probablemente indicando la presencia de otros compuestos que no eran de interés de estudio.

El ácido betalámico (amarillo brillante) y ciclodopa-5-O-glucósido (sin color) son productos resultantes de la descarboxilación de betanina durante tratamientos térmicos (Huang and Von Elbe, 1987).

Herbach et al. (2006), menciona que la termolabilidad de las betalaínas es probablemente el factor que más restringe su uso como colorante de alimentos.

6.4.3 Estabilidad frente al pH

Las gráficas que se muestran en las figuras 6.12 y 6.13 presentan el comportamiento de la concentración Betacianinas y Betaxantinas, frente a distintos pH, el pH normal del colorante de remolacha obtenido fue de 6.8, y fue ajustado a 3, 5 y 8.

Con los pH 3, 6.8 y 8 hay una variación en la concentración de Betacianinas (ver figura 6.12), a medida que pasa el tiempo la concentración va disminuyendo, con el pH 8 sin duda, la estabilidad se ve más afectada, ya que desde el momento en que fue modificado con hidróxido de sodio se tornó un color marrón, esto puede corroborarse en la figura C-11 (ver anexos), mientras que los extractos colorantes con pH de 3, 5 y 6.8 no sufrieron cambio apreciable de color.

A diferencia, el pH 5 presenta un comportamiento muy distinto a los demás ocurriendo una ligera disminución al inicio, pero luego incrementó hasta estabilizarse completamente a partir del minuto 45. Este comportamiento atípico indica que las betacianinas a este pH tienden a estabilizarse de tal forma que la absorbancia aumenta ligeramente en vez de disminuir.

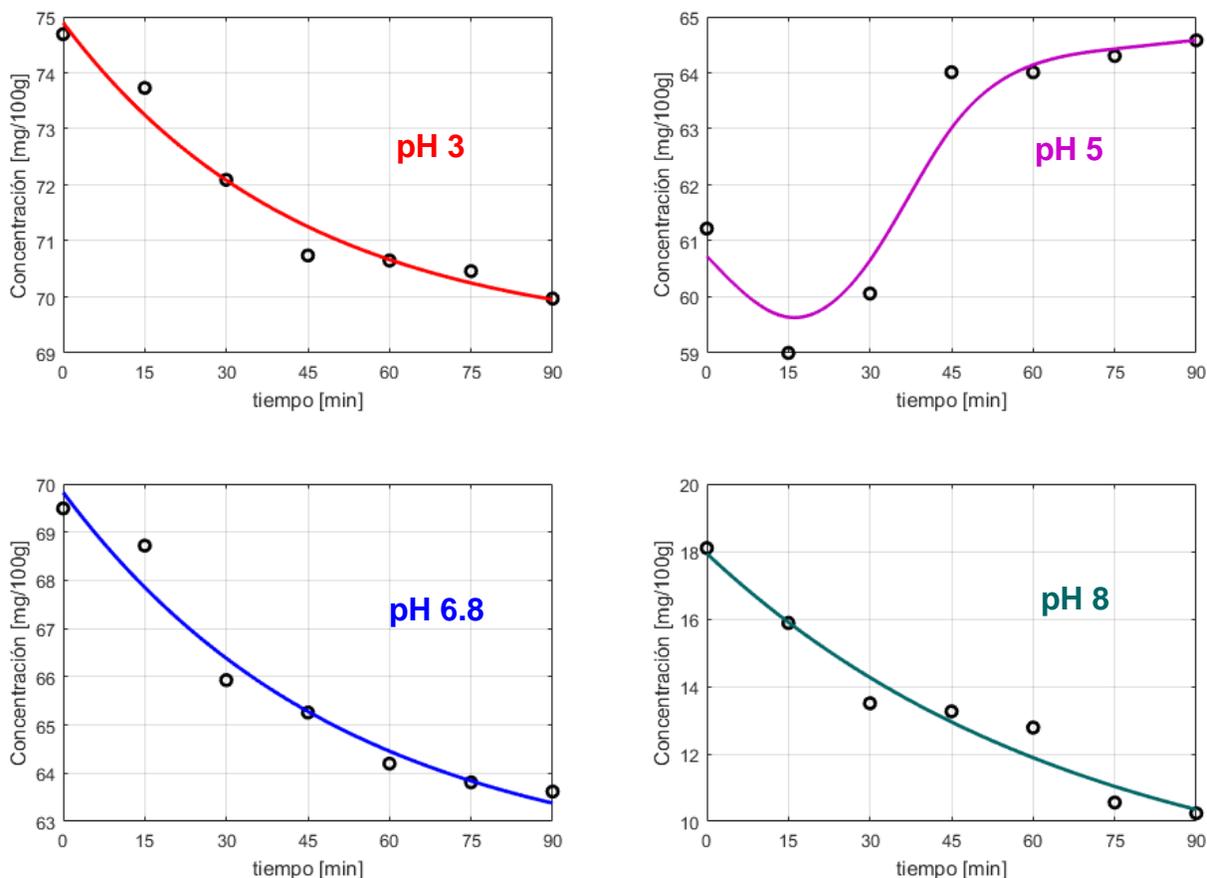


Figura 6.12 Cinética de degradación de Betacianinas ante distintos pH

Las betaxantinas (ver figura 6.13) presentan un comportamiento algo similar al de las betacianinas, presentando a pH de 3, 6.8 y 8 una degradación con comportamiento exponencial decreciente, aunque suelen mostrar una concentración más baja con respecto las betacianinas.

Las betaxantinas sometidas a ajuste de pH 5, igual que en el caso de las betacianinas, sufrieron un decaimiento inicialmente, y posteriormente alcanzan una estabilidad. Moreno et al. (2002) también indica que el valor óptimo para las betacianinas es de 5.5 a 5.8 y para las betaxantinas 5.0 a 6.0. Cabe señalar que nuestros resultados también indican que el rango de pH más adecuados para los colorantes se encuentra entre esos valores.

Tabla 6.10 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 3

Modelo cinético	Betacianinas			Betaxantinas		
	Parámetros	Valores	r ² ajustado	Parámetros	Valores	r ² ajustado
CB = a×exp(-b×t)+c	a	5.665	0.9558	a	5.64	0.9768
	b	0.02288		b	0.03208	
	c	69.23		c	36.25	

La tabla 6.10 muestra los parámetros cinéticos estimados que describen la degradación de las betacianinas y betaxantinas a pH 3, indicando que presentan un comportamiento similar con un

decaimiento exponencial de las concentraciones por tanto ajustan a un modelo cinético de primer orden.

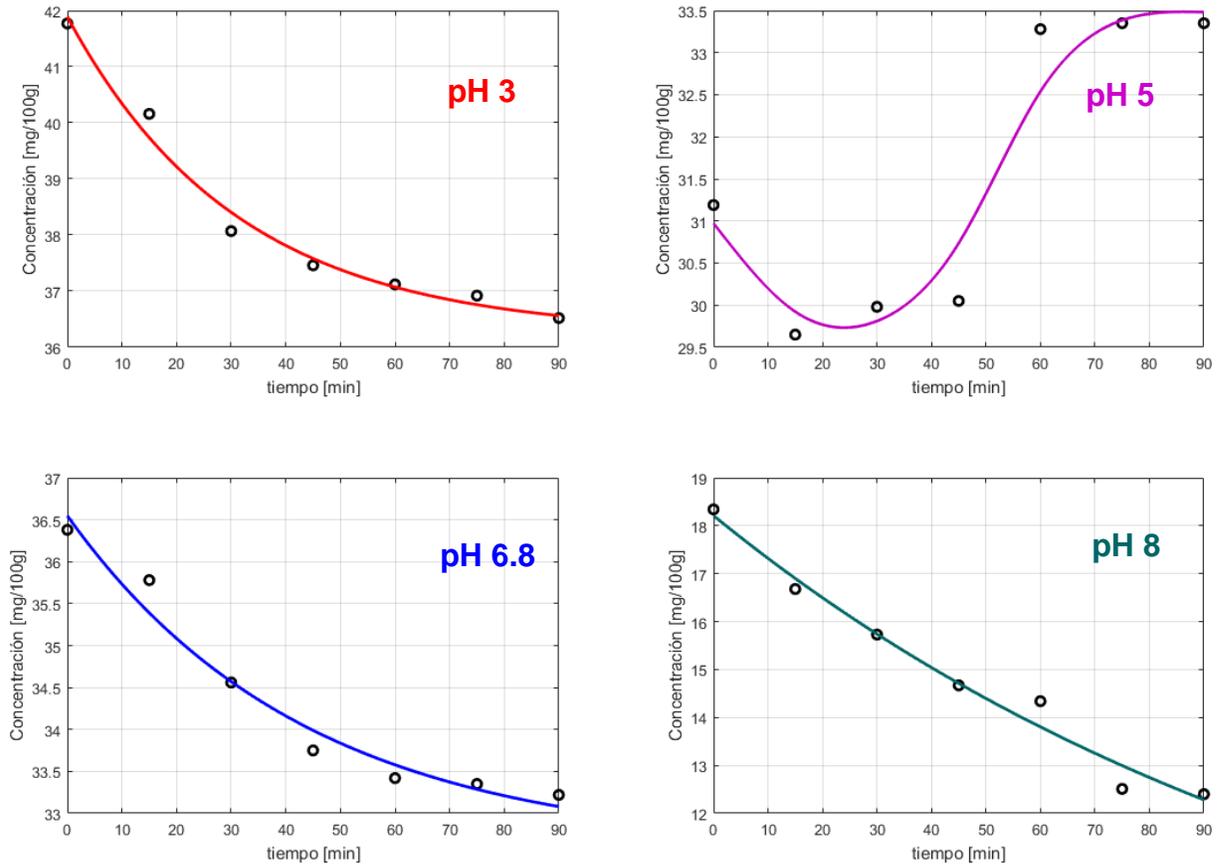


Figura 6.13 Cinética de degradación de Betaxantinas ante distintos pH

Tabla 6.11 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 5

Método de Ajuste	Betacianinas			Betaxantinas		
	Parámetro	Valores	r ² ajustado	Parámetros	Valores	r ² ajustado
Smoothing Spline (Matlab)	λ	0.0016148	0.8475	λ	0.0016148	0.8405

Para el pH 5 la cinética de degradación tuvo un comportamiento distinto, por lo que se ajustó con la herramienta *smoothing spline* de Matlab para describir la curvatura de los datos.

En el trabajo de Moreno et al. (2002) analizaron la cinética de degradación de betalaínas con distintos solventes y valores de pH, reportando que las betaxantinas sufren mayor degradación que las betacianinas ante el pH; sin embargo, en un medio acuoso nuestros resultados indican que la degradación tanto de betacianinas como betaxantinas es muy similar entre sí. Por tanto el pH 5 sería el mejor valor de pH para aplicar estos colorantes en alimentos o durante condiciones de almacenamiento para conservar la intensidad del color.

Tabla 6.12 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 6.8

Modelo cinético	Betacianinas			Betaxantinas		
	Parámetros	Valores	r ² ajustado	Parámetros	Valores	r ² ajustado
CB = a×exp(-b×t)+c	a	7.814	0.9471	a	3.968	0.9558
	b	0.01935		b	0.02299	
	c	62.01		c	32.58	

Tabla 6.13 Parámetros cinéticos para la degradación de betalaínas a un pH de 8

Modelo cinético	Betacianinas			Betaxantinas		
	Parámetros	Valores	r ² ajustado	Parámetros	Valores	r ² ajustado
CB = a×exp(-b×t)+c	a	10.4	0.9440	a	11.46	0.9675
	b	0.01452		b	0.008094	
	c	7.535		c	6.751	

Para los pH de 6.8 y 8 los parámetros cinéticos se presentan en las tablas 6.12 y 6.13 y tienen un comportamiento igual al de las betacianinas y betaxantinas con pH 3, descritas en la tabla 6.10, estos parámetros indican que la degradación de compuestos betalámicos se ajustan a una cinética de primer orden, debido al comportamiento exponencial que presentaron, e corroborar hallados indicando que las betalaínas a esos pH no permanecen estables.

También puede observarse que luego del valor de pH 5, los pH que mantienen concentraciones más altas tanto de betacianinas como betalaínas son en orden decreciente: pH 3, pH 6.8 y pH 8; siendo este último una condición inadecuada pues disminuye drásticamente la absorbancia (y por tanto concentración) de estas moléculas, cambiando sus características y modificando el color de los extractos.

7 CONCLUSIONES

Se identificaron betalaínas en el colorante de remolacha, variedad Boro F1 las cuales se caracterizaron y cuantificaron por el método espectrofotometría UV-VIS a longitudes de onda de 483 nm las betaxantinas y a 538 nm las betacianinas, respectivamente.

Se identificaron los factores que influyen significativamente en el contenido de betalaínas durante el proceso de lixiviación y se determinaron las condiciones que favorecen el contenido de estos compuestos colorantes.

Las cáscaras de remolacha son un factor muy importante a considerar para extraer betalaínas ya que posee mayor contenido en comparación con la pulpa, por lo que se deben de aprovechar como materia prima.

Según nuestros resultados, las betalaínas al degradarse siguen una cinética de degradación de primer orden. Al degradarse por completo las betalaínas, no se logra identificar los picos máximos de absorción, dentro del espectro visible, pero algo muy interesante es que se logra observar que aumenta la cantidad de moléculas que absorben en el rango ultravioleta pues la absorbancia a longitudes menores a 400 nm incrementa.

Las betalaínas de la cáscara de remolacha pueden ser muy buenos colorantes naturales con alta capacidad de tinción y su uso para alimentos y bebidas es inocuo para la salud, por lo que representan una excelente alternativa al uso de colorantes artificiales en alimentos.

8 RECOMENDACIONES

Los factores y condiciones más relevantes a considerar para la obtención de extractos acuosos de betalaínas por medio de la lixiviación como método de extracción recomendados son: Parte de la raíz (Cáscara), Temperatura a 40 °C, Disolvente etanol al 25% en agua, secuestrante EDTA, tiempo de extracción 1 hora, preparación de la muestra (rayada) y agitación de 120 rpm.

No se recomiendan largos tiempos de extracción, altas temperaturas, ni concentraciones altas de etanol, debido a que estas condiciones desfavorecen la concentración de betalaínas.

Para mantener la estabilidad de las betalaínas presentes en el colorante es necesario almacenarlo en condiciones de refrigeración a 4°C, sin presencia de luz y oxígeno, a pH de 5.0, y sin aplicar tratamientos térmicos.

9 BIBLIOGRAFÍA

Badui, S. 2006. *Quimic*, México, Pearson educación de México, s.a. de c.v.

Barzola, Casariego, Nuñez & Rodríguez 2018. Cinética de la degradación térmica de las betalainas en extractos de hojas de teca (*tectona grandis* l.). *Ciencia y tecnología de alimentos*.

Benites, H. 2015. *Comparación de los solventes agua y etanol en la extracción de betalainas a partir de las brácteas de buganvilla (bougainvillea glabra ch.)*. Pregrado, Universidad Nacional del Centro de Perú.

Caiza, I. 2017. *Aprovechamiento de las propiedades nutricionales de la remolacha (beta vulgaris), para la formulación de un alimento agroindustrial dirigido a niños*. Ingeniería universidad estatal de bolívar. Facultad de ciencias agropecuarias, recursos

Calvo, M. 2018. *Trabajo fin de grado colorantes alimentarios*. Licenciatura en farmacia., Universidad Complutense.

Castellanos, E. & Yahia, E. 2008. Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry *agricultural and food chemistry, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Mexico*

Córdoba, Z. 2014. *Obtención de un colorante orgánico para la industria alimentaria a partir del fruto pitahaya (hylocereus undatus), en el laboratorio n° 107 del departamento de química de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (Unan-Managua)*. Licenciatura tesis(otra). Unan-Managua.

De Ugaz, O. L. S. 1997. *Colorantes naturales*, pontificia Universidad Católica del Perú, fondo editorial.

Díaz, N., Ruiz, J., Reyes, E., Cejudo, A., Novo, J., Peinado, J., ;, M.-V. & Fiñana, I. 2010. Espectrofometría: espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de bioquímica y biología molecular, Campus Universitario de Rabanales, .

Fennema, O. 2000. *Química de los alimentos*, acribia, editorial, s.a.

García, V. 2008. *Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de opuntia stricta*. Ingeniería química, escuela técnica superior de ingeniería agronómica.

Herbach, K., Stintzing, F. & Carle, R. 2006. Betalain stability and degradation—structural and chromatic aspects. *Journal of food science*, 71, r41-r50.

Huang, A. & Von Elbe, J. 1987. Effect of ph on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of food science*, 52, 1689-1693.

Llamo, E., Rojas, G. & Ruiz, J. 2015. Cinética de la degradación de betalainas y fenoles totales durante la cocción de la quinua (*Chenopodium quinoa*). *Ingeniería: ciencia, tecnología e innovación*, 2, 85-85.

Mancha, M., Monterrubio, A., Vega, R. & Martínez, A. 2019. Estructura y estabilidad de las betalainas. *Interciencia*, 44, 318-325.

Marín, S. & Mejía, C. 2012. *Extracción de colorante a partir de la flor de Jamaica*. Universidad Nacional de Ingeniería.

Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L. & Cuadrado, C. 2013. *Tabla de composición de alimentos* Organización Panamericana de la Salud.

Moreno & Betancourt 2007. Evaluación de la estabilidad de bebidas cítricas acondicionadas con dos fuentes naturales de betalainas: tuna y remolacha. *Bioagro*, 19, 149-159.

Moreno, V. & Belén 2002. Degradación de betalainas en remolacha (*Beta vulgaris* L.) Estudio cinético. *Científica*, 12, 0.

Moreno, M. 2017. La importancia del color en los alimentos. *Revista Alimentaria*, 6.

Muñoz, O. 2003. *Antocianinas y betalainas colorantes naturales de aplicación industrial*, Santiago de Chile.

Orellana, L. 2015. *Extracción y caracterización de los pigmentos naturales presentes en Beta vulgaris (remolacha) para la propuesta de una formulación cosmética y evaluación de su estabilidad fisicoquímica y microbiológica* Licenciatura investigativa, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ortega, A. 2011. *Caracterización física, química y nutricional de la remolacha roja (Beta vulgaris) cultivada en el Ecuador*. Ingeniera en alimentos Universidad Tecnológica Equinoccial.

Palacios, J. 2008. *Diseño, construcción y evaluación de parámetros de operación de un equipo de extracción sólido-líquido para el laboratorio de procesos unitarios de la facultad de ingeniería química de la universidad nacional del centro del Perú*. Ingeniero, Universidad Nacional del Centro del Perú.

Ramírez, W. 1996. *Lixiviación a contracorriente en un extractor por lotes, para obtener aceite e insecticida de Nim a escala de planta piloto* B. Sc. Thesis, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Ingeniería

Rojas, G. 2012. *Comparación de dos métodos pulpa de pitaya*. Licenciatura en tecnología de alimentos, Universidad de Costa Rica.

Thimmaraju, R. 2005. *Genetically transformed root cultures of red beet (Beta vulgaris L.) for the production of food colour and peroxidase*. Doctor of Philosophy in Biotechnology (PhD), University of Mysore.

Urbano, L. 2014. *Elaboración de snack nutracéuticos de quinua (chenopodium quinoa willd) con remolacha (beta vulgaris) como colorante*. Bioquímico farmacéutico licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Von Elbe, J., Schwartz, S. & Hildenbrand, B. 1981. Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *Journal of food science*, 46, 1713-1715.

Wilson, 2017. Betalaínas: colorantes naturales con actividad antioxidante.

Wissgott, U. & Bortlik, K. 1996. Prospects for new natural food colorants. *Trends in food science & technology*, 7, 298-302.

Yanchapanta, D. 2011. *Obtención de un colorante natural la betalaina a partir de la remolacha (beta vulgaris) para su aplicación en alimentos y bebidas, sin que sus propiedades organolépticas (sabor y olor) afecten su utilidad. (ingeniero en bioquímica.), facultad de ciencia e ingeniería en alimentos, ambato, ecuador*. Ingeniero en Bioquímica., Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Yizhong, C., Sun, M., Schliemann, W. & Corke, H. 2001. Chemical stability and colorant properties of betaxanthin pigments from celosia argentea. *Journal of agricultural food chemistry*, 49, 4429-4435.

Yurivilca, E. 2014. *Evaluación de la cinética de degradación de betalaínas del néctar de tuna (opuntia ficus indica) ecotipo morado por tratamiento térmico*. Pregrado Ingeniero Agroindustrial, Universidad Nacional del Centro de Perú.

ANEXOS

Apéndice A

Datos Experimentales

Tabla A-1. Resultados de la estabilidad del colorante frente al pH 3

Tiempo (min)	Abs a 538	Abs a 483	Betacianinas (mg/100g)	Betaxantinas (mg/100g)
0	0.776	0.62	74.69	41.77
15	0.766	0.596	73.73	40.16
30	0.749	0.565	72.09	38.07
45	0.735	0.556	70.74	37.46
60	0.734	0.551	70.65	37.12
75	0.732	0.548	70.46	36.92
90	0.727	0.542	69.97	36.52

TABLA A-2. Resultados de la estabilidad del colorante frente al pH 5

Tiempo (min)	Abs a 538	Abs a 483	Betacianinas (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)
0	0.636	0.463	61.22	31.19
15	0.613	0.44	59.00	29.65
30	0.624	0.445	60.06	29.98
45	0.665	0.446	64.01	30.05
60	0.665	0.494	64.01	33.28
75	0.668	0.495	64.30	33.35
90	0.671	0.495	64.58	33.35

TABLA A-3. Resultados de la estabilidad del colorante frente al pH 6.82

(Sin ajustar, pH propio del extracto)

Tiempo (min)	Abs a 538	Abs a 483	Betacianinas (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)
0	0.722	0.54	69.49	36.38
15	0.714	0.531	68.72	35.78
30	0.685	0.513	65.93	34.56
45	0.678	0.501	65.26	33.75
60	0.667	0.496	64.20	33.42
75	0.663	0.495	63.81	33.35
90	0.661	0.493	63.62	33.22

TABLA A-4. Resultados de la estabilidad del colorante frente al pH 8

Tiempo (min)	Abs a 538	Abs a 483	Betacianinas (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)
0	0.228	0.33	18.10	18.34
15	0.2	0.3	15.88	16.68
30	0.17	0.264	13.50	14.67
45	0.167	0.283	13.26	15.73
60	0.161	0.258	12.78	14.34
75	0.133	0.225	10.56	12.51
90	0.129	0.223	10.24	12.40

TABLA A-5. Resultados de la estabilidad del colorante frente al tratamiento térmico

Tiempo (h)	Abs a 538 nm	Abs a 483 nm	Betacianinas (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)
0	1.67	1.674	160.74	112.79
15	1.424	1.07	137.06	72.09
30	0.921	0.833	88.65	56.12
45	0.692	0.701	66.61	47.23
60	0.372	0.339	35.81	22.84
75	0.343	0.336	33.01	22.64
90	0.196	0.217	18.87	14.62

TABLA A-6. Resultados de la estabilidad del colorante almacenado a temperatura de 4°C durante 30 días

Días	Abs a 538 nm	Abs a 483 nm	Betacianinas (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)
1	1.376	1.294	132.44	87.183
3	0.894	0.862	86.047	58.077
5	0.875	0.841	84.218	56.662
7	0.869	0.815	83.641	54.910
9	0.847	0.721	81.523	48.577
11	0.843	0.696	81.138	46.893
13	0.841	0.672	80.946	45.276
15	0.837	0.643	80.561	43.322
17	0.835	0.624	80.368	42.042
19	0.834	0.622	80.272	41.907
21	0.831	0.619	79.983	41.705
25	0.83	0.618	79.887	41.637
27	0.83	0.616	79.887	41.503
30	0.828	0.615	79.695	41.435

TABLA A-7. Resultados de la estabilidad del colorante almacenado a temperatura ambiente durante 30 días

Días	Abs a 538 nm	Abs a 483 nm	Betacianinas (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)
1	1.368	1.291	131.67	86.98
3	0.891	0.85	85.76	57.27
5	0.749	0.828	72.09	55.79
7	0.405	0.539	38.98	36.32
9	0.352	0.53	33.88	35.71
11	0.225	0.395	21.66	26.61
13	0.223	0.376	21.46	25.33
15	0.221	0.353	21.27	23.78
17	0.179	0.346	17.23	23.31
19	0.126	0.267	12.13	17.99
21	0.123	0.263	11.84	17.72
25	0.121	0.261	11.65	17.58
27	0.118	0.253	11.36	17.05
30	0.113	0.25	10.88	16.84

Apéndice B

Equipos Usados en los Experimentos

Equipo usado en la lixiviación



Figura B-1. Plancha de calentamiento con agitación termica
Thermo Scientific

Equipo usado en la filtración



Figura B-2. Bomba al vacío – embudo Buchner

Equipo usado para identificación y cuantificación de betalaínas



Figura B-3. Espectrofotómetro UV- visible, Genesys 6

Equipo usado para medir el pH del colorante



Figura B-4. pHmetro Thermo Scientific

Apendice C

Fotos de experimentos

Etapas del proceso de extracción del colorante



Figura C-1. Lavado del material vegetal



Figura C-2. Secado del material vegetal



Figura C-3. Preparación del material vegetal
(En láminas)



Figura C-4. Preparación del material vegetal
(Rayado)



Figura C-5. Pesado del material vegetal (cantidad establecida para la extracción en el primer objetivo)



Figura C-6. Pesado del material (cantidad establecida para la extracción en el segundo y tercer objetivo)



Figura C-7. Material puesto en contacto con el disolvente, etanol



Figura C-8. Lixiviación



Figura C-9. Filtración a vacío del extracto acuoso colorante



Figura C-10. Sólido inerte separado del extracto



Figura C-11. Colorantes obtenidos a distintas Condiciones de extracción

Estudio de la cinética de degradación de betalainas

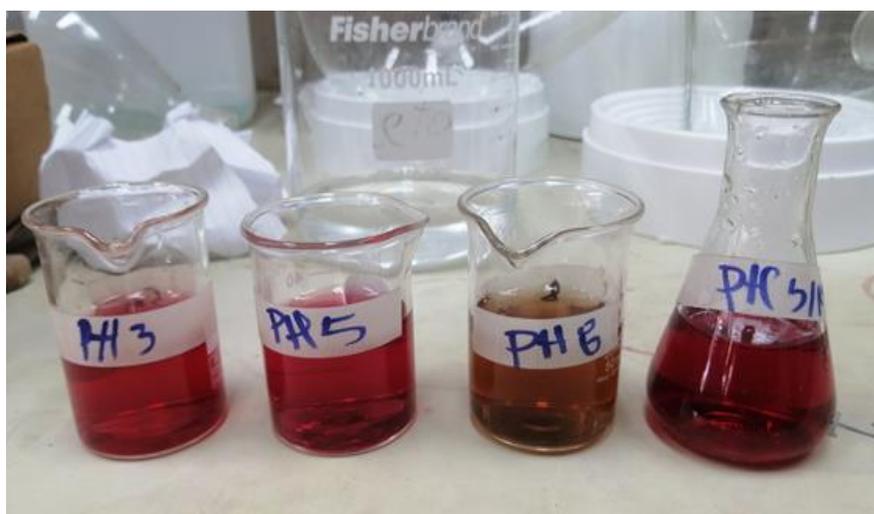


Figura C-12. Extractos con pH modificados 3.0, 5.0, 8.0, a partir del pH propio de extracto



Figura C-13. Extractos sometidos a calentamiento con temperatura constante de 78° por 90 minutos



Figura C-14. Extractos degradados en tiempos de ,45,60, 75 y 90 min, diluidos para su analisis espectrofotometrico.

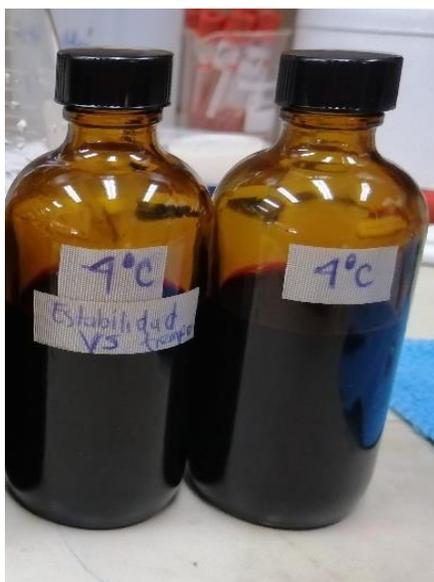


Figura C-15. Extractos colorantes Almacenados a 4°C en refrigeración durante 30 días.



Figura C-16. Extractos colorantes Almacenados a 30°C, durante 30 días.



Figura C-17. Lecturas de absorbancias en el espectrofotómetro



Figura C-18. Extractos diluidos 20 veces en etanol al 50%



Figura C-19. Extractos colorantes almacenados a 4 °C y a 30°C, 7 días después de la extracción



Figura C-20. Colorante almacenado a 4°C, 30 días después de la extracción



Figura C-21. Colorante almacenado a temperatura de 30°C, 30 días después de la extracción