



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
MAESTRÍA EN BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA INDUSTRIALIZACIÓN
DE ALIMENTOS

**Evaluación de la capacidad colorante y de su estabilidad
en subproductos del escaldado de *Beta vulgaris* L. var
conditiva.**

Tesis presentada para optar al título de Magíster de la Universidad de Buenos
Aires en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de Alimentos

Químico de Alimentos Carlos Mauricio Otálora González

Directora de tesis: Dra. Lía Noemí Gerschenson

Co-Directora de tesis: Dra. María Florencia Basanta

Lugar de Trabajo: Departamento de Industrias, FCEN, UBA

Fecha de presentación del ejemplar:

Fecha de Defensa:

Buenos Aires, 2019

Evaluación de la capacidad colorante y de su estabilidad en subproductos del escaldado de *Beta vulgaris* L. var *conditiva*.

Resumen

La preservación de alimentos de origen vegetal genera subproductos con capacidades como nutrientes, espesantes, colorantes y otras, por lo cual podrían utilizarse para la obtención de aditivos o ingredientes alimentarios. El propósito de este trabajo fue la evaluación del uso de los subproductos que se generan en la industrialización de la remolacha (*Beta vulgaris* L. var *conditiva*), tales como las aguas de escaldado y recortes del propio vegetal, como fuente de colorantes naturales en el procesamiento de alimentos. Para ello, se estudió la influencia de la temperatura (5-45 °C) y pH (3,6- 8,0) en la estabilidad de los compuestos betalámicos presentes y se caracterizaron dichos compuestos antes y después de tratamiento térmico a 45 °C mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS, todo ello con el fin de establecer las condiciones que resultan adecuadas para el uso de estos colorantes naturales.

Palabras clave: *Beta vulgaris* L. var *conditiva*, industrialización, subproductos, capacidad colorante.

Evaluation of the coloring capacity and stability of the by-products of blanching of *Beta vulgaris* L. var *conditiva*.

Abstract

The preservation of foods of vegetable origin generates by-products with capacities as nutrients, thickeners, dyes and others and, as a consequence, they might be used to obtain food additives or ingredients. The purpose of this work was the evaluation of the use of the by-products that are generated in the beet (*Beta vulgaris* L. var *conditiva*) industrialization, such as the blanching waters and trims of the vegetable itself, as a source of natural colorants in food processing. To this end, the influence of temperature (5-45 ° C) and pH (3.6-8.0) on the stability of the betalamic compounds, was studied and the compounds were identified before and after heat treatment at 45 ° C by HPLC-DAD-ESI-MS / MS, all in order to establish the conditions that are suitable for the use of these natural dyes.

Key words: *Beta vulgaris* L. var *conditiva*, industrialization, by-products, colorant capacity.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen de los Milagros por darme la oportunidad de haberme permitido formarme como parte íntegra de la sociedad y como profesional y por haber puesto en mi pensamiento la oportunidad de viajar a Argentina.

A mis padres, Sergio y Aida Consuelo por su paciencia, apoyo, cariño, amor y entrega para poder lograr todos mis objetivos propuestos hasta ahora.

A la Doctora, Lía Noemí Gerschenson, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Además por su apoyo, acompañamiento y compromiso durante todo el proceso de estudios y culminación de la tesis, por su valiosa voluntad de trabajo y por ser un gran ejemplo de persona a seguir.

A la Doctora, Florencia Basanta, por su amistad, paciencia y carisma para enseñar, por todo el esfuerzo y dedicación durante la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeras de grupo, investigadoras, becarias doctorales, tesistas de grado, por su valiosa amistad, compañerismo y manifestaciones de aprecio hacia mí. De corazón gracias a todas.

A todos los miembros que conforman la familia de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires, por la formación académica y personal, la cual, ayudó a forjar mi identidad como profesional idóneo para la comunidad.

A todas las personas que de alguna manera u otra, permitieron la realización de este trabajo, siendo altruistas con el conocimiento, ofreciendo herramientas para enriquecer esta bellísima labor que tantas sensaciones y sentimiento me dejó.

DEDICATORIA

A mis Padres, que son mi razón de ser, mi gran sostén emocional, quienes con presencia y palabras enaltecedoras me dieron fuerza, ánimo y contención en todo momento.

Este trabajo es el fruto de los valores inculcados por ustedes, con responsabilidad, respeto, compromiso, dedicación y vocación, todos los objetivos se pueden alcanzar.

Muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Residuos agroindustriales	2
1.2. Remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i> L. var <i>conditiva</i>)	5
1.2.1. Origen	5
1.2.2. Taxonomía de la remolacha	5
1.2.3. Valor nutricional.....	7
1.3. Los colorantes alimentarios.....	9
1.3.1. Colorantes Naturales.....	11
1.3.2. Colorantes sintéticos	13
1.4. Características de color.....	13
1.5. Betalaínas	19
1.5.1. Estructura de las betacianinas.....	23
1.5.2. Estructura de las betaxantinas	25
1.5.3. Estabilidad de las betalaínas	28
1.5.3.1. Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas	28
1.5.3.2. Temperatura	29
1.5.3.3. pH.....	30
1.5.3.4. Actividad de agua (a_w)	31
1.5.3.5. Luz	31
1.5.3.6. Oxígeno	31
1.5.3.7. Antioxidantes	32
1.5.3.8. Cationes Metálicos	32
1.5.4. Vías de degradación de las betalaínas	33
1.5.4.1. Isomerización	34
1.5.4.2. Desglicosilación	35
1.5.4.3. Hidrólisis	35
1.5.4.4. Descarboxilación	35
1.5.4.5. Deshidrogenación.....	36
1.5.5. Aplicaciones de las betalaínas	36
1.5.5.1. Industria de Alimentos	36
1.5.5.2. Industria Farmacéutica	37
1.5.5.3. Industria de Cosméticos.....	37
1.5.6. Capacidad antioxidante de betalaínas	38
1.6. Microencapsulación.....	40
1.7. Pared celular.....	41
1.7.1. Celulosa	44
1.7.2. Hemicelulosa.....	45
1.7.3. Pectina	46
1.7.4. Lignina	46
1.7.5. Otros componentes de la pared celular	47

1.7.6. Pared celular de la remolacha	48
2. OBJETIVOS	50
2.1. Generales.....	51
2.2. Específicos	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1. Reactivos químicos y solventes	53
3.2. Preparación de las muestras.....	53
3.2.1. Evaluación de la eficiencia del escaldado aplicado	55
3.2.1.1. Preparación del extracto enzimático	55
3.2.1.2. Peroxidasa (POX).....	55
3.2.1.3. Polifenoloxidasas (PPO).....	56
3.3. Estudio de estabilidad frente al pH y la temperatura de las betalaínas presentes en las aguas de escaldado	57
3.4. Estudio de estabilidad frente a la temperatura de las betalaínas presentes en los polvos liofilizados.....	58
3.5. Estudio de la estabilidad frente al pH y la temperatura de betalaínas presentes en polvos de remolacha incorporados en sistemas modelo	59
3.6. Espectros de absorción de las aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas modelo.....	61
3.7. Medición del contenido de betalaínas en aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas modelo.	61
3.8. Medición de color en aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas modelo.....	64
3.9. Humedad de los polvos de remolacha	64
3.10. Actividad acuosa de los polvos de remolacha.....	65
3.11. Fraccionamiento de componentes de la pared celular por hidrólisis ácidas en polvos de remolacha	65
3.11.1. Lignina.....	65
3.11.2. Hidratos de carbono no celulósicos, celulosa y proteínas	66
3.11.3. Ácidos urónicos	67
3.12. Determinación de carbohidratos.....	67
3.13. Determinación de ácidos urónicos	68
3.14. Determinación de proteínas	68

3.15. Microscopia electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva de polvos de remolacha	69
3.16. Análisis cromatográfico de betalaínas	70
3.16.1. Extracción de betalaínas a partir de las aguas de escaldado.....	70
3.16.2. Extracción de betalaínas a partir de los polvos de remolacha.....	70
3.16.3. Caracterización por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).....	71
3.16.4. Caracterización por espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-MS/MS)	71
3.17. Diseño experimental y análisis estadístico	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.1. Eficiencia de las técnicas de escaldado ensayadas en tejidos de remolacha (<i>Beta vulgaris</i> L. var <i>conditiva</i>).....	74
4.2. Estudio de la estabilidad de betalaínas en aguas de escaldado de remolacha (<i>Beta vulgaris</i> L. var <i>conditiva</i>).....	75
4.2.1. Parámetros de color en aguas de escaldado.....	75
4.2.2. Contenido de betacianinas y betaxantinas de las aguas de escaldado	76
4.2.3. Estudio de estabilidad frente al pH y la temperatura de las betalaínas presentes en las aguas de escaldado de remolacha	77
4.2.3.1. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los espectros UV/Visible de la aguas de escaldado de remolacha.....	77
4.2.3.2. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en la concentración de las betalaínas en las aguas de escaldado	81
4.2.3.3. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los parámetros de color de las aguas de escaldado	88
4.2.3.4. Análisis fotográfico de las aguas de escaldado almacenadas a los distintos pHs y temperaturas.....	95
4.2.4. Conclusiones parciales sobre la estabilidad frente al pH y la temperatura, de las betalaínas presentes en las aguas de escaldado de remolacha	100
4.3. Estudio de la estabilidad de betalaínas en polvos liofilizados de remolacha (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>conditiva</i>).....	101
4.3.1. Análisis de polvos liofilizados	101
4.3.2. Composición química de los polvos liofilizados de remolacha	102
4.3.3. Análisis por microscopía de los polvos liofilizados de remolacha.....	104
4.3.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	104
4.3.3.2. Espectroscopía de energía dispersiva (EDS).....	105
4.3.4. Parámetros de color para polvos liofilizados de remolacha	107
4.3.5. Contenido de betacianinas y betaxantinas en polvos liofilizados de remolacha	109
4.3.6. Estudio de la estabilidad a 45°C de los polvos liofilizados obtenidos a partir de subproductos del escaldado de remolacha	110
4.3.6.1. Influencia del almacenamiento a 45 °C en los espectros UV/Visible de los polvos liofilizados de remolacha.....	110
4.3.6.2. Influencia del almacenamiento a 45°C en la concentración de betalaínas en los polvos liofilizados de remolacha	112

4.3.6.3. Influencia del almacenamiento a 45 °C en los parámetros de color de los polvos liofilizados de remolacha.....	115
4.3.7. Conclusiones parciales sobre la estabilidad frente a la temperatura de las betalaínas presentes en los polvos liofilizados de remolacha.....	117
4.3.8. Estudio de la estabilidad frente al pH y la temperatura de betalaínas presentes en polvos de remolacha e incluidas en sistemas modelo	118
4.3.8.1. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los espectros de absorción UV/visible de las betalaínas presentes en los sistemas modelo	120
4.3.8.2. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en la concentración de las betalaínas presentes en los sistemas modelo.....	122
4.3.8.3. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los parámetros de color de los sistemas modelo	124
4.3.9. Conclusiones parciales sobre la estabilidad frente a la temperatura de las betalaínas presentes en los polvos liofilizados de remolacha e incluidas en sistemas modelo.....	129
4.4. Análisis cromatográfico de betalaínas presentes en los polvos y aguas de escaldado de tejidos de remolacha sin y con almacenamiento a 45 °C	130
4.4.1. Análisis cromatográfico de betalaínas presentes en los polvos con y sin tratamiento térmico a 45 °C	130
4.4.2. Análisis cromatográfico de las aguas de escaldado con y sin tratamiento térmico a 45 °C.....	137
4.4.3. Conclusiones parciales sobre el análisis cromatográfico de betalaínas en polvos y aguas de escaldado	140
5. CONCLUSIONES	141
6. BIBLIOGRAFÍA	144
7. ANEXOS.....	156
7.1. ANEXO 1. Estudio de la estabilidad de los pigmentos en los polvos de remolacha tratados a 5, 25 y 45 °C.	157
7.2. ANEXO 2. Datos experimentales correspondientes al estudio realizado sobre el sistema modelo.....	160



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales generan importantes problemas de índole ambiental, económica y social. Estos residuos afectan el ecosistema y, por lo tanto, contribuyen al cambio climático. Asimismo implican una pérdida de recursos naturales, ya de por sí escasos. Es por ello que los gobiernos, organizaciones ambientales y sociales, empresarios y académicos se encuentran dedicados a contribuir a la eficiente gestión de los residuos y a su uso como recursos, empleando tecnologías amigables con el medio para ayudar a solucionar estos problemas (May, 2000; Laufenberg, Kunz & Nystroem, 2003).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura estima que alrededor de 1300 millones de toneladas de alimentos en el mundo se desechan (pérdidas y desperdicios), aproximadamente el 30% de la oferta alimenticia mundial. Estos desechos alcanzan a toda la cadena agroalimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo en hogares y se traducen en un costo económico, social y ambiental muy significativo. Las pérdidas de alimentos hacen referencia específicamente a la reducción en la cantidad o calidad del producto comestible en los eslabones iniciales de la cadena de suministro, disminuyendo la cantidad global de alimento para consumo humano. El desperdicio de alimentos se define como el descarte de alimento apto para consumo humano o potencialmente apto a través de un proceso de transformación o industrialización. Esto se da en las etapas más avanzadas de la cadena de suministro, como son la comercialización final y el consumo de los hogares. La FAO propone la reducción de desperdicios y la minimización de las

pérdidas en la producción de alimentos para contribuir a la mayor eficiencia y a una mejor distribución de los alimentos, lo que ayudaría a terminar con el hambre de millones de personas (FAO, 2017).

Argentina tiene una superficie continental de aproximadamente 2,8 millones de kilómetros cuadrados y cuenta con unas 34 millones de hectáreas cultivadas, principalmente con soja, trigo, maíz, girasol, sorgo y arroz, también lino y maní. La producción de hortalizas y legumbres ocupa solamente 1,5% de ese total, con unas 500.000 hectáreas. Si bien el volumen de producción de las mismas es de 8 a 10 millones de toneladas, muy inferior al de cereales y oleaginosas, se destaca fundamentalmente por su elevado valor económico por unidad de peso y por su alta producción por unidad de superficie cultivada lo que determina que su cultivo sea una importante actividad económica (Agricultura Argentina, 2017).

La Dirección de Agroalimentos (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Ministerio de Agroindustria), en el año 2015 realizó una estimación de las pérdidas y desperdicios de alimentos (PDA) en Argentina. El ejercicio de cálculo realizado estima un volumen total de PDA de 16 millones de Tn de alimentos, representando esto el 12,5 % de la producción agroalimentaria. Este valor es muy inferior al total de 30% estimado por la FAO a nivel mundial, si bien se observan sectores como el hortícola o frutícola con porcentajes similares o superiores al promedio mundial PDA. Así, el total estimado para Argentina comprende, aproximadamente, a 14,5 millones de toneladas de pérdidas (11,3%) y a 1,5 millones de toneladas de desperdicio (1,2%). Las pérdidas explican el 90% del

total de PDA estimado de Argentina. Resulta así un volumen estimado de pérdidas de 362 kg per cápita año (Rivas et al., 2015).

Estos residuos agroindustriales, adecuadamente utilizados, pueden añadir alto valor a las materias primas al mismo tiempo que contribuyen al desarrollo sustentable y a la protección ambiental. En el caso de los residuos de frutas y hortalizas, ellos pueden servir como fuente de polisacáridos, antioxidantes y pigmentos que podrían usarse como aditivos e ingredientes en la propia industria alimentaria (Carocho, Barreiro, Morales & Ferreira, 2014).

A nivel de la industria, el uso de pigmentos naturales como colorantes ha aumentado en los alimentos y bebidas en reemplazo de los colorantes sintéticos. Ello se debe a la creciente conciencia acerca de los riesgos que involucra el consumo y los potenciales efectos dañinos de los colorantes sintéticos. Los pigmentos naturales comúnmente usados incluyen las antocianinas, carotenoides, betalaínas y clorofilas, entre otros y se los puede obtener a partir de residuos agroindustriales de tejidos vegetales. El consumo de estos pigmentos naturales ha sido asociado al enlentecimiento del envejecimiento y a la reducción del cáncer y la diabetes, entre otras enfermedades, por lo cual su uso produciría beneficios adicionales vinculados a su efecto en aspectos específicos de la salud (Inanc, 2011; Carocho et al., 2014; Fiedor & Burda, 2014).

1.2. Remolacha roja (*Beta vulgaris* L. var *conditiva*)

1.2.1. Origen

La remolacha es una planta de la sub-familia de las Chenopodiáceas, originaria del sur de Europa. Procede de la especie silvestre *Beta marítima* Linn, que crece libremente en muchas zonas marítimas del sur de Europa y norte de África. Las remolachas fueron utilizadas en la antigüedad, cuando no solamente se consumía la raíz engrosada sino las hojas que tienen un sabor semejante a las espinacas y que todavía siguen utilizándose en Francia.

Existen distintas variedades de remolacha, entre las que destacan la remolacha roja y la remolacha blanca o remolacha alargada. Ambas son muy ricas en azúcar que es mucho más asimilable que la proveniente de la caña de azúcar. También son muy ricas en almidón. Ambas poseen raíces comestibles y sus hojas pueden usarse como ingrediente vegetal. Siendo mucho más sabrosa, la remolacha roja es la que se destina generalmente a la alimentación como hortaliza fresca, mientras que la blanca se destina fundamentalmente a la producción de azúcar o a la alimentación animal.

1.2.2. Taxonomía de la remolacha

La remolacha (*Beta vulgaris* L.) es una planta perteneciente al orden Caryophyllales, familia Amaranthaceae, sub-familia Chenopodioideae, género *Beta* especie *B.vulgaris*. Su nombre nominal es *Beta vulgaris* L. Existen numerosas variedades de la especie, una es la *conditiva* que corresponde a la remolacha roja comestible.

Otra variedad se caracteriza por tener raíces poco engrosadas y es la *B. vulgaris* L. var. *cicla*, la cual tiene muy desarrollado el nervio medio y es conocida como acelga.

B. vulgaris L. var *conditiva* (**Figura 1.1**) posee raíces muy engrosadas (≥ 3 cm de diámetro) y se conoce como remolacha comestible, siendo característico el color rojo de sus raíces. Su taxonomía y morfología se reporta en la **Tabla 1.1**.



Figura 1.1. *Beta vulgaris* L. var *conditiva*

Tabla 1.1. Taxonomía y morfología de la remolacha.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae
Sub-familia	Chenopodioideae
Género	<i>Beta</i>
Especie	<i>B. vulgaris</i>
Nombre binomial	<i>Beta vulgaris</i>

El comportamiento de tinción rojo de *Betavulgaris* L. var *conditiva* se debe a las betalaínas. Éstas se encuentran acumuladas en las vacuolas de la célula.

Existen en la naturaleza diferentes estructuras químicas de la betalaínas y se distribuyen en dos grandes grupos, las betacianinas (color violeta-rojo) y las betaxantinas (color amarillo-naranja) (Stinzing & Carle, 2007). Dentro de las betacianinas, en la remolacha roja, la betanina constituye un 75-95% de los pigmentos, siendo los otros la isobetanina, prebetanina e isoprebetanina. Los dos últimos son monoésteres sulfatados de la betanina e isobetanina, respectivamente. Los pigmentos amarillos más abundantes en la remolacha son vulgaxantina I y II. La presencia de betalaínas en plantas es mutuamente excluyente de la de antocianinas (Harris et al., 2012).

1.2.3. Valor nutricional

En la **Tabla 1.2** se observa la composición de 100 g de porción comestible de remolacha y su valor energético. La remolacha es un alimento rico en hierro lo que la hace muy interesante para su consumo por las mujeres, quienes necesitan fundamentalmente el aporte de este mineral, durante el embarazo y durante la edad reproductiva.

Es, además, un vegetal que contiene ácido fólico, del cual esta planta es una de las que posee mayor cantidad en su parte comestible. Este ácido contribuye a la creación de células nuevas y también, junto con el hierro, a la producción de glóbulos rojos. También interviene en la producción del aminoácido metionina, cuya existencia es necesaria para la buena salud del cabello, las uñas o la piel. También hay que mencionar su participación en la producción de la hormona dopamina, la cual juega un papel importante en el trastorno depresivo

mayor, así como en la neurofisiología de un número elevado de los síntomas más debilitantes y con mayor prevalencia de la depresión.

Es conveniente comer este alimento crudo, dado que el ácido fólico se pierde con la cocción. Hay que destacar su riqueza en fibras, muy útiles para vaciar el intestino y prevenir el estreñimiento. Debería ser prudentes para su utilización aquellas personas que tengan tendencia a producir cálculos en el riñón, por su riqueza en oxalatos, al igual que ocurre con las espinacas.

Tabla 1.2. Composición de remolacha.

Composición	Por 100g de porción comestible
Energía (Kcal)	37
Proteínas (g)	1,3
Lípidos totales (g)	0
Carbohidratos (g)	6,4
Fibra (g)	3,1
Agua (g)	89,2
Calcio (mg)	23
Hierro (mg)	0,8
Magnesio (mg)	15
Zinc (mg)	0,4
Sodio (mg)	84
Potasio (mg)	300
Fósforo (mg)	31
Selenio (mg)	1
Tiamina (mg)	0,03
Riboflavina (mg)	0,05
Niacina (mg)	0,3
Vitamina B ₆ (mg)	0,05
Vitamina C (mg)	10
Folato (μg)	80

Adaptado de Moreiras, Cabrera y Cuadrado (2010).

1.3. Los colorantes alimentarios

El color es uno de los atributos de calidad más importantes en los alimentos y se considera un importante factor de aceptabilidad por el consumidor (Azeredo, 2009). Realiza un importante aporte a la apreciación de la apariencia condicionando el primer juicio de la calidad. Tiende, a veces, a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor, condicionando el éxito o fracaso de un producto en el mercado.

Los alimentos naturales tienen su propio color y lo ideal sería que el mismo se mantuviera a lo largo del proceso de transformación en la industria. Pero la mayoría de las veces no es así, por lo cual la industria de alimentos utiliza colorantes para resaltar, recuperar o uniformar el color original. Los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe en los diferentes lotes de fabricación de un producto y esto sólo puede obtenerse con la ayuda de los aditivos correspondientes.

Los colorantes pueden ser de origen natural o artificial, siendo estos últimos los más usados. Sin embargo, las regulaciones oficiales de la Unión Europea y Estados Unidos han restringido el uso de colorantes artificiales debido a sus posibles efectos adversos sobre la salud (Amin, Abdel Hameid & Abd Elsttar, 2010; Tsuda, 2012). En la actualidad existe un creciente interés en el desarrollo, utilización y consumo de colorantes naturales (Stintzing & Carle, 2004; Moßhammer, Stintzing & Carle, 2005).

De acuerdo a la Food and Drug Administration (2018), un aditivo colorante es cualquier sustancia no prohibida, que es un tinte, pigmento u otra sustancia obtenida por un proceso de síntesis o extraído, aislado o derivado de otra manera, de una fuente vegetal, animal, mineral u otra fuente y que, cuando se agrega o aplica a un alimento, droga o cosmético o al cuerpo humano o cualquier parte del mismo, es capaz (solo o mediante reacción con otra sustancia) de impartirle un color. Las sustancias capaces de impartir un color a un recipiente para alimentos, medicamentos o cosméticos no son aditivos de color a menos que se espere razonablemente que el manejo o uso habitual o razonablemente previsible del envase resulte en la transmisión del color a los contenidos del paquete o cualquier parte de eso. Los ingredientes alimentarios como las cerezas, los pimientos verdes o rojos, el chocolate y el jugo de naranja, que aportan su propio color natural cuando se mezclan con otros alimentos no se consideran aditivos de color; pero cuando una sustancia alimenticia se usa deliberadamente como un color, es un aditivo de color. Esta definición se aplicará independientemente de que dicho ingrediente tenga o no funciones nutritivas u otras además de la propiedad de impartir el color.

Los colorantes se pueden clasificar en dos grandes grupos según su procedencia sea natural o sintética (**Figura 1.2**).

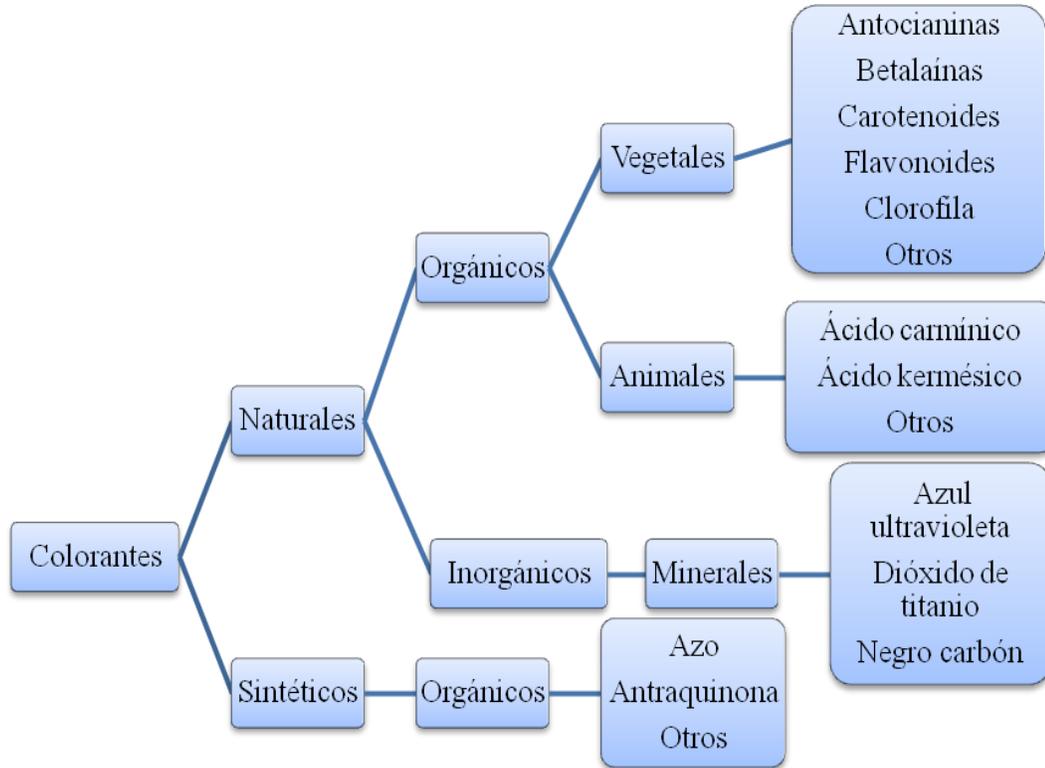


Figura 1.2. Clasificación de Colorantes (Socaciu, 2007)

A continuación nos centraremos en los colorantes naturales ya que ha sido éste el ámbito de desarrollo del presente trabajo.

1.3.1. Colorantes Naturales

Son los que se obtienen de fuentes naturales sin procesos químicos. Los colorantes naturales se consideran en general como inocuos y, consecuentemente, las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes sintéticos. Estos colorantes tienen como desventaja notoria la complejidad con la que se encuentran en la naturaleza. Generalmente no están solos y son necesarios procesos de purificación que los hacen mucho más costosos.

Tabla 1.3. Lista de colorantes naturales

<p>E-100 Curcumina: Se obtiene del rizoma de la cúrcuma un miembro de la familia del jengibre. Es de color amarillo-anaranjado (depende del pH).</p>	
<p>E-120 Carmín de cochinilla: Este pigmento se extrae del caparazón de las hembras del insecto <i>Dactylopius coccus Coccus Cacti</i> L. donde se encuentra en una concentración del 10% en las partes grasas. Su color es rojo o violáceo y ello también depende del pH.</p>	
<p>E-160 Carotenoides: Los carotenoides son un grupo de más de 450 pigmentos diferentes, liposolubles, de colores que van desde el amarillo al rojo.</p>	
<p>E-163 Antocianinas: Se encuentra en la piel de algunas frutas como manzanas, pera, ciruela o en la parte carnosa como fresas, cerezas, etc. La mayor fuente de obtención industrial es la piel de la uva negra y de otras frutas utilizadas en las industrias de zumos.</p>	
<p>E-162 Rojo de remolacha (Betalaína): Pigmento coloreado que se encuentra en la remolacha roja <i>Beta vulgaris</i> y en los frutos de diversas especies del género <i>Opuntia</i>. Se obtiene exprimiendo y pasteurizando el extracto líquido de la hortaliza y del fruto, respectivamente. Es una sustancia que consiste en el extracto acuoso de la raíz de la remolacha roja <i>Beta vulgaris</i>. Se extrae, generalmente, tras la cocción en agua y presenta un color rosado. Es de destacar que el E-162 está autorizado por el Código Alimentario Argentino.</p>	

Existen distintas clases de colorantes orgánicos vegetales, los cuales son permitidos en productos alimenticios, por ejemplo, clorofilas, carotenoides, flavonoides y betalainas y algunos llamados misceláneos. Del año 2005 al 2009, el mercado mundial de colorantes naturales aumentó casi 35% en valor. Los colorantes para alimentos son el 67% del mercado global de colorantes, siendo 28% los que corresponden a bebidas sin alcohol y 5% para las bebidas alcohólicas (Industria Alimentaria, 2012).

En la **Tabla 1.3** se observan los colorantes naturales alimentarios aprobados en Estados Unidos, en la actualidad (Food and Drug Administration, 2018).

1.3.2. **Colorantes sintéticos**

Los colorantes sintéticos son los obtenidos por síntesis química y deben reunir una serie de características para asegurar su buen uso: ser inocuos, constituir una especie química definida y pura, tener gran poder tintóreo con el objeto de utilizar la mínima cantidad posible y ser fácilmente incorporables al producto, ser lo más estables posible a la luz y al calor, poseer compatibilidad con los productos que deben teñir, ser inodoros y sin sabor, tener pH neutro y ser lo más económicos posible.

1.4. **Características de color**

El primer juicio por parte del consumidor de la calidad de una comida, muy a menudo, depende del color, la estructura de la superficie y la forma. El color es así un importante atributo sensorial. Se puede definir como una percepción visual que se genera en el cerebro al interpretar las señales nerviosas que le envían los fotorreceptores de la retina del ojo y que, a su vez, interpretan y distinguen las distintas longitudes de onda que captan de la parte visible del espectro electromagnético (MacDougall, 2001).

El ojo humano percibe la luz visible (380 nm a 780 nm) y aprecia tres características: el tono o tipo de color, que corresponde a la dominancia de unas radiaciones, a determinadas longitudes de onda, sobre otras (rojo, amarillo, azul);

la saturación o pureza, que describe el grado en que el color se separa del gris neutro y se acerca a un color puro del espectro (más rojo o menos rojo según la cantidad de gris presente en el color); la luminosidad o claridad, que es la cantidad de luz reflejada o transmitida por un objeto dentro de un mismo tono y saturación.

La medida del color está normalizada, a nivel internacional, desde la reunión de la Comisión Internationale de l'Éclairage (CIE) celebrada en París en 1931. El sistema de evaluación se basa en la posibilidad de reconstruir cualquier estímulo coloreado mediante una mezcla de cantidades adecuadas de tres estímulos fundamentales de color. La CIE estableció colores fundamentales el rojo, el verde y el azul y, así, se indica cualquier color por tres variables X, Y y Z (valores triestímulo) que representan los tres colores fundamentales. Por lo tanto, cualquier diferencia de color se manifestará como un ΔX , ΔY , ΔZ , diferentes de cero.

Para representar gráficamente los valores cromáticos, las coordenadas X, Y y Z de la CIE se pueden transformar en coordenadas cromáticas:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad z = \frac{Z}{X+Y+Z}$$

Dado que $x + y + z = 1$, es posible determinar el color mediante dos coordenadas de cromaticidad, x e y (**Figura 1.3**):

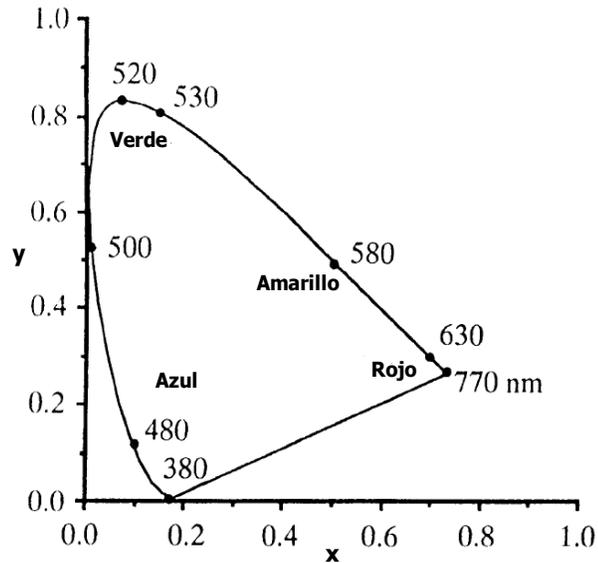


Figura 1.3. Diagramas de color: diagrama de cromaticidad de CIE (1931).
Adaptado de MacDougall (2001).

Para comparaciones estándar la CIE ha establecido fuentes de luz estándar: el iluminante A tiene una distribución energética similar a la luz emitida por una lámpara incandescente de tungsteno; el iluminante B corresponde a la luz solar con componente de cielo a medio día, el iluminante C tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar (difusa, cielo cubierto), el iluminante D corresponde a la irradiación solar directa. La elección del iluminante dependerá de las condiciones en las que normalmente se observa el objeto a estudiar. Otra de las variables a fijar es el ángulo de observador o campo visual: cuando se miran objetos, se utilizan ángulos de $10 - 20^\circ$, pero cuando se miran detalles el ángulo usado es de 2° y, en general, en colorimetría de alimentos se emplea éste último.

El cálculo necesario para obtener los valores triestímulo CIE para un objeto se esquematiza de la siguiente manera: el espectro de la muestra (R vs λ) se multiplica por el espectro de la luz incidente (E vs λ). La función resultante se combina con las funciones de distribución de cada uno de los tres primarios

imaginarios (x, y, z) y el área bajo la curva resultante se integra en el espacio visible para obtener los valores numéricos de la contribución de cada uno de los tres primarios ideales (X, Y, Z) al color dado. En los espectrofotómetros actuales este cálculo es hecho automáticamente por un sistema de computación acoplado al instrumento. De esta manera, el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de coordenadas X, Y, Z.

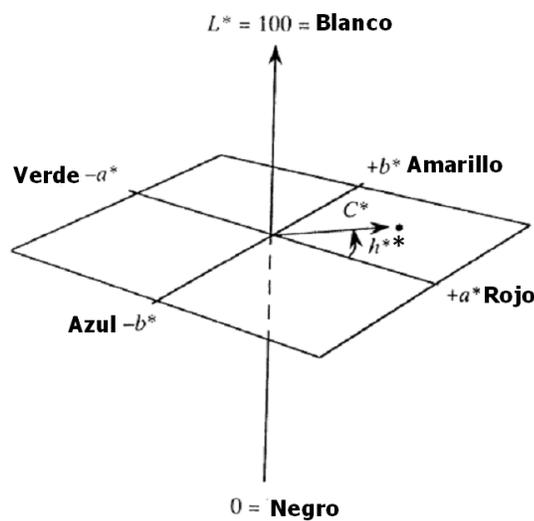


Figura 1.4. Diagrama uniforme CIE Lab que muestra la relación de color rojo/verde (a^* +/-) y amarillo/azul (b^* +/-). También se muestra la coordenada correspondiente a la luminancia L^* . Adaptado de MacDougall (2001).

Se han propuesto muchas modificaciones del sistema CIE, una de las más conocidas es el sistema Hunter (L, a, b) y, los más recientes y oficialmente reconocidos como internacionales, CIE Lab y CIE LUV. Por diferentes causas, ha sido el CIE Lab (CIE L^* , a^* , b^*) el que se ha impuesto y se expresa mediante los parámetros luminancia L^* (claro u oscuro), a^* (del color rojo $-a^*$ positivo- al verde- a^* negativo) y b^* (del color amarillo $-b^*$ positivo- al azul $-b^*$ negativo) (**Figura 1.4**).

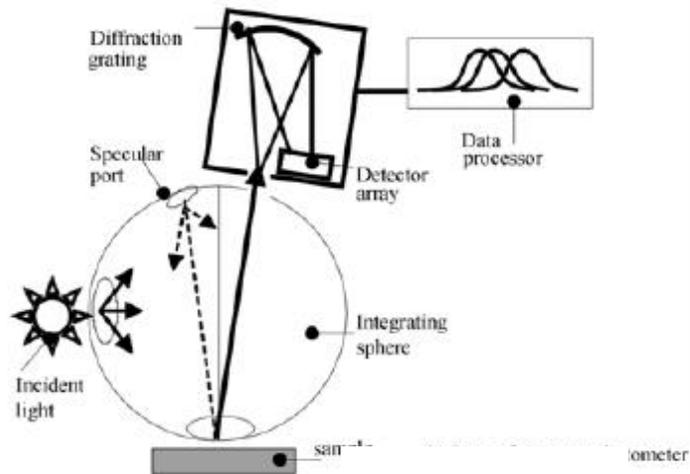


Figura 1.5. Instrumento de medición del color por reflectancia mostrando, además, las partes constitutivas del espectrofotómetro. Adaptado de Brimelow y Joshi (2001).

Para evaluar color se utiliza un espectrofotómetro (**Figura 1.5**) que mide la relación entre la luz reflejada (o transmitida, de acuerdo a dónde se ponga la muestra) y la de un estándar conocido. Las mediciones se toman a través de una esfera integradora y una red de difracción, en muchos puntos, a través del rango visible del espectro electromagnético. Diferentes instrumentos miden con diferentes intervalos de longitud de onda, dependiendo de la naturaleza del analizador espectral y de los componentes electrónicos de control. La reflectancia, entonces, se expresa como un porcentaje o una fracción. Así, un difusor reflectivo perfecto va a tener una reflectancia del 100%. Una muestra negra, en cambio, la cual absorbe toda la luz incidente, va a tener una reflectancia del 0%. En el medio de ambos extremos se encuentran todos los otros colores visibles. Por ejemplo, si la muestra absorbe todo menos la luz roja, va a mostrar valores de reflectancia en la zona roja del espectro de reflectancia. El espectrofotómetro “captura” toda la luz reflejada por la superficie a través del rango visible de longitud de onda y, entonces, puede analizar gráficamente e informar cuál será el color percibido.

A su vez, los valores de a^* y b^* pueden ser utilizados para evaluar el Croma (C^*), índice de pureza o saturación del color, y el ángulo de hue (h^{0*}) o tono, mediante las siguientes expresiones:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$h^{0*} = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

El ángulo de tono h^{0*} se ubica en la circunferencia de 360°; puede encontrarse en uno de los cuatro cuadrantes del plano a^*b^* ; el valor 0° está definido por el tono rojo- púrpura, 90° por el tono amarillo, 180° por el tono verde y finalmente 270° por el tono azul (**Figura 1.6**).

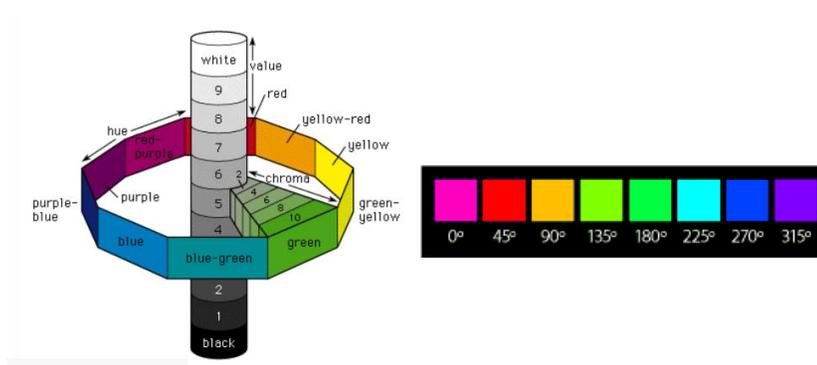


Figura 1.6. Tono (h^{0*}) y saturación (C^*) para el sistema CIE Lab

C^* representa la pureza de tono (saturación) y se puede distribuir en los cuatro cuadrantes del plano a^*b^* ; sus valores van desde 0 en el centro (gris neutro) hasta 100 en los bordes (más saturado) (**Figuras 1.6**).

La diferencia de color total (ΔE), puede ser evaluada para las muestras en estudio utilizando la siguiente ecuación (MacDougall, 2001):

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

Siendo:

$$\Delta L^* = L^* - L_0^*$$

$$\Delta a^* = a^* - a_0^*$$

$$\Delta b^* = b^* - b_0^*$$

Donde L_0^* , a_0^* y b_0^* son los valores de estos parámetros en un sistema control y L^* , a^* y b^* corresponden a los valores de los parámetros en las muestras en estudio.

El ΔE^* permite medir los cambios de color. El observador sin entrenamiento percibe que existe una diferencia de color entre dos muestras cuando ΔE^* toma valores entre 2,0 y 3,5 y ve de manera franca, dos colores distintos, cuando este parámetro toma valores mayores a 5,0 (Mokrzycki & Tatol, 2011).

1.5. Betalaínas

Las betalaínas son un grupo de compuestos presentes en un número limitado de plantas. Son pigmentos naturales hidrosolubles que podrían ser utilizados potencialmente como colorantes rojos y amarillos y que poseen además actividad antioxidante (Tesoriere et al., 2003; Cai, Sun & Corke 2005; Allegra et

al., 2005). Estos pigmentos son particularmente escasos en la naturaleza. Aunque es la remolacha roja (*Beta vulgaris L. spp. vulgaris*) la fuente alimenticia de betalaínas más estudiada y utilizada hoy en día, estos pigmentos también están presentes en frutas y hortalizas tales como acelgas de color (*Beta vulgaris L. var. cicla*), higos chumbos y frutas tropicales y en algunas cactáceas del género *Opuntia* y *Hylocereus*, como la Tuna púrpura, las Pitayas y Pitahayas. También se encuentran en semillas y hojas de amaranto y en flores como el clavel (Cai & Corke, 1998; Stintzing, Schieber & Carle, 2002; Kugler, Stintzing & Carle, 2004; Vaillant, Pérez, Dávila, Dornier & Reynes, 2005).

Las betalaínas son responsables de un gran abanico de coloraciones que abarcan desde los amarillos hasta los rojos intensos, lo que les proporciona un amplísimo potencial para ser utilizadas como colorantes naturales y sustituir así el uso de colorantes sintéticos. Además, la adición de betalaínas puede aportar propiedades biofuncionales al alimento, produciendo un efecto beneficioso para la salud. El hecho de que su color sea estable en un amplio rango de acidez hace que sea factible su adición a una extensa gama de alimentos. El estudio de nuevas fuentes naturales ricas en betalaínas y de su comportamiento a nivel industrial es un tema actualmente en pleno desarrollo y relacionado a su aplicación en el ámbito de la industria alimentaria y farmacéutica, entre otras (Cejudo-Bastante, Hurtado, Mosquera & Heredia, 2014).

Las betalaínas son uno de los pigmentos naturales autorizados como aditivos por la FDA de Estados Unidos y también está admitido en la Unión Europea con la designación de E-162. En el 2004 la comisión del Codex

Alimentarius autorizó el uso de betalaínas como colorante, bajo el nombre de “Rojo remolacha”. El Código Alimentario Argentino (CAA, 2018) en el capítulo XVIII define como colorantes a las sustancias que confieren, intensifican o restauran el color de un alimento y autoriza el uso del “Rojo de remolacha, betaína” (E162). Es un colorante relativamente potente, alcanzándose el color deseado con dosis que no superan los 50 mg/kg (Delgado-Vargas, Jiménez & Paredes-López, 2000), calculado como betanina. Se comercializa de dos maneras, como polvo de remolacha, que incluye el pigmento y estabilizantes como azúcares, proteínas y antioxidantes y como extracto líquido concentrado (JECFA, 2001). Se usa como colorante para productos alimenticios, tales como caramelos duros, yogures, helados, aderezos para ensaladas, mezclas para pasteles, sustitutos para carne, mezclas de salsas, refrescos y gelatina (Delgado-Vargas et al., 2000).

Las betalaínas existen como sales en las vacuolas de las células vegetales (Strack, Vogt, & Schliemann, 2003). Químicamente son derivados del ácido betalámico (**Figura 1.7**) (Strack, Vogt, & Schliemann, 2003). Pueden subdividirse en betacianinas rojo- violeta o betaxantinas amarillo- naranja. Herbach, Stintzing & Carle (2006a) informaron 32 estructuras de betaxantinas y 42 de betacianinas. Las betacianinas absorben a una $\lambda_{\text{máx}}$ de ≈ 530 nm y las betaxantinas poseen una $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción de ≈ 470 nm. En 1981, Piatelli aisló cristales amarillos, correspondientes a indicaxantina de los frutos de *Opuntia ficus-indica* y en 1984, Wyler y Dreiding aislaron cristales rojo-violeta, correspondientes a betanina de la

raíz de *Beta vulgaris*. Desde entonces, notables avances se produjeron en el conocimiento de la química de estos compuestos.

Ambos grupos de moléculas son ópticamente activas ya que poseen dos centros quirales en C-2 y C-15. La hidrólisis de la betacianina produce betanidina, o el epímero en C-15 isobetanidina o una mezcla de las dos agliconas.

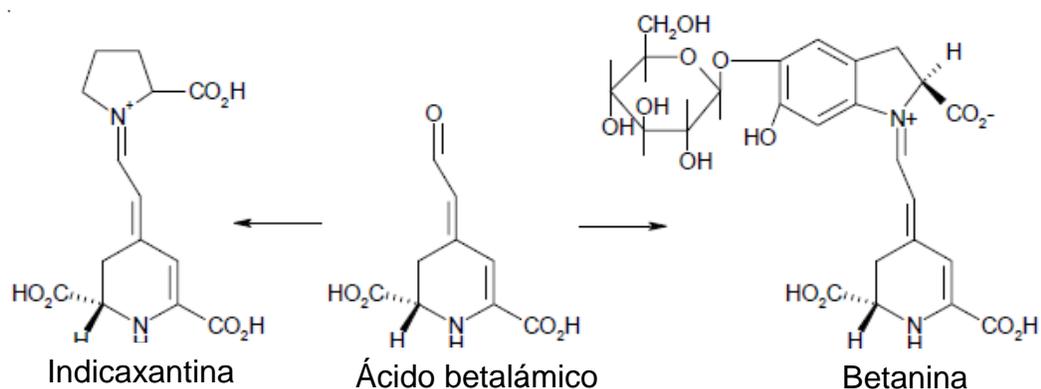


Figura 1.7. Ácido betalámico (Zrýd & Christinet., 2009; Herbach et al., 2006a).

El ácido betalámico (**Figura 1.7**) [4-(2-oxoetiliden)-1, 2, 3,4-tetrahidropiridine-2,6-ácido dicarboxílico] es la estructura básica y principal cromóforo de todas las betalaínas. Su condensación con *ciclo*-Dopa [*ciclo*-L- (4-dihidrophénilalanina)] o sus derivados glucosilados, llevan a la formación de betacianinas (del griego. *Kyaneos*= azul) violetas mientras que su condensación con aminoácidos o sus formas derivadas da lugar a las betaxantinas (del griego. *Xantos* = amarillo) amarillas. Las betaxantinas presentan una absorción máxima cerca de 470 nm (Belhadj, Najjar & Abderrabba, 2017). Las betacianinas, al unirse al *ciclo*-Dopa presentan una prolongación de la conjugación y, por ello, el

cromóforo presenta un máximo de absorción a una mayor longitud de onda (cerca de 530 nm) de acuerdo con Jackman & Smith (1996) (**Figura 1.7**).

1.5.1. Estructura de las betacianinas.

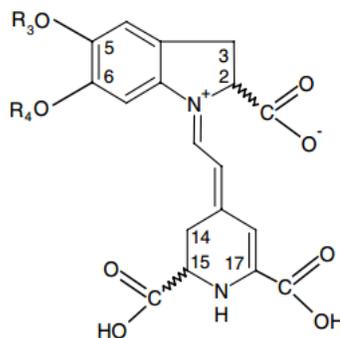


Figura 1.7. Estructura básica de las betacianinas (Herbach et al, 2006a).

Todas las betacianinas son glicosiladas; la betanina cuya fórmula química es $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$ y peso molecular 550.48 (Jackman & Smith, 1996), constituyen aproximadamente un 75 a 95% del total del contenido de betacianinas como se mencionó previamente. El porcentaje restante está conformado por betanidina, prebetanina y sus isómeros del C-15. La betanidina es la aglicona de la betanina (Davies, 2009). En la **Tabla 1.4** se enumeran los sustituyentes y fuente botánica de algunas betacianinas.

En la **Figura 1.8** se muestran las estructuras químicas de las betacianinas presentes en la remolacha de acuerdo a bibliografía (Vincent & Scholz, 1978; Alard, Wray, Grotjahn, Reznik & Strack, 1985; Kujala, Loponen & Pihlaja, 2001; Swarna, Lokeswari, Smita & Ravindhran, 2013; Wybraniec et al., 2013).

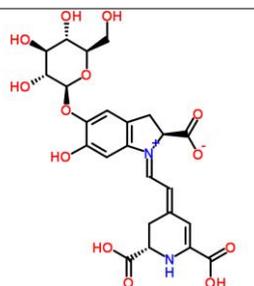
Tabla 1.4. Sustituyentes y fuentes botánicas de algunas betacianinas conocidas.

Compuesto	R3	R4	Fuentes botánicas
Betanina	β -glucosa	H	<i>Beta vulgaris</i>
Amarantina	2'-O-(β -ácido glucurónico)- β -glucosa	H	<i>Amaranthus tricolor</i>
Prebetanina	6'-O-(SO ₃ H)- β -glucosa	H	<i>Beta vulgaris</i>
Phyllocactina	6'-O-(malonil)- β -glucosa	H	<i>Phyllocactus hybridus</i>
Celosianina -I	2'-O-[O- (p-coumaroil) - β -ácido glucurónico]- β -glucosa	H	<i>Celosía cristata</i> L.
Celosianina -II	2'-O-[O- (trans-feruloil) - β -ácido glucurónico]- β -glucosa		
Iresinina-I	2'-O-(β -ácido glucurónico)-6'-O-(3 hidroxil-3-metil-glutaril)- β -glucosa	H	<i>Iresine herbstii</i>
Lampratina-I	6'-O-(p-coumaroil)- β -glucosa	H	<i>Lampranthus spp</i>
Lampratina-II	6'-O-(feruloil)- β -glucosa	H	<i>Lampranthus spp</i>

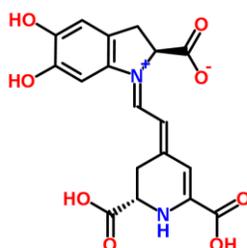
Adaptado de Hendry & Houghton, (1996) y Nemzer et al. (2011).

Vincent & Scholz (1978) identificaron en la remolacha roja la presencia de las betalaínas como la betanina y betanidina. Alard et al. (1985) aislaron e identificaron en la remolacha roja el pigmento soluble en agua y de color naranja, neobetanina y elucidaron su estructura utilizando diversos métodos analíticos. Kujala et al. (2001) encontraron en la piel de la raíz de remolacha roja las betalaínas como la betanina, isobetanina y neobetanina. Wybraniec et al. (2013) estudiaron un mecanismo de oxidación no enzimático de la betanina y 2-decarboxil betanina, encontrando que los principales compuestos formados en la primera etapa de su oxidación eran 2-decarboxil-2,3-dehidrobetanina y 2-decarboxil neobetanina; *a posteriori* se formaban quinonas. A su vez, la oxidación de 17-decarboxil betanina y 2,17-Bi-decarboxil betanina era 2,17-Bi-decarboxil-2,3-dehidro-betanina. La oxidación de la neobetanina resultaba en la formación de 2,17-Bi-decarboxil-2,3-dehidro-neobetanina.

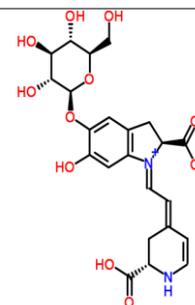
BETACIANINAS



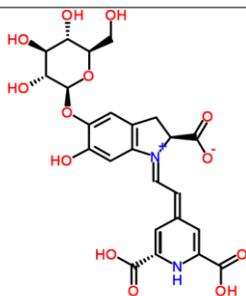
Betanina/Isobetanina
 $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$, PM: 550



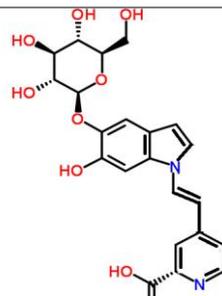
Betanidina/Isobetanidina
 $C_{18}H_{16}N_2O_8$, PM: 388



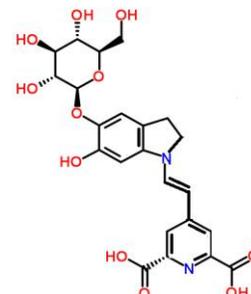
17-Decarboxil betanina
 $C_{23}H_{26}N_2O_{11}$, PM: 506



Neobetanina
 $C_{24}H_{24}N_2O_{13}$, PM: 548



2,17-Bi-decarboxil-2,3-dehidro-
neobetanina
 $C_{22}H_{22}N_2O_9$, PM: 458



2-Decarboxil-neobetanina
 $C_{23}H_{24}N_2O_{11}$, PM: 504

Figura 1.8. Estructura química de las betacianinas (Jackman y Smith, 1992; Swarna et al., 2013 y The Pubchem Project, 2018). PM: Peso molecular.

1.5.2. Estructura de las betaxantinas

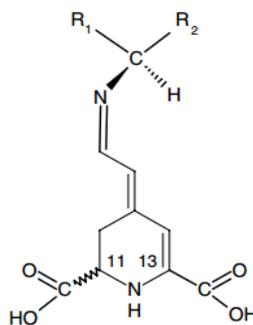


Figura 1.9. Estructura de las betaxantinas (Herbach et al., 2006a).

Las betaxantinas, de color amarillo-naranja, se forman por condensación de ácido betalámico con aminas o aminoácidos (**Figura 1.9**). Por ejemplo el grupo R₂ de la vulgaxantina II de la remolacha (*Beta vulgaris*) es un ácido glutámico; en la indicaxantina de la *Opuntia ficus-indica* el grupo R₂ se junta con el residuo derivado grupo R₁ dando lugar a una prolina. Los grupos R₁ de las betaxantinas generalmente son un hidrógeno (Jackman & Smith, 1992).

Tabla 1.5. Composición química de algunas betaxantinas conocidas y sus fuentes botánicas.

Compuesto	Aminoácido	Fuente botánica
Indicaxantina	Prolina	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Portulaca xantina-I	Hidroxiprolina	<i>Portulacca grandiflora</i>
Portulaca xantina-II	Tirosina	
Vulgaxantina-I	Glutamina	<i>Beta vulgaris</i>
Vulgaxantina-II	Ácido glutámico	<i>Beta vulgaris</i>
Miraxantina-I	Sulfóxido de metionina	<i>Mirabilis Jalapa</i>
Miraxantina-II	Ácido aspártico	<i>Mirabilis Jalapa</i>
Dopaxantina	DOPA	<i>Rivina humilis</i>
Miraxantina-III	Tiramina	<i>Mirabilis Jalapa</i>
Miraxantina-V	Dopamina	<i>Mirabilis Jalapa</i>

Adaptado de Hendry & Houghton (1996), Zrýd & Christinet (2009) y Nemzer et al. (2011).

En la remolacha se encuentran la vulgaxantina I y vulgaxantina II, sustituidas por glutamina y ácido glutámico, respectivamente (**Tabla 1.5**).

En la **Figura 1.10** se muestra la estructura química de algunas betaxantinas.

BETAXANTINAS

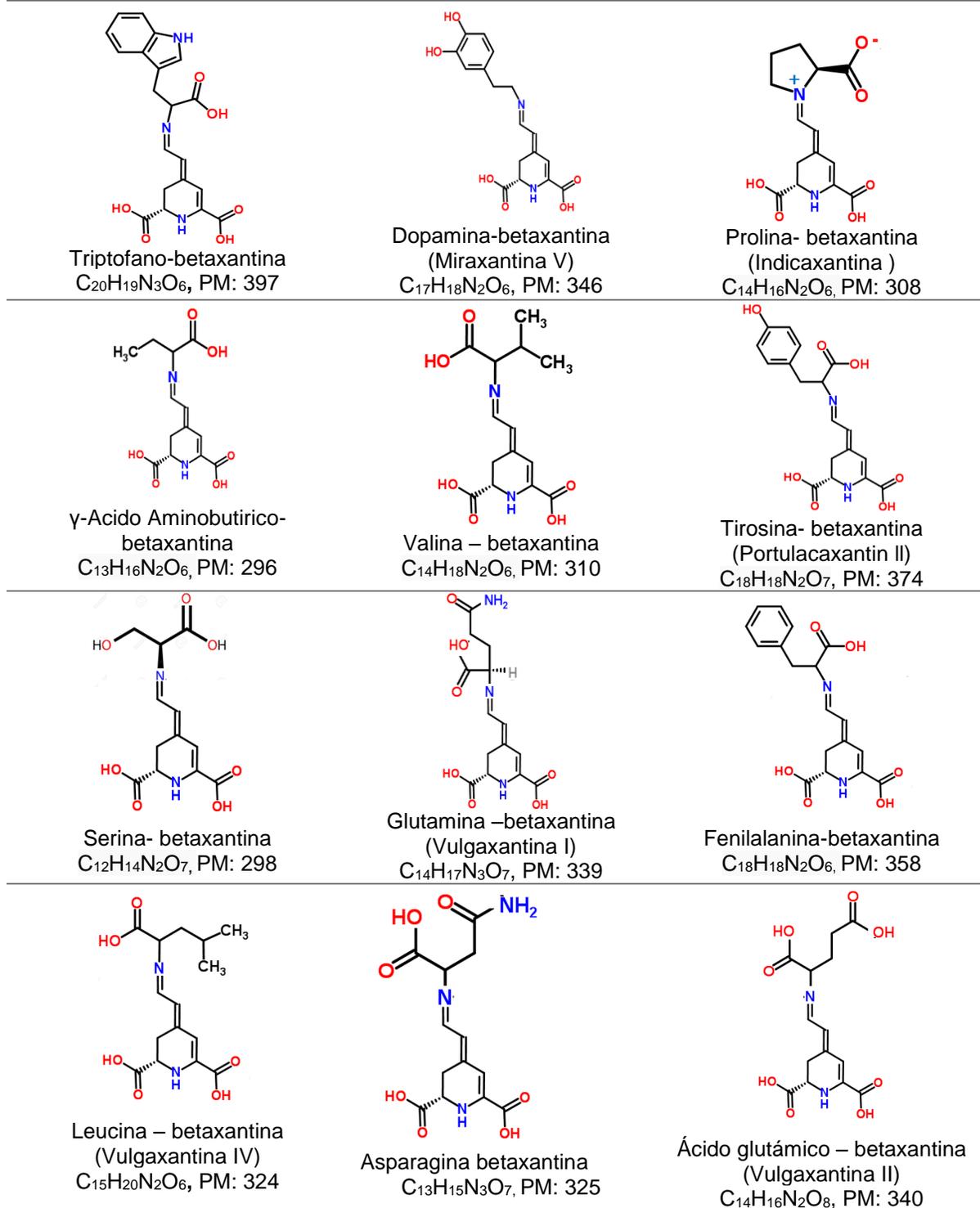


Figura 1.10. Estructuras químicas de algunas betaxantinas (Jackman y Smith, 1992; Swarna et al., 2013; The Pubchem Project, 2018). PM: Peso molecular

1.5.3. Estabilidad de las betalaínas

1.5.3.1. Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas

La estabilidad de las betalaínas ha sido estudiada en pigmentos obtenidos de la remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Von Elbe, Maing & Amundson 1974; Sapers & Hornstein., 1979; Delgado Vargas et al., 2000; Herbach et al., 2006a; Azeredo, 2008). Estos investigadores han establecido que los principales factores que influyen en la estabilidad de las betalaínas son: temperatura, pH, actividad de agua, luz, presencia o ausencia de oxígeno y de metales, acción enzimática, siendo la temperatura el factor más influyente en la degradación de las betalaínas. En la **Figura 1.11** se resumen estos factores los cuales condicionan la utilidad de estos pigmentos como colorantes y/o antioxidantes en alimentos.

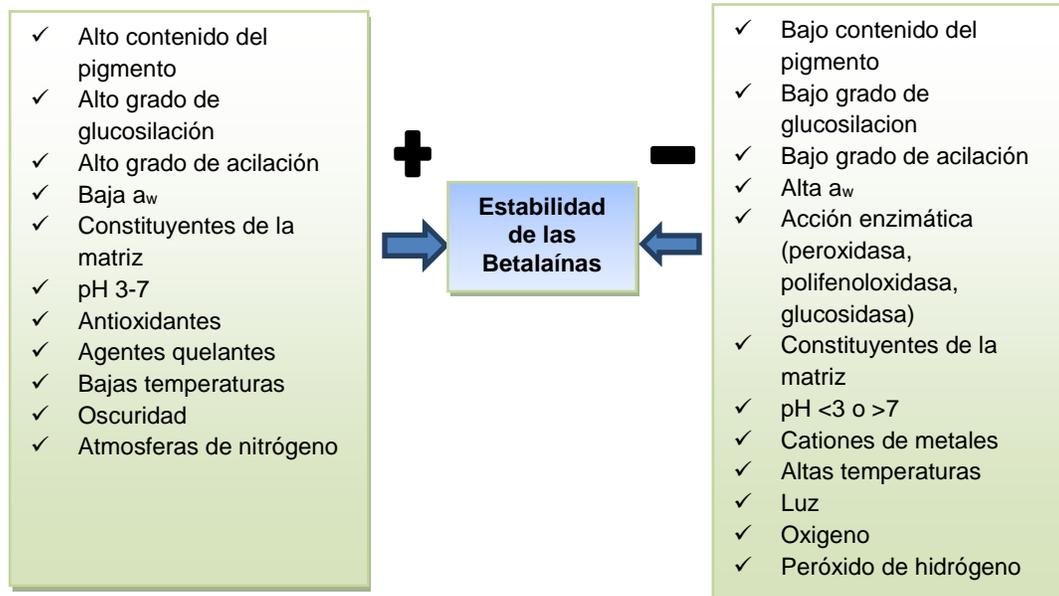


Figura 1.11. Factores que afectan la estabilidad de las betalaínas (Herbach et al., 2006a; Zrýd y Christinet, 2004).

1.5.3.2. Temperatura

La temperatura puede considerarse el factor más importante que influye en la estabilidad de las betalaínas durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos. Las betalaínas pierden su estabilidad a temperaturas elevadas (Von Elbe et al., 1974) y su velocidad de degradación se acelera a medida que la temperatura crece y con el tiempo de calentamiento (Saguy, Kopelman & Mizrahi, 1978). Así, la estabilidad de las betalaínas baja a temperaturas entre 50°C a 80°C. Para la conservación de alimentos, por lo general, se requiere un tratamiento térmico de las materias primas para garantizar la seguridad alimentaria y se han realizado numerosos estudios para obtener información sobre la degradación de las betalaínas, por ejemplo tras el tratamiento térmico de los jugos de la remolacha y de la fruta de los cactus rojos (Saguy, 1979; Czapski, 1985; Czapski, 1990; Herbach et al., 2004).

Herbach et al. (2004) observaron que la degradación térmica de las betacianinas en jugos de remolacha roja y de Pitaya sigue una cinética de reacción de primer orden. Por otra parte, concluyeron que la estabilidad térmica de las betalaínas depende de la temperatura y periodo de calentamiento. Asimismo von Elbe et al. (1974) y Wybraniec et al. (2013) concluyeron que, al tratar térmicamente soluciones de betalaínas, se produce una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento con la aparición de pardeamiento.

1.5.3.3. pH

Las betalaínas son estables en el rango de pH entre 3-7, en el que se encuentran la mayoría de los alimentos (Delgado Vargas et al., 2000; Castellar et al., 2003; Stintzing et al., 2005). Fuera de este rango, el color decrece con el tiempo. El pH óptimo para la estabilidad de las betalaínas de la remolacha (*Beta vulgaris* L.), en presencia de oxígeno se encuentra a pH 5,5-5,8, mientras que en condiciones anaeróbicas, a pH 4,0-5,0 (Huang & von Elbe, 1985). Las betaxantinas presentan una estabilidad ligeramente mayor a valores de pH entre 4,0 a 7,0 (Cai & Corke, 2001), mientras que las betacianinas poseen una mayor estabilidad a un pH de 5,5 (Savolainen & Kuusi 1978). Huang & von Elbe (1985) y Castellar, Obón, Albacid & Fernández-López (2003) observaron la dependencia de la estabilidad de las betalaínas con el pH.

Para la betanina se ha determinado (Sing de Ugaz, 1997) que a:

pH 3,0 a 7,0	El color rojo de la solución permanece inalterado con un $\lambda_{\text{máx}}$ de absorción entre 537- 538 nm.
pH < 3,0	El color cambia a violeta y el $\lambda_{\text{máx}}$ es desplazado a 534- 536 nm, ocurriendo un decrecimiento en la intensidad.
pH > 7,0	El color de la solución se torna más azulado realizando un desplazamiento batocrómico en la $\lambda_{\text{máx}}$, siendo mayor el efecto a pH 9,0 donde el $\lambda_{\text{máx}}$ ocurre a 543-544 nm.
pH > 10,0	Hay un crecimiento en intensidad en el $\lambda_{\text{máx}}$ de 540 – 550 nm y se presenta un incremento en la absorción a 400-460 nm debido a la liberación del ácido betalámico, el cual es amarillo, por lo que hay un cambio de color de azul a amarillo como resultado de la hidrólisis alcalina de betanina a ácido betalámico y <i>ciclo</i> -Dopa-5-O-glucósido.

1.5.3.4. Actividad de agua (a_w)

Las betalaínas presentan mayor estabilidad en alimentos o sistemas modelo con un bajo contenido de humedad y a_w , debido a que el agua está menos disponible para que ocurran reacciones químicas. Valores de a_w por debajo de 0,63 mejoran la estabilidad de la betalaínas de la remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Delgado Vargas et al., 2000). Además, métodos para reducir la a_w , como la concentración y el secado por atomización han demostrado proporcionar estabilidad a las betalaínas, en pigmentos provenientes de tuna púrpura (*Opuntia stricta*) (Castellar, Obón & Fernández-López, 2006) y de amaranto (Cai & Corke, 2000).

1.5.3.5. Luz

Existe una relación inversa entre la estabilidad de las betalaínas de la remolacha (*Beta vulgaris* L.), y la exposición a la luz. La degradación de betalaínas sigue una cinética de primer orden que es oxígeno dependiente (Attoe & Von Elbe, 1981). Otros autores, observaron que la adición de 0,1% de ácido isoascórbico y 1% de ácido ascórbico a jugo de remolacha y pitaya inhibió la degradación inducida por la luz durante el almacenamiento de betacianina (Bilyk et al., 1981; Herbach et al., 2006a).

1.5.3.6. Oxígeno

Distintos autores (Attoe & von Elbe, 1985; Wybraniec et al., 2013), han observado que las betalaínas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) reaccionan con el oxígeno molecular, causando el oscurecimiento del producto y la pérdida del

pigmento. La estabilidad de la betanina disminuye linealmente con el aumento en la concentración de oxígeno (Czapski, 1990) siguiendo una cinética de primer orden en presencia de oxígeno, pero en ausencia de oxígeno su comportamiento se desvía de este modelo. Se ha recomendado que para aumentar la estabilidad del pigmento es necesario colocar las muestras en atmósferas con bajas concentraciones de oxígeno, incorporando antioxidantes o utilizando atmósferas con nitrógeno (Attoe & von Elbe, 1982 y 1985; Han, Kim & Kim, 1998; Drunkler, Fett & Bordignon-Luiz, 2006).

1.5.3.7. Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula que previene la formación descontrolada de radicales libres que son sustancias químicas inestables muy reactivas con el oxígeno (Chihuailaf, Contreras & Wittwer, 2002).

Debido a la alta sensibilidad al oxígeno de las betalaínas, se realizaron estudios con diversos antioxidantes con el fin de mejorar su estabilidad. (Pasch & VonElbe, 1979) y se evaluaron dos antioxidantes, el ácido ascórbico y el α -tocoferol. Bilyk (1981) propuso evaluar el efecto del ácido isoascórbico, bajo condiciones de pH, temperatura y luz controladas y observó que el ácido isoascórbico al 0.1% p/p, es más efectivo en estabilizar a la betanina que su isómero, en todas las condiciones propuestas.

1.5.3.8. Cationes Metálicos

Se han realizados distintas investigaciones con iones Fe^{+++} y Cu^{++} , a concentraciones de 100 ppm, debido a que estos iones son los constituyentes más

comunes en los alimentos o que aparecen en los alimentos por estar presentes en los equipos de procesamiento. Estos metales pueden catalizar la oxidación de lípidos. Se demostró que el rol catalítico de los iones metálicos dependía de su estado de oxidación, pudiendo actuar como donores o aceptores de electrones, desestabilizando al centro electrofílico. Como resultado se obtuvo, un nuevo arreglo de enlaces asociados con destrucción del cromóforo y pérdida del color (Pasch & Von Elbe, 1979).

1.5.4. Vías de degradación de las betalaínas

La degradación de betacianinas se ha descrito especialmente para betanina (Herbach et al., 2004 y 2006a).

La **Figura 1.12** muestra las posibles vías de degradación de betanina, asociando los productos de degradación con el color que presentará cada compuesto.

La degradación de la betanina es mediada por la temperatura y el pH, lo que involucra el ataque de un nucleófilo (ej. el agua) en la posición del C-11. Esto causaría la formación de compuestos intermedios producto de la degradación, tales como el *ciclo-Dopa- 5-O-glicósido* y el ácido betalámico (Jackman & Smith, 1992). Esta reacción es reversible.

susceptibles de isomerización y la indicaxantina también es susceptible de epimerización en C11 (Herbach et al., 2006a).

1.5.4.2. Desglicosilación

Bajo condiciones fuertemente ácidas, altas temperaturas y presencia de β -glucosidasa, la molécula de glucosa puede separarse de la betanina, provocando un desplazamiento batocrómico cercano a 4 nm, obteniéndose un color rojo violeta profundo por la formación de una aglicona de menor estabilidad por su mayor susceptibilidad a la oxidación (Herbach et al., 2006a).

1.5.4.3. Hidrólisis

La hidrólisis de la betanina se produce por la ruptura hidrolítica del enlace aldimina, esta ruptura se ha observado en tratamientos térmicos y en condiciones de pH superiores a 6. La hidrólisis de betanina disminuye la intensidad del color, debido a que la ruptura de la betanina genera ácido betalámico (amarillo brillante) y *ciclo*-Dopa-5-O- β -glucósido (incolora) (Herbach et al., 2006a). La ruptura del enlace aldimina es reversible y pH dependiente (reacción favorecida a pH 6) (Huang & von Elbe, 1985 y 1987). Se ha observado recondensación de ácido betalámico y *ciclo*-Dopa a betanina después de cortos tratamientos térmicos a bajas temperaturas (Huang & von Elbe, 1985).

1.5.4.4. Descarboxilación

Teóricamente, la descarboxilación puede ocurrir en los carbonos C2, C15 y C17 de las betacianinas y en los carbonos C11 y C13 de las betaxantinas. La

descarboxilación produce un desplazamiento hipsocrómico, que puede ser explicado por una disminución en la deslocalización de los electrones π (Herbach et al., 2006a). Varios estudios han corroborado que la betanina puede ser descarboxilada en las posiciones C2, C15 y/o C17. No obstante, cuando la descarboxilación ocurre en C2 y C15 se puede considerar una ventaja ya que se mantienen las características cromáticas de su precursor, la betanina, mientras que cuando ocurre en el C17 esas características cambian pues da lugar a un compuesto de coloración rojo-anaranjado (Herbach et al., 2006a).

1.5.4.5. Deshidrogenación

Reacciones de deshidrogenación de betanina generan el compuesto llamado neobetanina que se caracteriza por ser de color amarillo. La formación de neobetanina se ha confirmado en jugo de remolacha sometido a un tratamiento térmico bajo condiciones anaeróbicas (Herbach et al., 2004)

1.5.5. Aplicaciones de las betalaínas

Las betalaínas son ingredientes de origen natural utilizados en la industria como agentes de color. Entre las aplicaciones más comunes se encuentran:

1.5.5.1. Industria de Alimentos

Se emplean betalaínas para mejorar el color y el aspecto de los alimentos. Ellas contribuyen a aumentar su calidad y valor nutritivo. Los procesos industriales de elaboración de alimentos incluyen tratamientos que decoloran o cambian el aspecto de los alimentos, lo cual se soluciona agregando colorantes. Éstos se

adicionan durante la elaboración de un gran número de productos como en postres, helados, derivados lácteos, bebidas refrescantes, conservas vegetales y de pescado, mermeladas y yogures.

1.5.5.2. Industria Farmacéutica

La mayor parte de los colorantes empleados en las cápsulas de gelatina dura son inocuos. Sin embargo, algunos pueden provocar reacciones adversas y por eso su uso es restringido. En cuanto a los suplementos alimenticios, el reglamento europeo 1129/2011 lista todos los colorantes autorizados para cápsulas y comprimidos. Por lo tanto el uso de betalaínas es recomendable, ya que no tiene limitaciones de uso y son los responsables del tono intenso de ciertas cápsulas como las amarillas, naranjas o rojas. Se sabe del uso de las betalaínas en polvo o como solución, en jarabes, enjuagues bucales, ungüentos y otros.

1.5.5.3. Industria de Cosméticos

El sector de cosméticos consumía en los años ochenta un 60% de colorante carmín, pero a partir de entonces se originó un proceso de sustitución de colorantes sintéticos por colorantes naturales. El auge de productos ecológicos y naturales, junto a restricciones a ciertos colorantes sintéticos ha producido una recuperación del uso de colorantes naturales como las betalaínas. En la industria cosmética se utiliza para los productos que se aplican a la zona de boca y ojos, tales como sombras, lápices de labios, lápices para los ojos, polvos faciales etc. Desde el punto de vista de calidad, la industria cosmética sólo acepta betalaínas de alta pureza.

1.5.6. **Capacidad antioxidante de betalaínas**

La actividad antioxidante es un parámetro de gran interés para valorar la capacidad funcional de una sustancia. Un antioxidante puede ser definido como cualquier sustancia que cuando presente en relativamente baja concentración, comparado con el sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de ese sustrato (Apak et al., 2013). El metabolismo normal del oxígeno lleva a la producción de especies oxidantes. Estas reaccionan químicamente con los componentes naturales, modificando o suprimiendo su función biológica. Los organismos se defienden de este daño mediante una compleja red de defensas antioxidantes (Gandía-Herrero, Escribano & García-Carmona, 2016).

El oxígeno es un componente vital para la supervivencia del ser humano. Una vez inhalado, mediante el mecanismo de la respiración sufre un proceso de reducción gradual hasta ser metabolizado convirtiéndose en agua. Durante este proceso, se forma una pequeña cantidad de reactivos intermediarios, como el radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos compuestos son llamados especies reactivas del oxígeno (ROS) y pueden iniciar el proceso de peroxidación de las membranas lipídicas que conlleva a la acumulación de peróxidos. Los productos de la peroxidación por ellos mismos, así como los de la oxidación secundaria como el malonaldehído y el 4-hidroxinonal, que son altamente reactivos, pueden reaccionar con sustratos biológicos como las proteínas, aminas y ácido desoxirribonucleico (DNA). Dichos procesos ocasionan una serie de enfermedades degenerativas celulares y contribuyen

significativamente al envejecimiento y riesgo de contraer cáncer (Sato et al., 1996).

Existe abundante literatura sobre las actividades biológicas de las betalaínas, particularmente sobre su actividad antioxidante que se ha vinculado con la actividad anticáncer observada (Gengatharan, Dykes & Choo, 2015). La remolacha roja ha sido incluida entre los 10 vegetales con mayor poder antioxidante. (Halvorsen, Holte & Myhrstad, 2002).

La actividad antioxidante de la betanina y de su aglicón la betanidina se manifestó también mediante la inhibición *in vitro* de la peroxidación lipídica y de la descomposición del hemo logrado con concentraciones muy bajas. También se ha demostrado que a pesar de su hidrofiliidad, tanto la betanina como la indicaxantina se pueden asociar al LDL humano *in vitro* e *in vivo* aumentando su resistencia a la oxidación (Pokorny, Yanishlievac & Gordon, 2005).

Tesoriere et al. (2003) mostraron que la indicaxantina y la betanina pueden unirse a la lipoproteína de baja densidad (LDL) en un ensayo *ex vivo* con dichos pigmentos puros. Una vez unidos son altamente efectivos en la prevención de la oxidación de los lípidos inducida por cobre. La interacción con la vitamina E añadió potencial a la indicaxantina para proteger al LDL.

Stintzing et al. (2005) informaron que en *Opuntia spp*, la contribución a la actividad antioxidante era mayor para las betalaínas que la ejercida por el ácido ascórbico.

La actividad anticancerígena de las betalaínas ha sido vinculada a su actividad antioxidante. Se ha demostrado la actividad inhibidora de la betanina presente en remolacha roja, en tumores de piel y pulmón, en ratones (Kapadia, Tokuda, Konoshima, & Nishino, 1996). Esta actividad también fue comprobada sobre tumores de ovario, cervicales y vejiga, *in vitro* e *in vivo* en ratones, utilizando un extracto de fruto de cactus *Opuntia* (Zou, Brewer & Garcia, 2005) a lo cual contribuirían las betalaínas como principios activos más importantes.

1.6. Microencapsulación

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos, sólidos, líquidos o gaseosos (antioxidantes, sabores, bactericidas, etc.) se introducen en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los activos del medioambiente, de su interacción con otros componentes del alimento o bien para controlar su liberación. Para definir el método de encapsulación y el agente encapsulante más apropiado es importante definir cuál será la aplicación de las micropartículas, la composición de los ingredientes, el mecanismo de liberación, tamaño de partícula, forma física final y el costo, entre otros (Desai & Park, 2005).

Algunas de las técnicas usadas para microencapsulación son: secado por atomización, liofilización, extrusión, recubrimiento por lecho fluidizado, atrapamiento por liposomas, coacervación, inclusión, (Wang, Zhao, Guo & Zheng, 2004) entre otros.

La microencapsulación de betalaínas ha sido poco estudiada. Se han realizado estudios mediante secado por atomización para jugo de remolacha con goma arábiga como polisacárido de pared (Pitalua, Jimenez, Vernon-Carter & Beristain , 2010); extracto de remolacha con maltodextrina (Azeredo, Santos, Souza, Mendes & Andrade, 2007; Ravichandran et al., 2014); extractos de amaranto con maltodextrinas y almidón (Cai & Corke, 2000); extracto de indicaxantina con maltodextrina (Gandía-Herrero, Jiménez-Atienzar, Cabanes, García-Carmona & Escribano, 2010); pulpa de tuna púrpura (*Opuntia ficusindica*) y su extracto hidroalcohólico con maltodextrina, inulina (Tapia, 2007; Sáenz, Tapia, Chávez & Robert , 2009) y mezclas de aislado proteico de soja con maltodextrina e inulina (Torres, 2008). Y se ha estudiado la encapsulación por liofilización para jugo de remolacha con pululano y maltodextrina (Serris & Biliaderis, 2001). También fueron encapsuladas betalaínas extraídas de frutos de cactus púrpura en alginato de calcio y en combinación de alginato de calcio y albúmina de suero bovino (Otálora et al., 2016)

1.7. Pared celular

Las células de las plantas terrestres están rodeadas por una capa semirrígida compuesta de polisacáridos, proteínas y compuestos fenólicos: la pared celular. Esta estructura actúa ejerciendo una gran influencia en la morfología y el desarrollo de la planta y contribuyendo a la especialización funcional de los tipos celulares. La formación de la pared celular comienza con la aparición de la placa celular, que se origina por acumulación y fusión de vesículas del aparato de Golgi cargadas de polisacáridos no celulósicos. El desarrollo de la

placa celular origina la laminilla media, estructura amorfa rica en polisacáridos pécticos que mantiene unidas las células adyacentes, mientras que las membranas de las vesículas dan lugar a las membranas plasmáticas de las células hijas. Entre la membrana plasmática y la laminilla media se deposita la pared celular primaria, que presenta estructura fibrilar debido a la acumulación de microfibrillas de celulosa cristalina embebidas en una matriz de polisacáridos complejos y glicoproteínas, cuya composición varía dependiendo de la especie que consideremos, del tipo de tejido e incluso del grado de diferenciación del tipo celular en cuestión (Knox, 2008; Martínez, 2010).

La pared celular primaria y la laminilla media tienen gran importancia en el proceso de extensión o expansión celular, ya que constituyen las únicas estructuras extracitoplasmáticas de las células que conservan la capacidad de dividirse y/o elongarse. Por el contrario, las células que han perdido esta capacidad suelen depositar en la cara interna de la pared nuevas capas de material, cuya composición depende del tipo concreto de elemento celular. En esas capas suelen aparecer nuevos componentes, como lignina, cutina, suberina, sales minerales, modificándose la proporción de los polímeros de pared celular primaria y laminilla media. Estas modificaciones originan una estructura multicapa de mayor espesor y ordenación más orientada de las microfibrillas de celulosa, denominada pared celular secundaria.

Las dicotiledóneas como la remolacha, se caracterizan por poseer una pared celular que contiene proporciones semejantes de celulosa y xiloglucano,

polisacárido que se une a las microfibrillas de celulosa, fijando su posición y determinando la distancia entre ellas.

Las paredes celulares primarias de las plantas tienen las siguientes funciones:

- Sostener la membrana celular y evitar que se rompa bajo la presión de turgor osmóticamente contenida dentro de la célula (Cosgrove, 2005).
- Expandir, bajo presión de turgor, a una velocidad y dirección controlada y precisa que, en última instancia, definirá la contribución de la célula para el crecimiento y la formación de la planta (Cosgrove, 2005; Boyer, 2009);
- Cooperar con las células adyacentes que tienen similar presión de turgor para construir un tejido tridimensional mecánicamente competente (Niklas, 2004).

Las paredes celulares secundarias son generalmente más gruesas y tienen una mayor masa de polímero por unidad de volumen, es decir, menor contenido de agua, que las paredes celulares primarias. Se han encontrado en muchas semillas y su rol de tipo mecánico es secundario a funciones de almacenamiento de energía. La abundancia de un determinado polisacárido de pared celular las identifica, variando de una especie a otra.

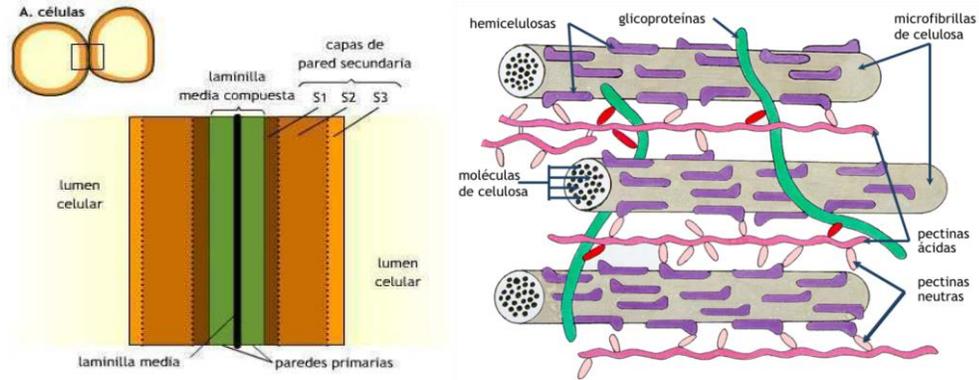


Figura 1.13. Estructura de la pared celular vegetal. Adaptada de Moore, Clark & Vodopich (1996).

Los componentes de la pared celular se pueden clasificar en tres grupos:

Polisacáridos estructurales	Glicoproteínas	Otros componentes
<ul style="list-style-type: none"> • Celulosa • Hemicelulosas • Sustancias pécticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Estructurales • Enzimáticas 	<ul style="list-style-type: none"> • Lignina • Cutina • Suberina • Ceras • Taninos • Sales minerales

Figura 1.14. Clasificación de los componentes de la pared celular.

A continuación se describirán los componentes más abundantes y representativos de la pared celular (Carpita & Mc Cann, 2000).

1.7.1. Celulosa

Son cadenas de unglucano no ramificado con enlaces glucosídicos β -(1,4), que forman microfibrillas mediante agregados por uniones puente hidrógeno cada una de 3 nm de diámetro aproximadamente (Jarvis., 2011). Se encuentra en la

naturaleza casi exclusivamente en las paredes celulares vegetales y representa el 20-30 % del peso seco de la pared celular primaria. La fórmula empírica es $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n=200$ (**Figura 1.15**).

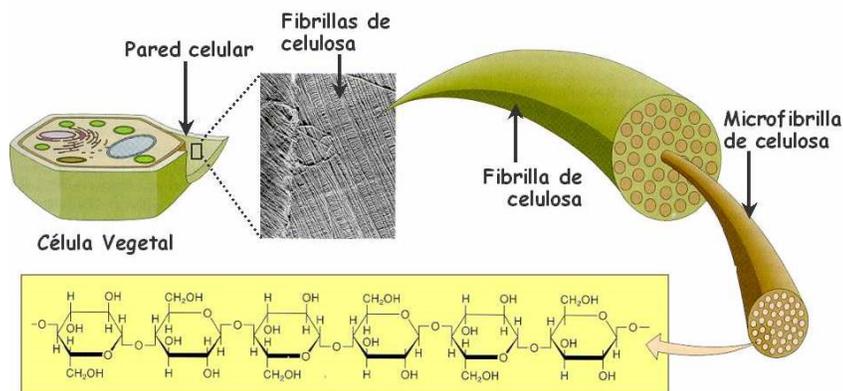


Figura 1.15. Esquema de la composición química de la celulosa. Adaptada de Moore et al. (1996).

1.7.2. Hemicelulosa

Las hemicelulosas son polisacáridos constituidos por monómeros de pentosas y hexosas distribuidas de forma lineal y ramificada, conformando polímeros tipo polisacáridos denominados no-celulósicos. La hemicelulosa tiene un peso molecular menor que la celulosa y contiene como azúcares constitutivos a la xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa. Las hemicelulosas están caracterizadas por cadenas formadas por unión covalente del tipo β -(1,4), con configuración ecuatorial en C1 y C4.

Las hemicelulosas están distribuidas, según el caso, en paredes celulares primarias y secundarias, incluyendo ellas, entre otros, los xiloglucanos, arabinoxilanos, glucuronoxilanos.

1.7.3. Pectina

Son el componente mayoritario de la laminilla media donde actúan como elemento de unión entre las células y también se presentan en la pared primaria. Son polisacáridos ricos en ácido galacturónico y, según Carpita, (1990) se pueden distinguir las siguientes estructuras (**Figura 1.16**): homogalacturonano, ramnogalacturonano I (RGI) y ramnogalacturonano II (RGII).

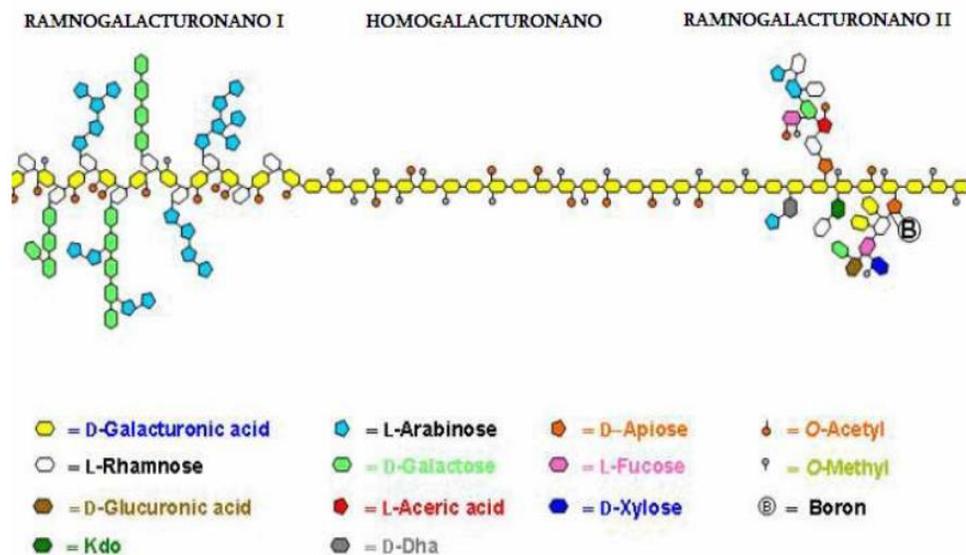


Figura 1.16. Estructuras principales de pectinas.

1.7.4. Lignina

La lignina es la sustancia más abundante encontrada en la matriz de la pared celular secundaria de las plantas leñosas. Es un polímero formado por restos fenilpropanoides derivados de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces éter C-O-C o C-C (**Figura 1.17**). Debido al carácter hidrofóbico que posee, desplaza el agua de las paredes celulares

secundarias, aumentando la resistencia química y la rigidez de la pared (Brett & Waldron, 1996).

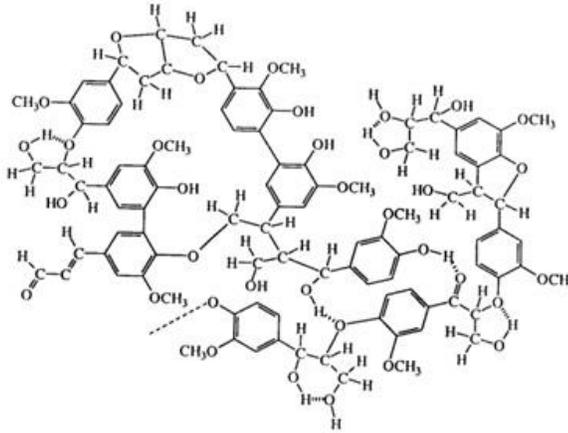


Figura 1.17. Estructura química de la lignina.

1.7.5. Otros componentes de la pared celular

La pared celular vegetal posee otros biopolímeros complejos como proteínas estructurales, enzimas y compuestos fenólicos (Carpita & Mc Cann, 2000)

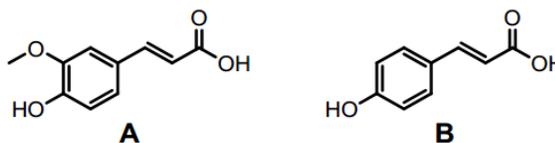


Figura 1.18. Ácido ferúlico (A) y ácido cumárico (B)

Los compuestos fenólicos más habituales son el ácido ferúlico y el ácido cumárico (**Figura 1.18**) y suelen encontrarse esterificados a la arabinosa y/o galactosa correspondientes a las cadenas laterales de las pectinas (Mc.Neil,

Darvill & Albersheim, 1980). Se cree que el ácido ferúlico forma puentes diferulato, los cuales limitan la extensión de la pared, por ejemplo en la remolacha.

Los principales tipos de proteínas identificadas en la pared celular son glicoproteínas, ricas en hidroxiprolina (extensina) y otras ricas en prolina y glicina. Además se presentan enzimas como las peroxidasas, fosfatasas, glicosilhidrolasas y deshidrogenasas (Brownleaderetal., 1999). Se considera que las peroxidasas juegan un rol importante en procesos tales como los implicados en la lignificación así como en la insolubilización de los complejos pectina-extensina. La diversidad de sustratos justifica el que la peroxidasa se encuentre involucrada en un amplio rango de procesos fisiológicos como la formación de lignina y suberina (Oudgenoeg et al., 2002), el entrecruzamiento de componentes de la pared celular, la defensa contra organismos patógenos y la elongación celular.

1.7.6. Pared celular de la remolacha

La parte habitualmente consumida de *Beta vulgaris* var. *conditiva* es una raíz engrosada o tubérculo (**Figura 1.19**).

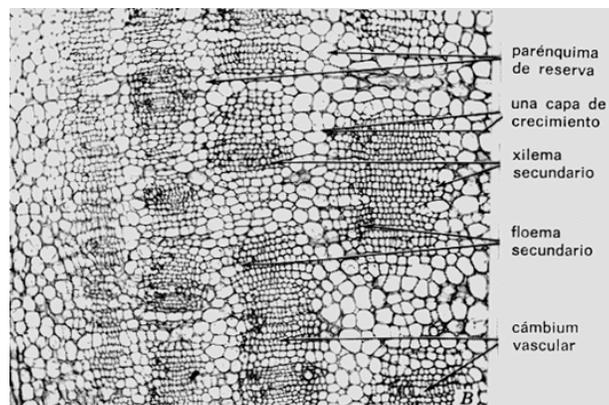


Figura 1.19. Detalle de transcurso de raíz de remolacha, *Beta vulgaris*.

La remolacha posee parénquimas abundantes ricos en reservas en azúcares, representadas esencialmente por sacarosa en solución en el jugo vacuolar. Las vacuolas de la remolacha roja contienen además pigmentos betalámicos.

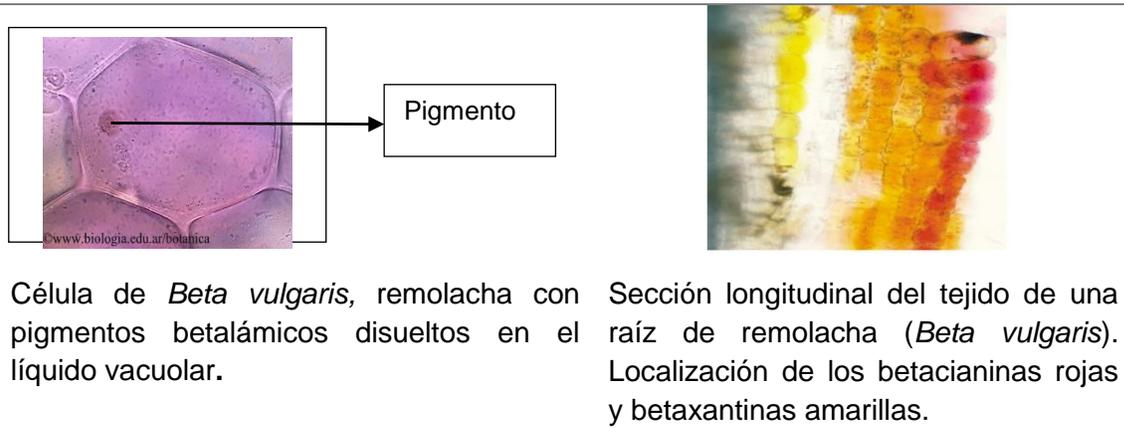


Figura 1.20. Distribución de las betalaínas en la célula vegetal. Adaptado de Strack et al. (2003).



2. OBJETIVOS

2.1. Generales

Estudiar la recuperación de la biomasa residual del escaldado de *Beta vulgaris* L. variedad *conditiva*, agregándole valor al convertirla en productos con aplicación como aditivos alimentarios. De este modo se contribuirá al aprovechamiento integral de las materias primas, al desarrollo de tecnologías limpias en relación a la industrialización y al desarrollo de alimentos sanos.

2.2. Específicos

- ✓ Estudiar la influencia del pH y de la temperatura en las características físico-químicas y propiedades colorantes de fracciones sólidas y líquidas remanentes del proceso de escaldado de *Beta vulgaris* L.var *conditiva*.
- ✓ Estudiar la influencia del pH y de la temperatura en los compuestos betalámicos presentes en fracciones sólidas y líquidas remanentes del proceso de escaldado de *Beta vulgaris* L.var *conditiva*.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos y solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Los solventes para cromatografía fueron de calidad HPLC.

3.2. Preparación de las muestras

Las muestras de los tallos engrosados de remolacha (*Beta vulgaris* L. var *conditiva*) tipo *Detroit* fueron adquiridas en mercados locales de la ciudad de Buenos Aires y, posteriormente, lavadas con agua, peladas, cortadas en rodajas de 1 cm de espesor, con un diámetro entre 4,9 cm a 6 cm.

Dichas rodajas se sometieron a un tratamiento de escaldado por inmersión durante 7 minutos en agua a 90 °C (Latorre, 2011). En el Método A, se utilizó una relación remolacha/agua de 147 g/L y en el Método B, una relación remolacha/agua de 538 g/L.

El agua de escaldado se congeló y almacenó a -18°C hasta su caracterización. Se evaluó el contenido de betalaínas y el color.

Los tejidos de remolacha se envasaron al vacío en bolsas de cloruro de polivinilo– cloruro de polivinilideno (Cryovac®, Grace, Buenos Aires, Argentina) y fueron congelados y almacenados a -18°C. Luego, se sublimó el agua de dichos tejidos en un equipo Pennsalt (Filadelfia, USA) a presión de cámara de 100 µm de mercurio y temperatura de 25°C en estante, durante 72h. El tejido liofilizado se molió en molino de cuchillas doméstico (DeLonghi, Buenos Aires, Argentina) y se tamizó para obtener dos fracciones con distintas granulometría (fracción de

partículas menores a 105 μm y fracción de partículas mayores a 105 μm). Los polvos obtenidos fueron almacenados contenidos en frascos de cloruro de polivinilo con tapa a rosca y almacenados a -18°C hasta su uso. Se evaluó la humedad, actividad acuosa (a_w), el contenido de betalaínas y de sólidos de pared celular, el color y morfología por microscopía electrónica de barrido (SEM).

El esquema completo del proceso se puede observar en la **Figura 3.1**.

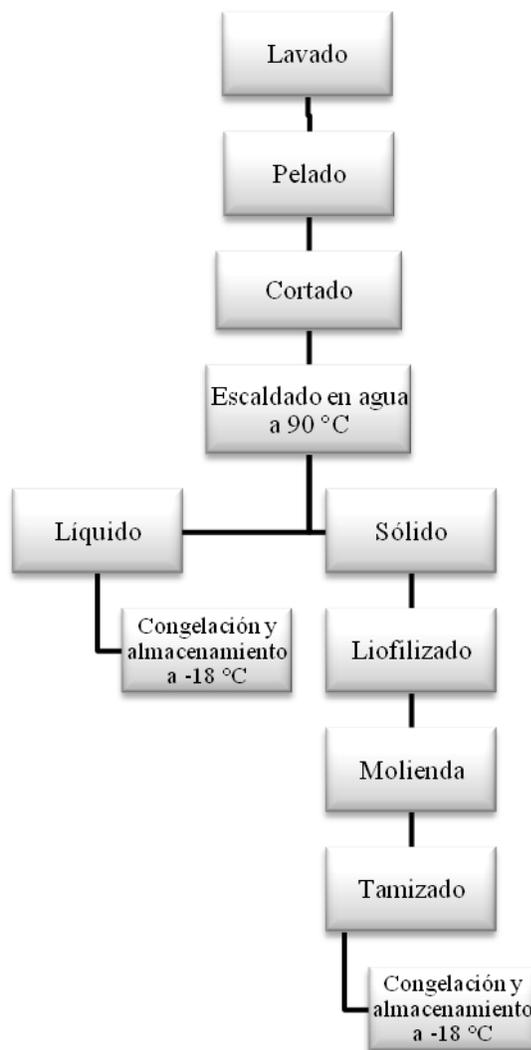


Figura 3.1. Esquema del proceso de obtención de aguas de escaldado y polvos de remolacha y de su procesamiento y almacenamiento.

3.2.1. Evaluación de la eficiencia del escaldado aplicado

Para evaluar la eficiencia de los métodos de escaldado aplicados, se determinó la actividad de polifenoloxidasas y de peroxidasa luego de la aplicación del proceso (Latorre, Narvaiz, Rojas, Gerschenson, 2010; Latorre, 2011).

3.2.1.1. Preparación del extracto enzimático

La extracción de las enzimas peroxidasa (POX) y polifenoloxidasas (PPO) en la remolacha, se llevó a cabo siguiendo la metodología de Walton & Sondheimer (1968). Para ello, los tejidos frescos y escaldados por el método A o B, fueron triturados con una picadora doméstica Minipimer Braun 4169 con herramienta de cuchillas (Braun, ciudad de México, México). Luego, fueron homogenizados con acetona pre-enfriada (4 °C) en una relación de tejido: solvente de 1:4 (m/v) durante 2 min a velocidad de 20000 rpm, utilizando un equipo Sorvall Omni Mixer (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Alemania). Cada homogenato fue posteriormente filtrado, utilizando un embudo Büchner y papel de filtro. Los residuos fueron lavados dos veces, sucesivamente, con acetona (4 °C). La acetona remanente fue eliminada por evaporación a temperatura ambiente, manteniendo el residuo de este proceso, bajo campana, durante toda la noche. Los residuos secos fueron almacenados a -18°C hasta su uso.

3.2.1.2. Peroxidasa (POX)

Los polvos acetónicos ($\approx 0,5000\text{g}$) fueron mezclados con 40 ml de buffer fosfato 0,05 M (pH=7,0). En cada suspensión se agregó cloruro de sodio hasta alcanzar una concentración final 1 M de NaCl. Los sistemas se mantuvieron con

agitación constante, durante 60 min a temperatura de 5 °C y luego fueron centrifugados a 10.000 rpm por 5 min a 5 °C, empleando una centrifuga Eppendorf Modelo 5804R (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

En los sobrenadantes obtenidos se determinó la actividad enzimática de la POX total a temperatura ambiente según Marangoni, Jackman y Stanley (1995), utilizando como sustrato guayacol (o-metoxi-fenol) 1% (m/v de etanol 50 % v/v); y buffer fosfato 0,1 M (pH 6,0) en una relación de 1:1:10. Para ello se midieron 0,3 ml del sobrenadante del paso previo, se mezclaron con 2,7 ml de la mezcla de reacción conteniendo el sustrato y se homogeneizó. La variación de la absorbancia a 470 nm, fue evaluada cada 10 segundos durante 6 minutos, utilizando un espectrofotómetro UV-mini 1240UV-VIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). La concentración de proteína se evaluó por el método de Lowry. La actividad se expresa como el cambio de absorbancia a 470 nm (unidad de absorbancia, AbU) por minuto y miligramo de proteína ($\text{AbU min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$)

3.2.1.3. Polifenoloxidasas (PPO)

Una masa de $\approx 0,5000$ g de polvo acetónico fue utilizada para evaluar la actividad de la PPO de acuerdo al método propuesto por Coseteng y Lee (1987) y Xuan et al. (2008). Los polvos acetónicos fueron resuspendidos en buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH=6,0) manteniendo una relación 1:5 (p:v) y a cada muestra se agregó NaCl hasta alcanzar una concentración final 1M. Los sistemas se mantuvieron con agitación constante, durante 45 minutos a; posteriormente los sobrenadantes fueron separados por centrifugación (10.000 rpm, 10 min y 7 °C)

utilizando una centrífuga Eppendorf Modelo 5804R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania). En los sobrenadantes se midió la actividad de PPO total, a 25 °C, utilizando pirocatecol 0,04M en solución de buffer fosfato 0,01 M (pH=7,0). La variación de absorbancia a 420 nm fue evaluada cada 10 segundos durante 6 minutos utilizando un espectroUV-mini 1240UV-VIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). La concentración de proteína se evaluó por el método de Lowry. La actividad se expresa como el cambio de absorbancia a 420 nm por minuto y mg de proteína ($\text{AbU min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína).

3.3. Estudio de estabilidad frente al pH y la temperatura de las betalaínas presentes en las aguas de escaldado

Se llevó a cabo un seguimiento de la estabilidad de las aguas de escaldado de la remolacha. La selección de los valores de pHs y temperaturas usados fue realizada con el fin de cubrir una gama de valores de pH existentes en alimentos y temperaturas correspondientes a tecnologías de procesamiento/almacenamiento. Todo ello con el fin de representar algunas de las posibles situaciones que se podrían encontrar cuando se añaden betalaínas como colorante natural en productos alimenticios.

Los estudios de estabilidad de las betalaínas en las aguas de escaldado (pH 6,3) de la remolacha, se realizaron a dos valores de pH (3,6 y 8,0). Asimismo, se almacenó un sistema control de pH 6,3. En todos los casos se utilizó agua Milli-Q™. Los sistemas en estudio se almacenaron durante 0 (1h), 1, 2, 3 y 4 días a temperaturas de 5 °C, 25 °C y 45 °C y, para cada tiempo, se realizó la caracterización de la muestra por duplicado.

Para este estudio, en una serie de frascos de color caramelo (volumen: 30 ml), se agregaron 2 ml de las aguas de escaldado para cada método con: 1) 2 ml de buffer de pH 3,6 (acetato de sodio 0,2 M (7,4% v/v) y ácido acético 0,2 M (92,6% v/v) ó 2) 2 ml de buffer de pH 8,0 (fosfato de potasio 0,1 M ajustando el pH con hidróxido de sodio). Todo ello se hizo por duplicado. Para el sistema control, en lugar de los buffers, se agregaron 2 ml de agua Milli-Q™. Posteriormente los sistemas se almacenaron por 4 días a 5 °C, 25 °C o 45 °C y se tomó muestra diariamente. A los sistemas de las aguas de escaldado, se les incorporó azida sódica hasta una concentración de 0,01 % (p/v) para evitar el desarrollo de hongos durante los estudios.

El material tratado a los distintos pHs y temperaturas fue caracterizado, a los distintos tiempos, por duplicado, por: determinación de su espectro UV/Visible (280-700 nm), determinación de contenido de betalaínas totales, color por sistema CIELab y caracterización fotográfica. Asimismo, se identificaron las betacianinas y betaxantinas presentes, por HPLC DAD para las aguas de escaldado del método B (pH 6,3) sin y con almacenamiento a 45 °C y, para tiempo inicial y 2 días de tratamiento, con el objetivo de poder profundizar en la estabilidad térmica de estos compuestos.

3.4. Estudio de estabilidad frente a la temperatura de las betalaínas presentes en los polvos liofilizados

Se realizó un seguimiento de la estabilidad térmica de los polvos de remolacha. Para ello, en una serie de frascos de color caramelo (30 ml) se pesaron, aproximadamente, 3,000 g de los polvos de la mayor y menor

granulometría, provenientes de la aplicación del método A y B de escaldado a los tejidos de remolacha. Posteriormente, se realizó el almacenamiento a 45 °C (Ensayos preliminares a 5, 25 y 45 °C. Ver ANEXO 1) durante 6 días, tomándose muestra diariamente por duplicado. El material sin y con almacenamiento fue caracterizado por: determinación de su espectro UV/Visible, determinación del contenido de betalaínas totales, color por sistema CIELab (menor granulometría), caracterización fotográfica. Asimismo, para los polvos (método de escaldado B y menor granulometría) sin y con almacenamiento a 45 °C y, para tiempo inicial y para 6 días de tratamiento, se identificaron las betacianinas y betaxantinas presentes, por HPLC-DAD y HPLC-ESI MS/MS.

3.5. Estudio de la estabilidad frente al pH y la temperatura de betalaínas presentes en polvos de remolacha incorporados en sistemas modelo

Para poder realizar este estudio se diseñó un sistema modelo de alimento a base de agar- agar. El mismo se ajustó a tres valores de pH (3,6, 6,3 y 8,0) con la finalidad de poder evaluar el efecto de esta variable en la estabilidad del colorante natural contenido en los polvos de remolacha que fueron incorporados al sistema modelo mencionado.

Para ello, se prepararon los sistemas (S1, S2 y S3. **Tabla 3.1**) con agar-agar tipo A (Biokar, Allonne, Francia) al 2% p/p llevándolos a:

- pH 3,6 con buffer formulado con acetato de sodio 0,2 M y ácido acético 0,2 M.

- pH 8 con buffer formulado con fosfato de potasio 0,1 M ajustando el pH con hidróxido de sodio.
- En el caso de pH 6,3, se sustituyó el buffer con agua Milli-Q.

Tabla 3.1. Composición (g/100 g totales) de los sistemas modelo conteniendo polvo de remolacha 1,5 g/100 g.

Sistema modelo	Agar- agar (g)	Ázida sódica (g)	Fase acuosa
S1 pH 3,6	2	0,1	96,3 Buffer 3,6 (item 3.3)
S2 pH 6,3	2	0,1	96,3 Agua Milli-Q™
S3 pH 8,0	2	0,1	96,3 Buffer 8,0 (item 3.3)

Para la formulación de los sistemas, 2 g de agar-agar se suspendieron en 96,3 ml del correspondiente buffer o agua según corresponda, con agitación constante hasta ebullición, en una plancha calefactora (Velp Scientifica, Italia). Las suspensiones se mantuvieron a temperatura de 60°C en baño de agua. Se les agregó 0,1 g de azida sódica y 1,5 g del polvo de remolacha de granulometría menor a 105 µm del método B y se los agitó durante 2 minutos. Se corroboró el pH de cada sistema ajustando con ácido acético glacial o NaOH 0,1 M, según correspondiera, en caso de necesidad. Luego, se dispensaron ≈10 g de cada sistema en moldes plásticos (4,5 cm de diámetro y 1 cm de altura) con tapa, se los tapó y dejó solidificar a temperatura ambiente.

Los sistemas S1, S2 y S3 fueron equilibrados durante una hora (sistema de tiempo cero). Luego fueron almacenados durante 2, 4 y 6 días en cámaras de 5 °C, 25 °C y 45 °C para evaluar el efecto de la temperatura a cada pH. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

Para cada tiempo y temperatura de almacenamiento se caracterizó a los sistemas por: determinación de su espectro UV-Visible, determinación del contenido de betalaínas totales, color por sistema CIELab y caracterización visual a través de fotografía.

3.6. Espectros de absorción de las aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas modelo

Se obtuvieron los espectros de absorción (longitudes de onda: 300 a 700 nm) de las muestras de las aguas de escaldado, de los extractos de los polvos y de los extractos de los sistemas de agar conteniendo los polvos, tanto en su estado original como luego de los almacenamientos a distintos pHs o temperaturas (Ver ítem 3,7). Las muestras fueron diluidas con agua Milli-Q™ para ajustar el máximo de absorción en $1,00 \pm 0,05$. En el caso de las aguas de escaldado la relación de dilución fue 1:1, en el caso de los extractos de los polvos, fue 1:4 y para los extractos de los sistemas de agar, fue 1:1. Para la medición se utilizó un espectrofotómetro UV-mini 1240UV-VIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

3.7. Medición del contenido de betalaínas en aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas modelo

Las aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas de agar incluyendo polvos de remolacha, fueron utilizados para la cuantificación espectrofotométrica del contenido de pigmentos betalámicos, según Moßhammer, Stintzing & Carle (2006). Las lecturas de las absorbancias se llevaron a cabo en

un espectrofotómetro UV-mini 1240UV-VIS (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) y se hicieron por duplicado. La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera:

- a. En las aguas de escaldado, la medición se realizó directamente.
- b. En los polvos, se realizó la extracción de las betalaínas a partir de, aproximadamente, 0,500 g de polvo, usando 15 ml de agua Milli-Q™. La suspensión se agitó continuamente durante 2 h y se centrifugó (centrífuga Modelo 5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se separó y se utilizó para la medición.
- c. En los sistemas de agar conteniendo el polvo de remolacha, se molió en un mortero el contenido de cada molde plástico, luego se pesaron 5 g de este material en un tubo falcon y se agitó por 1 minuto en un vortex (Velp, Scientifica, Italia) con 20 ml de agua Milli-Q™. Se sonicó durante 30 minutos (ultrasonic cleaner, Testlab, Argentina) y, por último, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C (centrífuga Modelo 5804R, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se separó el extracto y utilizó para la medición.

El contenido de betacianinas totales fue calculado como betanina equivalente y el contenido de betaxantinas como vulgaraxantina I equivalente. Para la lectura espectrofotométrica, las muestras fueron diluidas en buffer McIlvaine (pH =6,5) para ajustar el máximo de absorción en $1,00 \pm 0,05$ en la longitud de onda 534 nm ó 476 nm.

El contenido de betacianinas se calculó como;

$$Bc \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A * F * Mw * 100}{\epsilon l}$$

Donde,

A=Corresponde al valor de absorbancia de la betanina a $\lambda_{\text{máx}}$ de 536 nm, corregida por la lectura a 600 nm (línea base).

F= Es el factor de dilución

M_w = Es el peso molecular de la betanina (550 g/mol)

ϵ = Es el coeficiente de extención molar de la betanina (60.000 L/mol cm)

l= Paso óptico de la cubeta (1,0cm)

El contenido de betaxantina se calculó como:

$$Bx \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A * F * Mw * 100}{\epsilon l}$$

Donde,

A=Corresponde al valor de absorbancia de la vulgaraxantina I a $\lambda_{\text{máx}}$ de 476 nm, corregida por la lectura a 600 nm (línea base).

F= Es el factor de dilución

M_w = Es el peso molecular de la vulgaraxantina I (339 g/mol)

ϵ = Es el coeficiente de extención molar de la vulgaraxantina I (48.000 L/mol
cm)

l = Paso óptico de la cubeta (1,0cm).

3.8. Medición de color en aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas modelo

El color de las aguas de escaldado, polvos de remolacha y sistemas de agar incluyendo polvos de remolacha, fue evaluado utilizando un fotocolorímetro (CM-700d/600d, Konica Minolta Co. Ltd., Osaka, Japón) con iluminante D65, que corresponde a la luz natural de día y con ángulo de observador estándar, α , de 10°. Cada muestra fue colocada sobre un azulejo blanco, registrándose el color a través de las coordenadas cromáticas L^* (0, negro a 100, blanco), a^* (+a color rojo; -a color verde) y b^* (+b color amarillo; -b color azul) del espacio CIELab.

Los valores de a^* y b^* fueron utilizados para evaluar el Croma (C^*), índice de pureza o saturación del color y el ángulo de hue (h^{o*}) o tono, mediante las siguientes expresiones (McGuire, 1992; Itle, Kabelka, 2009):

$$C^*=(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$h^{o*}= \tan^{-1}(b^*/a^*)$$

3.9. Humedad de los polvos de remolacha

La humedad se determinó en los polvos liofilizados utilizando una masa de $\approx 0,500$ g, y una balanza infrarroja (Analizador de humedad MB45.Ohaus

Corporation, New Jersey, USA) hasta peso constante. La determinación se realizó, al menos, por duplicado.

3.10. Actividad acuosa de los polvos de remolacha

La actividad de agua (a_w) fue evaluada por triplicado a 25 °C, en un higrómetro AquaLab Series 3 (Decagon, Pullman, USA). La actividad acuosa real (a_w) fue determinada por interpolación a partir de la curva de calibración, previamente realizada en el equipo, a través de la medición de la actividad de agua de soluciones saturadas de actividad de agua conocida: LiCl ($a_w=0.110$), MgCl₂ ($a_w=0.333$), NaCl ($a_w=0,752$) y KNO₃ ($a_w=0,926$) a 25,0 °C (Greenspan, 1977).

3.11. Fraccionamiento de componentes de la pared celular por hidrólisis ácidas en polvos de remolacha

Las hidrólisis ácidas se realizaron para las muestras sólidas de acuerdo con Ng, Parr, Ingham, Rigby & Waldron (1998).

3.11.1. Lignina

Se pesaron aproximadamente 0,3000 g de polvo de remolacha para cada muestra, por duplicado. Se disolvieron en 2,08 ml de ácido sulfúrico 72% (v/v) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 horas. Luego, las muestras fueron diluidas con agua Milli-Q™ (aproximadamente 25 ml) para lograr una concentración 1 M en sulfúrico. Las suspensiones se hidrolizaron mediante el calentamiento en un baño de agua a 100°C durante 2,5 horas, homogeneizando

periódicamente y agregando agua (100°C) para mantener el volumen constante. Las suspensiones obtenidas fueron enfriadas y centrifugadas.

Los residuos sólidos fueron lavados tres veces con agua Milli-Q™, congelados a -18°C y sublimados. El residuo sólido liofilizado obtenido fue pesado para evaluar el contenido de lignina en la muestra utilizada. Se informa el promedio y la desviación estándar (DS) de la determinación.

3.11.2. **Hidratos de carbono no celulósicos, celulosa y proteínas**

Se pesaron aproximadamente 0,3000 g de polvo de remolacha para cada muestra, por duplicado. Se disolvieron en 2,08 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v) e inmediatamente las muestras se llevaron a volumen con agua Milli-Q™ (aproximadamente 25 ml) para lograr una concentración 1 M de ácido sulfúrico. La hidrólisis se llevó a cabo mediante calentamiento en un baño de agua a 100 °C, durante 2,5 horas, homogeneizando periódicamente y agregando agua (100 °C) para mantener el volumen total constante. Las suspensiones obtenidas fueron enfriadas, centrifugadas y los sobrenadantes fueron separados y neutralizados y utilizados para determinar el contenido de hidratos de carbono no celulósicos (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956) usando glucosa como estándar y el contenido de proteínas (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951) usando albúmina de suero bovino como estándar. El precipitado permitió determinar gravimétricamente la celulosa y lignina presentes y, a partir de ello, calcular el contenido de celulosa. Se informa el promedio y DS de la determinación.

3.11.3. Ácidos urónicos

Se pesaron aproximadamente 0,3000 g de polvo de remolacha para cada muestra, por duplicado. Se disolvieron en 2,08 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v) inmediatamente las muestras se llevaron a volumen con agua Milli-Q™ (aproximadamente 25 ml) para lograr una concentración 1 M de ácido sulfúrico. La hidrólisis se llevó a cabo mediante calentamiento en un baño de agua a 100 °C, durante 1 hora, homogeneizando periódicamente y agregando agua (100 °C) para mantener el volumen total constante.

Las suspensiones obtenidas fueron enfriadas, centrifugadas y los sobrenadantes fueron separados, neutralizados y utilizados para la evaluación de ácidos urónicos (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991), utilizando ácido galacturónico para la curva estándar. Se informa el promedio y DS de la determinación.

3.12. Determinación de carbohidratos

La cuantificación del contenido de hidratos de carbono en los sobrenadantes neutralizados, obtenidos de las hidrólisis ácidas, se realizaron según Dubois et al. (1956).

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica se tomó un volumen de 100 µl de muestra, previamente diluido (1/10) y se llevó a volumen final (2000 µl) con agua Milli-Q™. Se agregaron 50 µl de la solución de fenol (Merck, Buenos Aires, Argentina) (80 % p/p), se homogeneizó y luego se agregaron 5000 µl de H₂SO₄. La solución se dejó enfriar y se homogeneizó nuevamente. Finalmente se leyó la absorbancia a 490 nm. El color desarrollado es

proporcional al contenido de azúcares presentes. Para la cuantificación se realizó una curva de calibración con una solución estándar de D-glucosa.

3.13. Determinación de ácidos urónicos

El contenido de ácido urónicos en los sobrenadantes neutralizados que correspondiese, fue determinado según el método de Filisetti-Cozzi & Carpita (1991).

Para la reacción colorimétrica y posterior medición espectrofotométrica se tomó una alícuota de 200µl de muestra previamente diluida (1/10) y se llevó a volumen final (500 µl) con agua Milli-Q™; se agregaron 40 µl de ácido sulfámico (4 M; pH=1,6). Luego se añadieron 2500 µl de la solución de tetraborato de sodio (0,075 M en ácido sulfúrico concentrado) y se colocaron las muestras tapadas en un baño de agua a 100 °C durante 20 minutos. La reacción se detuvo rápidamente colocando las muestras en un baño de agua con hielo. Se añadieron 80 µl de solución de m-hidroxidifenilo 0,15 % (p/v) en NaOH 0,5 % (p/v). A partir de los 10 minutos de contacto, el color se desarrolló completamente. La absorbancia fue leída a 525 nm.

Para la cuantificación, se utilizó una curva de calibración desarrollada con una solución estándar de ácido D- galacturónico

3.14. Determinación de proteínas

El contenido de proteínas en los sobrenadantes neutralizados y en la evaluación de actividad de POX y de PPO, se determinó mediante el método de Lowry et al. (1951).

Se colocaron 100 μL de muestra, 100 μL de agua, 1000 μL del Reactivo A (Carbonato de sodio Na_2CO_3 2% (p/v) en NaOH 0,1N; sulfato cúprico $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v) en H_2O ; tartrato de sodio y potasio tetrahidratado $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1% (p/v) en H_2O . En relación 10:0,1:0,1 en un recipiente adecuado. Se agitó con vórtex y se dejó 20 minutos a 37°C . Se agregaron 100 μL del Reactivo B (solución de Folin-Ciocalteu, cuyo principal constituyente es el ácido fosfomolibdotúngstico, en H_2O , 1:1), agitando luego con el vórtex. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm. En la determinación se utilizó seroalbúmina bovina (BSA Protein Standard; Sigma-Aldrich, EEUU) como proteína patrón disuelta en solución salina (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a partir de la cual se preparó una curva de calibración.

Los resultados se expresan en porcentaje (g de proteína/100 g polvo).

3.15. Microscopia electrónica de barrido y espectroscopía de energía dispersiva de polvos de remolacha

Para evaluar la morfología de los polvos liofilizados de remolacha, se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía de energía dispersiva (EDS). Se usó un equipo ZE122 SEM SUPRA 40 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un espectrómetro EDS Oxford Instruments. Para la formación de las imágenes se aplicó un voltaje de aceleración de 120 Kv a 5,000 Kv. Las muestras fueron metalizadas con platino para convertirlas en material conductor antes de introducirlas en el microscopio.

3.16. Análisis cromatográfico de betalaínas

3.16.1. Extracción de betalaínas a partir de las aguas de escaldado

Se usaron las aguas de escaldado del método B para la caracterización de los compuestos betalámicos presentes por la mayor concentración de pigmentos que las mismas presentaban, lo cual fue concluido a partir de resultados previos. Utilizando cartuchos sep-pack C18 (Waters, Milford, USA) previamente acondicionados con 10 ml de metanol y, posteriormente, con 10 ml de agua Milli-Q™, se concentraron las betalaínas de las aguas de escaldado sembrando 6 ml de aguas de escaldado, eluyendo con 1ml de metanol y filtrando mediante una membrana de 0,22 µm de poro (Econofilter, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), obteniéndose el extracto para ser analizado por HPLC.

3.16.2. Extracción de betalaínas a partir de los polvos de remolacha

La extracción de las betalaínas de los polvos liofilizados de remolacha de menor granulometría (método B) se realizó a partir de 1,0 g de polvo con 10 ml de metanol al 80 % (v/v). Se agitó continuamente durante 30 min y se centrifugó el extracto a 10.000 rpm durante 15 min a 4 °C (centrifuga 5804R. Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El sobrenadante se separó y el residuo se volvió a extraer con otros 10 ml de metanol 80 % (v/v). Luego, se mezclaron los sobrenadantes y se concentraron en un equipo ROTAVAP (Buchi, Postfach, Suiza), estandarizando el volumen final del concentrado a 2 ml y se almacenaron a -18 °C, al resguardo de la luz, hasta su uso (Swarna et al., 2013).

3.16.3. **Caracterización por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)**

Se analizaron los extractos de las aguas de escaldado y de los polvos liofilizados de remolacha mediante HPLC, utilizando un equipo Waters 1525 (Waters, Milford, USA), equipado con un sistema de bombas binarias (modelo M0925P 839^a, Waters Singapur, República de Singapur), un desgasificador (modelo M09DG2 455M, Waters, Milford, USA) y un detector de arreglo de diodos (DAD) (modelo A10998 660^a, Waters Singapur, República de Singapur). Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en una columna Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula, Agilent, USA) utilizando un flujo de 0,3 mL/min y 20µL de volumen de inyección. La elución se realizó con un gradiente lineal, utilizando como solvente A, ácido fórmico 1%(v/v) y como solvente B, acetonitrilo (Swarna et al. 2013), comenzando con 1% de B hasta alcanzar el 33% a los 40 minutos. La detección se realizó a 470 y 530 nm, las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción de betaxantinas y betacianinas, respectivamente.

3.16.4. **Caracterización por espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-MS/MS)**

Se analizaron los extractos de los polvos liofilizados de remolacha provenientes del estudio de la estabilidad frente a la temperatura, utilizando un equipo de HPLC (Modelo Agilent 1200. Agilent Technologies, Wilmington, USA) provisto con una bomba binaria (modelo G1312B), un inyector automático (modelo G1367D), un desgasificador (modelo G1379B) y un detector de arreglo de diodos

(modelo G1315C), registrando los cromatogramas a 470 nm y 530 nm. Se utilizó un espectrómetro de masa de alta resolución Bruker micrOTOF-QII (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) con fuente de ionización electrospray (ESI). Las condiciones de ionización fueron 200 °C y 4,5 kV para la temperatura capilar y voltaje, respectivamente. La presión del nitrógeno como gas nebulizador y el caudal como gas de secado fueron de 3,0 Bar y 6,0 L/min, respectivamente. El escaneo de masas se realizó entre 50-950 m/z en modo positivo. La adquisición y procesamiento de datos se realizó mediante el software Bruker Compass Data Analysis ver. 4.0 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

La identificación de los picos se realizó mediante sus espectros UV y espectros de masa, con sus correspondientes fragmentaciones.

3.17. Diseño experimental y análisis estadístico

Los análisis estadísticos de comparación de resultados se realizaron mediante un análisis de varianza, ANOVA, con nivel de significancia, α de 0,05. Como test “*a posteriori*” se utilizó el test de Tukey (Sokal & Rohlf, 2000). Estos análisis así como los ajustes no lineales de los datos experimentales se realizaron con el utilitario Prism 5 (Statistical Software para Windows GraphPad, La Jolla, USA)



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Eficiencia de las técnicas de escaldado ensayadas en tejidos de remolacha (*Beta vulgaris* L. var *conditiva*)

Distintas enzimas se encuentran presentes en los tejidos de la raíz de remolacha. En el caso de la peroxidasa (POX) y polifenoloxidasas (PPO), su actividad puede producir deterioro de la calidad (pérdida de color, textura y nutrientes), lo cual se controla con distintas estrategias tales como el escaldado. En este caso se evaluó la actividad de dichas enzimas en tejidos de remolacha frescos sin tratamiento térmico y los tejidos provenientes de la aplicación del método A o B, para verificar la eficiencia de la técnica de escaldado por inmersión en agua a 90 °C por 7 minutos.

Es importante destacar que los resultados obtenidos (**Figura 4.1**) en relación a la actividad de POX y PPO mostraron que los métodos de escaldado A y B fueron efectivos en la inhibición de la actividad de ambas enzimas por lo cual, los resultados informados más adelante, no se encuentran afectados por las mismas.

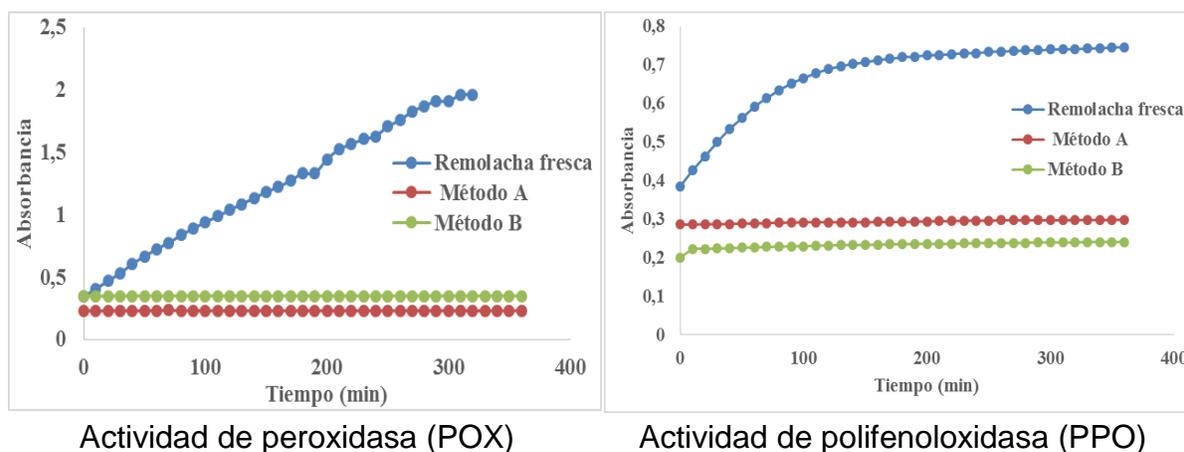


Figura 4.1. Actividad de la peroxidasa y polifenoloxidasas en tejidos de remolacha frescas y escaldadas.

4.2. Estudio de la estabilidad de betalaínas en aguas de escaldado de remolacha (*Beta vulgaris* L. var *conditiva*)

4.2.1. Parámetros de color en aguas de escaldado

Inicialmente se evaluó el color por el sistema CIELab, el contenido de betalaínas y se realizó la caracterización fotográfica de las aguas obtenidas a partir de la aplicación de los dos métodos de escaldado.

Como se observa en la **Tabla 4.1**, la luminosidad de las aguas de escaldado presentó un valor de 49 para el método A y de 25 para el método B, o sea que se observó mayor L* cuando se utilizó el método A. Por otra parte, el método B, en el cual se utilizó una mayor relación de remolacha/agua, mostró un valor más alto del parámetro a*, o sea más intensidad de color rojo y también un mayor valor del parámetro b*, indicando mayor intensidad de color amarillo.

Tabla 4.1. Parámetros de color, contenido de betacianinas y betaxantinas en aguas de escaldado.

Parámetros	Método A	Método B
L*	49	25
a*	20	50
b*	10	37
C*	22	60
h°*	27	36
Betacianinas (mg/L)	1,33 ^a ±0,02	5,6 ^b ±0,6
Betaxantinas(mg/L)	1,77 ^a ±0,01	5,4 ^b ±0,4

Letras minúsculas diferentes en una misma fila, para cada pigmento, indican que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre métodos.

En relación al grado de tono (h^{**}) se observaron valores correspondientes, en todos los casos, a los rosas/rojos, presentando mayores valores las aguas resultantes de la aplicación del método B, en el cual se utilizó mayor relación remolacha/agua. También se observa mayor saturación del color (C^*) para este método.

En la **Figura 4.2** se observan las características fotográficas de color de las aguas analizadas que son coincidentes con lo previamente comentado a partir de los valores de los parámetros de color.

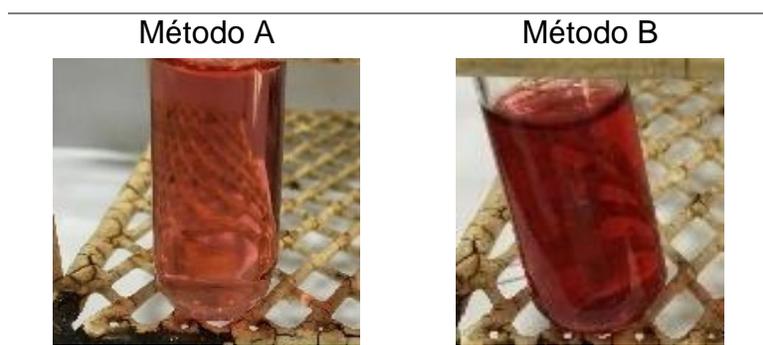


Figura 4.2. Visualización del color de las aguas de escaldado obtenidas por los distintos métodos ensayados.

4.2.2. Contenido de betacianinas y betaxantinas de las aguas de escaldado

Como se observa en la **Tabla 4.1**, el contenido de betacianinas y betaxantinas fue más alto en las aguas de escaldado del método B. Esto es coherente con los resultados obtenidos para los parámetros de color a^* y b^* . La remolacha (*Beta vulgaris* L. var *conditiva*) es una fuente alimenticia que contiene betalaínas de color rojo (betacianinas) y amarillo (betaxantinas) y existen otras pocas fuentes alimenticias con dichos pigmentos tales como la acelga de color (*Beta vulgaris* L. var *cicla*), el amaranto de grano y de hoja (*Amaranthus caudatus*

y *cruentus*) y los frutos de cactus (familia Cactaceae) (Cai et al., 1998; Stintzing et al., 2002 y Kugler et al., 2004).

4.2.3. Estudio de estabilidad frente al pH y la temperatura de las betalaínas presentes en las aguas de escaldado de remolacha

La estabilidad de los pigmentos presentes en las aguas de escaldado remanentes del tratamiento térmico de remolacha, utilizando el método A y el método B, se estudió en distintas condiciones de pH y temperatura. Para ello, se evaluó el espectro UV/Visible de las muestras, el contenido de betalaínas, el color por el sistema CIELab y se realizó la caracterización fotográfica.

4.2.3.1. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los espectros UV/Visible de la aguas de escaldado de remolacha

Los espectros de absorción de las muestras sometidas a distintos pHs y temperaturas durante el almacenamiento, pueden observarse en la **Figura 4.3** y **Figura 4.4**. Se presentaron picos a longitudes de onda de alrededor de 530 nm y 470 nm correspondientes a las betalaínas del tipo betacianinas y betaxantinas, respectivamente. Dicho comportamiento espectroscópico ha sido informado por otros autores (Bilyk, 1981; Delgado-Vargas & Jiménez, 2000; Stintzing & Carle, 2004).

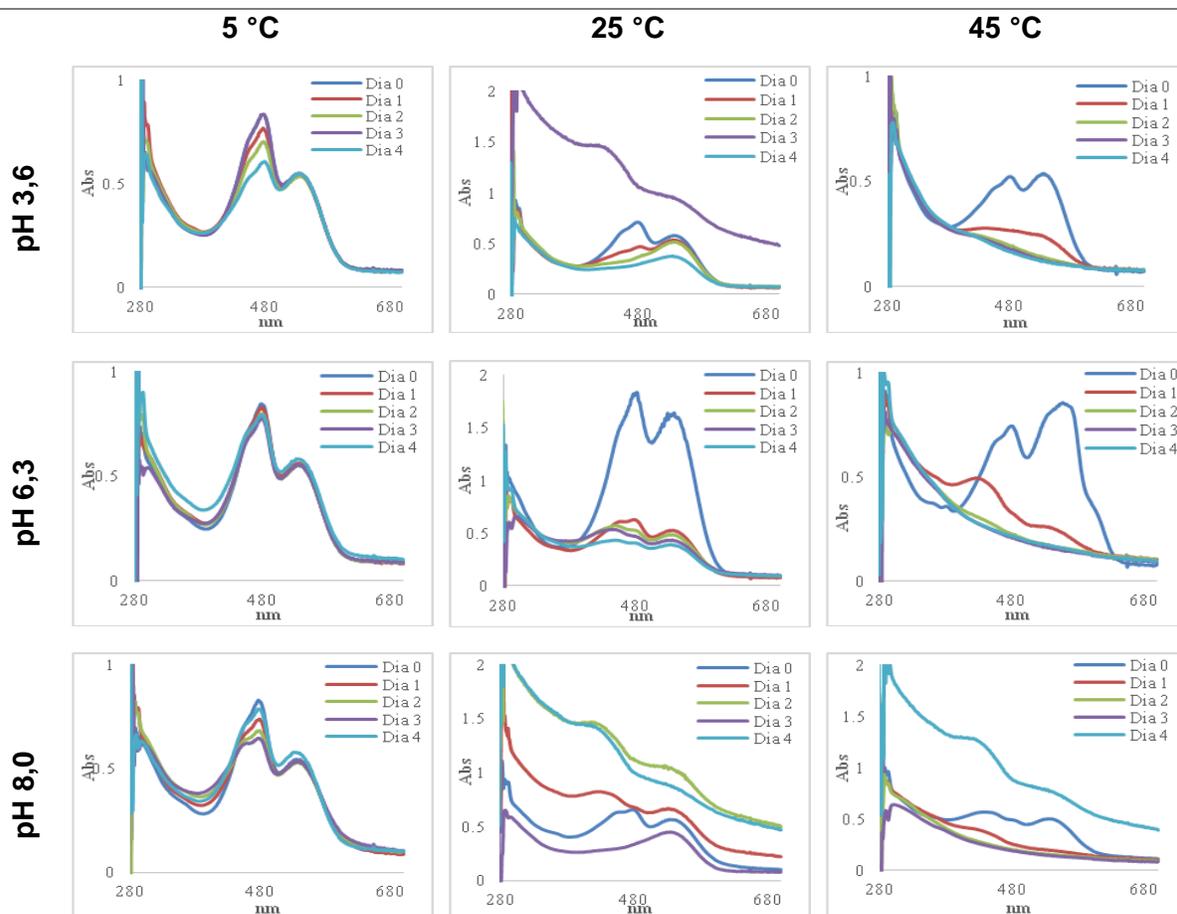


Figura 4.3. Efecto del pH y la temperatura en los espectros de absorción de las aguas de escaldado de remolacha (método A) y su variación con el tiempo.

A temperatura de refrigeración de 5 °C, el pico de absorción de ≈ 470 nm presentó mayor absorbancia que el pico de ≈ 530 nm al inicio del ensayo para las aguas de los métodos de escaldado A y B. A su vez, durante el almacenamiento se observó que el pico de ≈ 470 nm, en general, fue fuertemente afectado salvo para el agua proveniente de la aplicación del método de escaldado A y con pH 6,3. Por consiguiente, en general, la estabilidad de las betaxantinas fue afectada en las condiciones de almacenamiento de 5 °C a los pHs 3,6, 6,3 y 8,0. Una tendencia análoga, pero de menor magnitud, se observó para el pico de absorción de ≈ 530 nm de las betacianinas para las aguas de escaldado a pH 8,0, especialmente para

aquéllas provenientes de la aplicación del método B. Es de destacar que a pH 3,6 se observó durante el almacenamiento un incremento de la absorbancia a 470 nm y ello podría deberse a la degradación de las betacianinas, por ejemplo, por hidrólisis que da lugar a ácido betalámico amarillo si bien ello se ve favorecido a pHs alrededor de 6,0 por la deshidrogenación dando lugar a neobetanina a partir de betanina, por la formación de compuestos de pardeamiento, todo lo cual podría modificar el aspecto y la estabilidad de los sistemas (Herbach et al. 2006b). Es de destacar que, de acuerdo con Stintzing & Carle (2004), las agliconas de las betacianinas son más lábiles a sufrir oxidación lo que determina la pérdida de los rojos y, además, el producto oxidado daría lugar a pardeamiento con aparición entonces de coloraciones marrones.

El cambio de pH mostró un claro efecto sobre los picos de absorción a las dos longitudes de onda, a temperatura de almacenamiento de 25 °C, para las aguas obtenidas con los métodos de escaldado A y B. Para las del método A, se observó a pH 6,3 que los picos de ≈ 470 nm y ≈ 530 nm estaban claramente definidos sólo al inicio del almacenamiento y decayeron fuertemente durante los días subsiguientes. A pH 3,6 y 8,0 (método A), al inicio del almacenamiento dichos picos presentaron baja absorbancia y el almacenamiento produjo distintas tendencias, destacándose un incremento de la absorbancia para el día tres a pH 3,6 y a pH 8,0, en general, para todos los días.

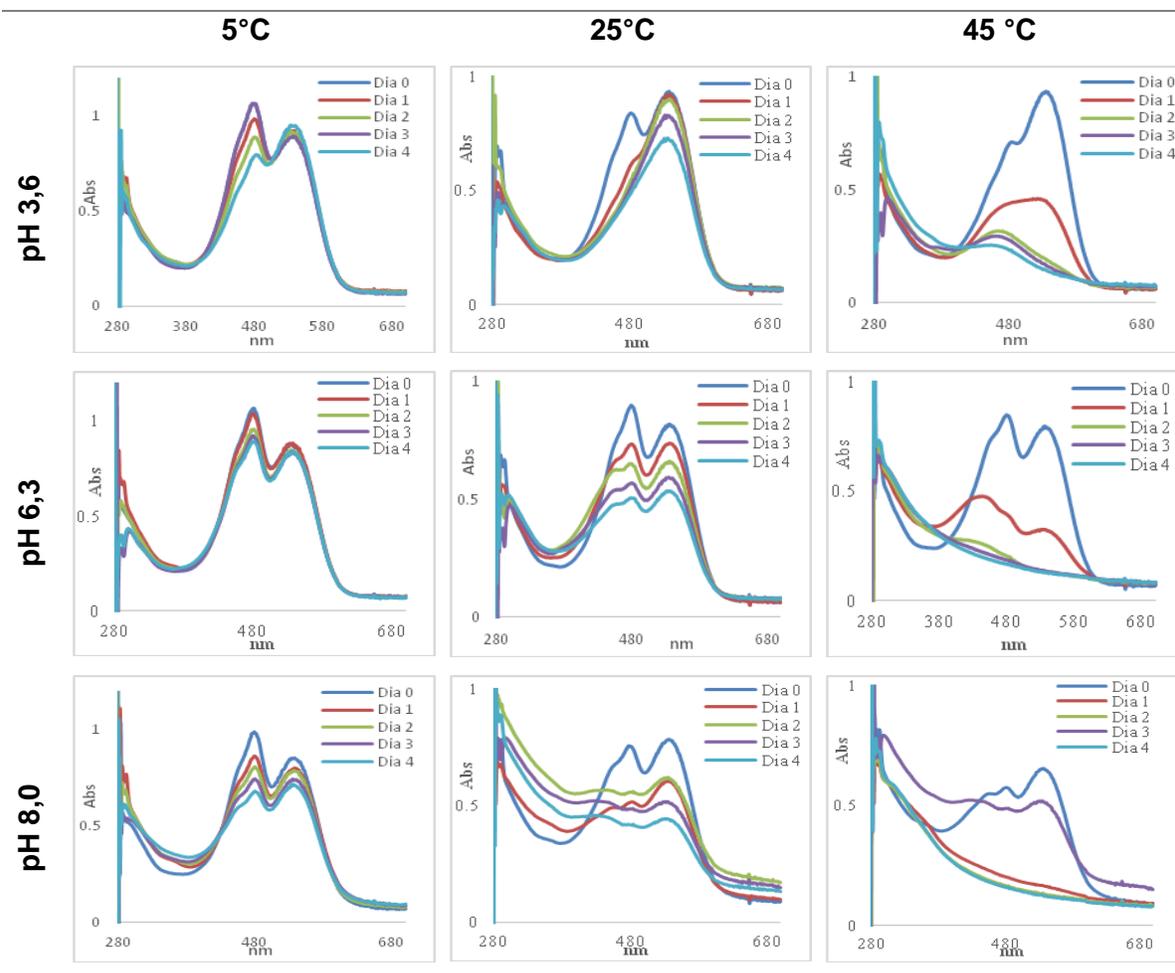


Figura 4.4. Efecto del pH y la temperatura en los espectros de absorción de las aguas de escaldado de remolacha (método B) y su variación con el tiempo.

Para las aguas de escaldado del método B a pH 6,3 a temperatura de 25 °C, se observaron ambos picos al inicio del almacenamiento y los mismos decayeron con el transcurso del tiempo. A pH 3,6 el pico de absorción de ≈ 470 nm se observó al inicio y, ya en el primer día, desapareció y persistiendo el pico de 530 nm. Por lo tanto, el color rojo (betacianinas) presentaría una mayor estabilidad en medio ácido que las betaxantinas de color amarillo. Savolainen & Kuusi (1978) informaron que las betaxantinas son menos estables que la betanina a valores de pH ácidos

A temperatura de almacenamiento de 45 °C, los dos picos de los espectros de las aguas de escaldado (**Figuras 4.3 y 4.4**) se observaron al inicio y fueron desapareciendo de manera notable durante el almacenamiento, mostrando la degradación de los pigmentos por efecto de esta temperatura. Se observó para pH 8,0, a los 4 días (método A) y 3 días (método B) de almacenamiento, un aumento en los valores de absorbancia a longitudes de onda entre 400 nm y 500 nm y, este hecho, podría deberse a la formación de otros compuestos tales como compuestos de pardeamiento que podrían generarse como consecuencia de la ocurrencia de reacciones de degradación de betalaínas favorecidas por la temperatura (Stintzing & Carle, 2007; Wybraniec et al., 2013). Este oscurecimiento se vió favorecido a pH 8,0 ya que un medio alcalino favorece esta reacción (Ajandouz, Tchiakpe, Ore, Benajiba, & Puigserver, 2001).

4.2.3.2. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en la concentración de las betalaínas en las aguas de escaldado

Se realizó la cuantificación espectrofotométrica del contenido de betalaínas del tipo betacianinas y betaxantinas en las aguas de escaldado remanentes de la aplicación de los métodos A y B en estudio.

Tabla 4.2. Contenido de betacianinas en aguas de escaldado de remolacha (método A) a diferentes pHs y temperaturas de almacenamiento, con el tiempo.

Temperatura		5°C	25°C	45°C
pH	Días	Betacianinas (mg/L)	Betacianinas (mg/L)	Betacianinas (mg/L)
pH 3,6	0	0,88 ^{A a I} ± 0,01	0,9 ^{A a I} ± 0,1	0,710 ^{A b I} ± 0,001
	1	0,715 ^{B a} ± 0,005	0,758 ^{B b} ± 0,001	0,224 ^{B c} ± 0,002
	2	0,75 ^{C a} ± 0,01	0,693 ^{B b} ± 0,001	0,091 ^{C c} ± 0,001
	3	ND*	0,572 ^{C b} ± 0,001	0,059 ^{D c} ± 0,001
pH 6,3	0	1,34 ^{A a II} ± 0,01	0,90 ^{A b I} ± 0,01	0,83 ^{A c II} ± 0,01
	1	0,778 ^{B a} ± 0,001	0,726 ^{B b} ± 0,001	0,224 ^{B c} ± 0,002
	2	0,767 ^{B a} ± 0,001	0,599 ^{C b} ± 0,001	0,06 ^{C c} ± 0,001
	3	ND*	0,496 ^{D b} ± 0,001	0,06 ^{C c} ± 0,001
pH 8,0	0	1,27 ^{A a III} ± 0,02	0,800 ^{A b I} ± 0,002	0,653 ^{A c III} ± 0,001
	1	0,77 ^{B a} ± 0,06	0,87 ^{B a} ± 0,03	0,11 ^{B b} ± 0,01
	2	0,78 ^{B a} ± 0,02	0,690 ^{C b} ± 0,001	0,036 ^{C c} ± 0,002
	3	0,882 ^{C a} ± 0,001	0,564 ^{D b} ± 0,002	0,061 ^{C c} ± 0,001
	4	0,319 ^{D a} ± 0,001	0,469 ^{E b} ± 0,001	0,054 ^{C c} ± 0,001

* No determinado (ND). Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo al mismo pH. Numero romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día cero entre pHs. Disminución de la concentración de betacianinas al final del almacenamiento: 5°C, pH 3,6 (57%); 5°C, pH 6,3 (73%); 5°C, pH 8,0 (74%); 25°C, pH 3,6 (46%); 25°C, pH 6,3 (51%); 25°C, pH 8,0 (41%); 45°C, pH 3,6 (94%); 45°C, pH 6,3 (93%); 45°C, pH 8,0 (92%).

En la **Tabla 4.2** se muestra la concentración de las betacianinas de las aguas de escaldado del método A. En general, a los distintos pHs se produjo una disminución de la concentración de estos pigmentos a 5°C con el tiempo de almacenamiento. La tendencia a la disminución de la concentración de las betacianinas con el tiempo de almacenamiento también se observó a 25°C y 45°C y el cambio fue más marcado a esta última temperatura. A temperaturas de 5 y de 25 °C disminuyó, entre el 41% y el 74% la concentración inicial de betacianinas al

finalizar el tiempo de almacenamiento y, a 45°C, a partir del primer día, se perdió el pigmento llegando al final del almacenamiento a un decaimiento mayor al 90%, por degradación de estos compuestos (Wybraniec, 2013), lo que muestra el gran efecto de la temperatura en los mismos (Herbach, 2006b).

Con respecto al efecto del pH a cada temperatura, en general, se observó que no existe una tendencia clara. Se puede destacar que el sistema a pH 3,6 mostró, a tiempo inicial de su almacenamiento a 5°C, un valor de concentración de betacianinas inferior que a los otros pHs. Y que, a esa temperatura, la pérdida de betacianinas durante el almacenamiento, fue mayor a pH 8,0 en las aguas de escaldado obtenidas por el método A.

Se puede concluir entonces que la temperatura es un factor de gran influencia en la estabilidad de estos pigmentos pudiendo comprometer el color de las muestras, especialmente a 45°C.

En la **Tabla 4.3** se observa la concentración de betaxantinas en las aguas de escaldado obtenidas por el método A. Se puede concluir que el pH 3,6 determinó una menor concentración de betaxantinas a tiempo inicial de almacenamiento a 5°C, al igual que lo antes comentado para betacianinas. Por otra parte, se observó una disminución en el valor de la concentración de las betaxantinas con el tiempo de almacenamiento a 5°C, 25°C y 45 °C con valores que estuvieron entre 70% y 82%, salvo para las aguas de escaldado del método A con pH 8,0 y almacenadas a 25°C, que presentaron un decaimiento con el tiempo de almacenamiento del

30%. Según Cai & Corke (2001) las betaxantinas muestran una mayor estabilidad a pHs cercanos a 7.

Tabla 4.3. Contenido de betaxantinas en aguas de escaldado de remolacha (método A) a diferentes pHs y temperatura, con el tiempo.

Temperatura		5°C	25°C	45°C
pH 3,6	Dias	Betaxantinas (mg/L)	Betaxantinas (mg/L)	Betaxantinas (mg/L)
	0	1,14 ^{A a I} ± 0,01	1,0 ^{A a I} ± 0,1	0,628 ^{Ab I} ± 0,001
	1	0,85 ^{B a} ± 0,01	0,470 ^{B b} ± 0,001	0,261 ^{B c} ± 0,002
	2	0,84 ^{B a} ± 0,01	0,333 ^{C b} ± 0,001	0,176 ^{C c} ± 0,001
	3	0,765 ^{C a} ± 0,004	0,274 ^{C b} ± 0,001	0,153 ^{D c} ± 0,004
pH 6,3	4	0,338 ^{D a I} ± 0,001	0,266 ^{C b I} ± 0,003	0,128 ^{E 1c} ± 0,001
	0	1,77 ^{A a II} ± 0,04	0,628 ^{A b II} ± 0,001	0,7 ^{A b} ± 0,2 ^I
	1	0,99 ^{B a} ± 0,02	0,261 ^{B b} ± 0,002	0,28 ^{B b} ± 0,01
	2	0,99 ^{B a} ± 0,01	0,176 ^{C b} ± 0,001	0,143 ^{B c} ± 0,001
	3	0,871 ^{C a} ± 0,001	0,153 ^{D b} ± 0,004	0,126 ^{B c} ± 0,006
pH 8,0	4	0,427 ^{D a 2} ± 0,001	0,128 ^{E b 2} ± 0,001	0,124 ^{B c} ± 0,001 ²
	0	1,64 ^{A a III} ± 0,04	0,881 ^{A b III} ± 0,002	0,514 ^{A c} ± 0,001 ^I
	1	0,848 ^{B a} ± 0,004	0,565 ^{B b} ± 0,001	0,166 ^{B c} ± 0,0005
	2	0,86 ^{B a} ± 0,03	0,737 ^{C b} ± 0,001	0,090 ^{C c} ± 0,006
	3	0,667 ^{C a} ± 0,001	0,666 ^{D a} ± 0,001	0,116 ^{D b} ± 0,001
4	0,314 ^{D a 3} ± 0,001	0,615 ^{E b 3} ± 0,002	0,110 ^{D c 3} ± 0,001	

Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. . Numero romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre pHs. Disminución de la concentración de betaxantinas al final del almacenamiento: 5°C, pH 3,6 (70%); 5°C, pH 6,3 (75%); 5°C, pH 8,0 (81%); 25°C, pH 3,6 (73%); 25°C, pH 6,3 (79%); 25°C, pH 8,0 (30%); 45°C, pH 3,6 (79%); 45°C, pH 6,3 (82%); 45°C, pH 8,0 (78%).

En la **Tabla 4.4** se observa la concentración de betacianinas para las aguas de escaldado remanentes de la aplicación del método B. La concentración para estas aguas fue mayor que para aquéllas resultantes de la aplicación del método A, probablemente por la relación sólido a líquido usada en el método B. La variación de la concentración a cada pH y temperatura con el tiempo de almacenamiento mostró una disminución de la cantidad de betacianinas

presentes. Esta disminución fue más marcada a las temperaturas más altas. Herbach et al. (2006b) informaron que las betalaínas poseen su máxima estabilidad a bajas temperaturas tales como las de refrigeración y/o congelación. Saguy (1979) y Cai et al. (1998) informaron que la degradación de las soluciones de betalaínas era mayor a medida que aumentaba la temperatura.

Tabla 4.4. Contenido de betacianinas en aguas de escaldado de remolacha del método B a diferentes pHs y temperatura, con el tiempo.

Temperatura		5°C	25°C	45°C	
pH	Días	Betacianinas (mg/L)	Betacianinas (mg/L)	Betacianinas (mg/L)	
	0	5,58 ^{A al} ± 0,02	5,42 ^{A bl} ± 0,05	5,31 ^{A cl} ± 0,03	
	1	5,34 ^{B a} ± 0,01	5,9 ^{B b} ± 0,2	2,5 ^{B c} ± 0,1	
	pH 3,6	2	5,6 ^{A a} ± 0,1	5,54 ^a ± 0,03	0,83 ^{C b} ± 0,01
		3	ND*	ND*	0,495 ^{D c} ± 0,001
4	3,887 ^{D a1} ± 0,001	4,46 ^{D b1} ± 0,01	0,344 ^{E c1} ± 0,003		
pH 6,3	0	5,56 ^{A al} ± 0,01	5,45 ^{A al} ± 0,01	5,0 ^{A bl1} ± 0,1	
	1	5,18 ^{B a} ± 0,05	4,462 ^{B b} ± 0,002	1,46 ^{B c} ± 0,01	
	2	5,2 ^{B a} ± 0,1	3,81 ^{C b} ± 0,03	0,28 ^{C c} ± 0,01	
	3	ND*	ND*	0,197 ^{C c} ± 0,002	
	4	3,1 ^{D a2} ± 0,1	2,9 ^{E 7a2} ± 0,02	0,170 ^{C b2} ± 0,001	
pH 8,0	0	5,3 ^{A al} ± 0,3	5,1 ^{A al1} ± 0,2	3,86 ^{A bl1} ± 0,02	
	1	4,94 ^{AB a} ± 0,01	3,14 ^{B b} ± 0,04	0,39 ^{B c} ± 0,01	
	2	4,7 ^{B a} ± 0,1	2,7 ^{C b} ± 0,1	0,241 ^{C c} ± 0,002	
	3	ND*	1,88 ^{D b} ± 0,02	0,170 ^{D c} ± 0,001	
	4	2,704 ^{D a3} ± 0,003	1,920 ^{D b3} ± 0,005	0,174 ^{D c2} ± 0,003	

* No determinado (ND). Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre pHs. Disminución de la concentración de betacianinas al final del almacenamiento: 5°C, pH 3,6 (30%); 5°C, pH 6,3 (44%); 5°C, pH 8,0 (49%); 25°C, pH 3,6 (17%); 25°C, pH 6,3 (45%); 25°C, pH 8,0 (62%); 45°C, pH 3,6 (94%); 45°C, pH 6,3 (97%); 45°C, pH 8,0 (95%).

A 5°C y 25°C se observó una mayor degradación a pH 6,3 y 8,0 (44% - 62%); a 45 °C, la degradación para los tres pHs osciló entre 94 y 97%. Por lo tanto,

hubo una menor degradación, en general, a pH 3,6. Herbach et al. (2006b) informaron que la mayor estabilidad de las betacianinas de jugo de pitaya (*Hylocereus*) se obtenía cuando el jugo era calentado a 85 °C a pH 4,0 comparado con el calentamiento a pH 6,0.

La alta temperatura puede promover la desaparición de la estructura de resonancia de los pigmentos responsables de impartir el color rojo que exhiben las aguas de escaldado, conduciendo a la degradación de los mismos (Herbach et al., 2007; Stintzing & Carle, 2007; Manchali, Murthy, Nagaraju & Neelwarne, 2013).

La concentración de las betaxantinas en las aguas de escaldado del método B (**Tabla 4.5**) fue mayor que las del método A. A cada pH se produjo una disminución significativa de la concentración con el tiempo. La pérdida osciló entre 52 y 90% y se incrementó, en general, con la temperatura. Se destaca que a pH de 6,3 (90%) y 8,0 (84%), se observó la mayor pérdida a temperatura de 45°C. Las betaxantinas tales como la indicaxantina, han mostrado su sensibilidad al tratamiento térmico a pHs que van de 5 a 6, dando lugar a reacciones de isomerización, así como a separación del ácido betalámico y el aminoácido. También se ha informado que puede ocurrir formación *de novo* de indicaxantina a partir de estos últimos compuestos (Stintzing & Carle, 2007; Manchali et al., 2013). Saguy (1979) y Saguy et al. (1984) informaron que la vulgaxantina I en jugo de remolacha a pHs entre 4,8 y 6,2 podía sufrir oxidación cuando sometida a calentamiento entre 61,5° C y 85,5° C.

Tabla 4.5. Contenido de betaxantinas en aguas de escaldado de remolacha (método B) a diferentes pHs y temperatura, con el tiempo.

Temperatura		5°C		25°C		45°C	
pH	Dias	Betaxantinas (mg/L)		Betaxantinas (mg/L)		Betaxantinas (mg/L)	
pH 3,6	0	5,15 ^{A al}	± 0,02	4,51 ^{A bl}	± 0,03	3,189 ^{Ac l}	± 0,004
	1	4,26 ^{B a}	± 0,01	2,48 ^{B b}	± 0,04	2,8 ^{B c}	± 0,2
	2	4,05 ^{B a}	± 0,05	1,97 ^{C b}	± 0,01	1,19 ^{C c}	± 0,01
	3	ND*		ND*		0,929 ^{D c}	± 0,001
	4	2,285 ^{D a}	± 0,003	1,804 ^{E b}	± 0,001	0,749 ^{Dc}	± 0,002
pH 6,3	0	5,43 ^{A all}	± 0,01	5,14 ^{A bli}	± 0,02	4,42 ^{A cll}	± 0,02
	1	4,8 ^{B a}	± 0,1	3,49 ^{B b}	± 0,01	3,69 ^{B c}	± 0,01
	2	4,6 ^{B a}	± 0,1	2,93 ^{C b}	± 0,01	0,66 ^{C c}	± 0,01
	3	ND*		ND*		0,463 ^{D c}	± 0,002
	4	2,6 ^{D a}	± 0,1	2,11 ^{E b}	± 0,02	0,424 ^{Ec}	± 0,002
pH 8,0	0	4,9 ^{A alll}	± 0,1	4,4 ^{A bli}	± 0,3	2,55 ^{A clll}	± 0,01
	1	4,020 ^{B a}	± 0,004	2,1 ^{BC b}	± 0,1	2,4 ^{B c}	± 0,1
	2	3,74 ^{C a}	± 0,02	1,78 ^{B b}	± 0,03	0,471 ^{C c}	± 0,001
	3	ND*		2,2 ^{C 2b}	± 0,01	0,378 ^{C c}	± 0,007
	4	1,90 ^{E a}	± 0,01	1,360 ^{D b}	± 0,002	0,406 ^{Cc}	± 0,001

* No determinado (ND). Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. . Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre pHs. Disminución de la concentración de betaxantinas al final del almacenamiento: 5°C, pH 3,6 (56%); 5°C, pH 6,3 (52%); 5°C, pH 8,0 (61%); 25°C, pH 3,6 (60%); 25°C, pH 6,3 (59%); 25°C, pH 8,0 (69%); 45°C, pH 3,6 (76%); 45°C, pH 6,3 (90%); 45°C, pH 8,0 (84%).

Varios estudios informaron una estabilidad mayor de las betacianinas en comparación con las betaxantinas a temperatura ambiente (Sapers & Hornstein 1979), así como en tratamientos térmicos (Aronoff & Aronoff 1948; Herbach et al 2004). Por ejemplo, la vida media de la betanina tratada térmicamente fue 11 veces mayor a la de la vulgaxantina I de acuerdo con Singer & von Elbe (1980). En el presente trabajo se observó esta misma tendencia en algunas condiciones

tanto para las aguas provenientes de la aplicación del método A como para aquellas proveniente del método B.

4.2.3.3. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los parámetros de color de las aguas de escaldado

En la **Tabla 4.6** y **4.7** se muestra la evolución con el tiempo, del color de las aguas de escaldado remanentes de la aplicación del método A y método B, a los distintos pHs y temperatura de 5°C. Para ello se informan los parámetros de color CIELab (L^* , a^* , b^* , C^* y $h^{°*}$). Es de destacar que las aguas de escaldado provenientes de la aplicación del método B, en general, presentaron menores valores de L^* y mayores valores de C^* que aquéllas provenientes de la aplicación del método A, por la mayor concentración de pigmentos de las primeras.

Se observa en las **Tablas 4.6 y 4.7** que la luminosidad no cambió apreciablemente con el tiempo a todos los pHs. En general el parámetro a^* tuvo una tendencia a disminuir con el tiempo para las aguas del método A, a pH 8,0. Para las aguas del método B, a pH 8,0, a^* disminuyó para los mayores tiempos de almacenamiento. El parámetro b^* disminuyó con el tiempo para las aguas del método A y, especialmente, a pH 3,6. Para las aguas del método B, el parámetro b^* decreció marcadamente a pH 3,6. El parámetro de tono ($h^{°*}$) fue afectado a pH 3,6 para las aguas de ambos métodos mostrando una disminución lo cual implica un corrimiento hacia los rosas y a pH 8,0, para las aguas del método A y B, se observó un aumento con desplazamiento hacia el anaranjado. Los valores del

chroma (C*) disminuyeron con el tiempo, especialmente a pH 8,0 para las aguas del método A, mostrando una menor saturación.

Tabla 4.6. Parámetros CIELab de las aguas de escaldado de remolacha (método A) sometidas a distintos pHs y almacenadas a 5°C.

pH	Días	L*	a*	b*	C*	h°*
3,6	0	44,7 ^{AI} ± 0,3	23,720 ^{AI} ± 0,005	11,2 ^{AI} ± 0,6	26,2 ^{AI} ± 0,1	25,2 ^{AI} ± 0,1
	1	46 ^A ± 3	23,7 ^A ± 0,5	8 ^A ± 2	25 ^A ± 6	19,2 ^B ± 0,2
	2	46,7 ^A ± 0,6	21 ^A ± 5	5 ^B ± 1	21 ^A ± 5	13,8 ^C ± 0,3
	3	40 ^A ± 3	18 ^A ± 4	2,3 ^C ± 0,8	18 ^A ± 4	7,4 ^D ± 0,6
	4	49 ^{B1} ± 3	18 ^{A1} ± 1	1,4 ^{D1} ± 0,3	18 ^{A1} ± 5	4,4 ^{E1} ± 0,1
6,3	0	49	20	10	22	27
	1	43	31	17	36	29
	2	50	15	7	16	27
	3	59	12	7	14	30
	4	46	20	10	22	28
8,0	0	46 ^{AI} ± 1	16 ^{AI} ± 4	9 ^{AI} ± 2	19 ^{AI} ± 5	30,6 ^{AI} ± 0,1
	1	43 ^A ± 4	16 ^A ± 1	10 ^A ± 2	19 ^A ± 4	30,7 ^A ± 0,3
	2	48 ^A ± 5	5,2 ^B ± 0,5	4,6 ^A ± 0,8	6,9 ^B ± 0,9	40 ^B ± 2
	3	53,4 ^A ± 0,6	4,5 ^B ± 1	6,8 ^A ± 0,9	8 ^B ± 1	57 ^C ± 1
	4	41 ^{B1} ± 1	8,1 ^{B1} ± 0,1	8,2 ^{A1} ± 0,3	11,4 ^{A1} ± 0,2	45 ^{D1} ± 1

Valor promedio y desviación estándar (n=2) para pH 3,6 y 8,0. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo. Numero romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre pHs. Numero diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cuatro entre pHs.

Tabla 4.7. Parámetros CIELab de las aguas de escaldado de remolacha (método B) sometidas a distintos pHs y almacenadas a 5°C.

pH	Días	L*		a*		b*		C*		h°*	
3,6	0	24,1 ^{AI}	± 0,4	52,3 ^{ABI}	± 0,6	36,9 ^{A1}	± 0,8	64 ^{AI}	± 1	35,2 ^{AI}	± 0,3
	1	24,2 ^A	± 0,9	51 ^{AC}	± 1	32 ^A	± 4	61 ^A	± 3	32 ^A	± 2
	2	26,4 ^A	± 0,3	49 ^A	± 0,2	19,5 ^B	± 0,6	53,6 ^B	± 0,5	21,3 ^B	± 0,6
	3	25 ^A	± 1	53 ^{BC}	± 1	33 ^A	± 4	62 ^A	± 1	31 ^A	± 3
	4	29 ^{B1}	± 1	47 ^{D1}	± 1	8 ^{C1}	± 2	48 ^{B1}	± 2	10 ^{C1}	± 2
6,3	0	25		52		37		64		36	
	1	24		50		34		60		35	
	2	28		49		29		57		31	
	3	25		53		35		64		33	
	4	28		52		20		55		21	
8,0	0	25 ^{ACI}	± 2	40 ^{AI}	± 1	19 ^{AI}	± 2	45 ^{AI}	± 2	26 ^{AI}	± 1
	1	17,4 ^B	± 0,1	44,8 ^B	± 0,7	29,8 ^B	± 0,3	53,7 ^A	± 0,8	33,7 ^B	± 0,2
	2	23,1 ^{AB}	± 0,5	43 ^{AB}	± 1	33 ^{BC}	± 1	54,6 ^A	± 0,4	38 ^B	± 2
	3	20 ^{BC}	± 3	41 ^A	± 1	32 ^{BC}	± 1	52,7 ^A	± 0,1	38 ^B	± 2
	4	26,9 ^{AD2}	± 0,7	33,2 ^{C2}	± 0,2	24 ^{AB2}	± 4	41,5 ^{A2}	± 3	36,5 ^{B2}	± 0,2

Valor promedio y desviación estándar (n=2) para pH 3,6 y 8,0. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo. Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre pHs. Número diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cuatro entre pHs.

Es de destacar que a los mayores tiempos de almacenamiento y a 25°C, las aguas de escaldado del método B para pH 8,0 y las del método A a pH 3,6, presentaron un aumento de la luminosidad y ello podría atribuirse a la fuerte disminución del parámetro a* o b*, como comentaremos más adelante (**Tabla 4,8 y 4,9**).

Tabla 4.8. Parámetros CIELab de las aguas de escaldado de remolacha (método A) a distintos pHs y almacenadas a 25°C.

pH	Días	L*	a*	b*	C*	h°*
3,6	0	48,4 ^{AI} ± 0,4	20 ^{AI} ± 1	13,9 ^{AI} ± 0,4	24 ^{ABI} ± 1	35 ^{AI} ± 0,9
	1	53,3 ^B ± 1	22 ^A ± 2	3,3 ^B ± 0,4	22 ^A ± 2	8,53 ^B ± 0,01
	2	46 ^A ± 2	33 ^B ± 1	-1,42 ^{CD} ± 0,04	33 ^B ± 1	357 ^C ± 1
	3	ND*	26 ^A ± 4	-2,1 ^C ± 0,2	26 ^{AB} ± 4	355,8 ^C ± 0,2
	4	51 ^{B1} ± 1	21,6 ^{A1} ± 0,9	-0,4 ^{D1} ± 0,4	26 ^{AB1} ± 2	358,52 ^{C1} ± 0,06
6,3	0	49	16	12	20	37
	1	39	18	13	22	35
	2	51	10	9	13	43
	3	50	9	9	13	45
	4	55	4	6	7	52
8,0	0	49,9 ^{AI} ± 0,5	10 ^{AI} ± 4	9,8 ^{ABII} ± 0,4	13 ^{ABII} ± 1	41,0 ^{AI} ± 0,9
	1	42,0 ^B ± 0,7	10,0 ^A ± 0,4	13,7 ^A ± 0,7	16,9 ^A ± 0,4	53 ^B ± 2
	2	46,2 ^A ± 0,3	0,7 ^B ± 0,3	5,6 ^B ± 0,1	5,68 ^B ± 0,1	82 ^C ± 3
	3	48 ^A ± 2	-1,3 ^B ± 0,1	10 ^{AB} ± 4	11 ^{AB} ± 4	97 ^D ± 1
	4	46,7 ^{A1} ± 0,6	-2,4 ^{B2} ± 0,1	8,2 ^{AB2} ± 0,6	6,8 ^{B2} ± 0,7	107 ^{E2} ± 1

* No determinado (ND). Valor promedio y desviación estándar (n=2) para pH 3,6 y 8,0. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo. Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día cero entre pHs. Número diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día cuatro entre pHs.

El aumento del pH sobre las aguas de escaldado de los métodos A y B a 25 °C, afectó los parámetros a* y b*. Cuando cambió el pH de 3,6 a 8,0 los valores de estos parámetros tendieron a disminuir a tiempo cero y de manera significativa para las aguas del método A. Se observó que a pH 3,6 para los dos métodos de escaldado, los valores de a* se mantuvieron constantes durante el tiempo de almacenamiento (aguas del método A) o disminuyeron sólo para los 4 días de almacenamiento (aguas del método B). A pH 6,3 y 8,0, los valores de a* disminuyeron para ambas aguas estudiadas.

Tabla 4.9. Parámetros CIELab de las aguas de escaldado de remolacha (método B) sometidas a distintos pHs y almacenadas 25°C.

pH	Días	L*		a*		b*		C*		h°*	
3,6	0	26,2 ^{AI}	± 0,1	51,4 ^{AI}	± 0,2	33,8 ^{AI}	± 0,8	61,5 ^{AI}	± 0,6	33,36 ^{AI}	± 0,01
	1	25 ^A	± 2	53,2 ^A	± 0,4	22 ^A	± 4	57,9 ^A	± 2	23 ^B	± 3
	2	25 ^A	± 1	55,9 ^A	± 0,9	17,7 ^B	± 0,3	58,6 ^A	± 1	17,57 ^C	± 0,02
	3	28 ^A	± 2	52,0 ^A	± 0,7	5,4 ^C	± 0,2	52,3 ^A	± 0,8	5,9 ^D	± 0,2
	4	28 ^{A1}	± 4	43 ^{B1}	± 1	-0,4 ^{D1}	± 0,3	43,3 ^{B1}	± 1	359,5 ^{E1}	± 0,3
6,3	0	25		53		38		64		36	
	1	23		46		34		57		37	
	2	25		50		43		66		41	
	3	31		38		22		44		30	
	4	30		38		22		44		30	
8,0	0	24 ^{AI}	± 4	46 ^{AI}	± 3	31 ^{AI}	± 1	56 ^{AI}	± 3	34,2 ^{AI}	± 0,7
	1	17,1 ^B	± 0,6	37,7 ^B	± 0,6	28,9 ^A	± 0,5	47,5 ^A	± 0,2	37,5 ^A	± 0,9
	2	37,2 ^C	± 0,4	22 ^C	± 1	33 ^A	± 3	46 ^A	± 3	46,3 ^B	± 0,5
	3	38 ^C	± 2	17 ^C	± 2	31,5 ^A	± 0,2	35,9 ^B	± 0,9	61 ^C	± 3
	4	33 ^{C1}	± 4	7,6 ^{D2}	± 0,1	48 ^{B2}	± 2	49 ^{A2}	± 2	81,1 ^{D2}	± 0,2

* No determinado (ND). Valor promedio y desviación estándar (n=2) para pH 3,6 y 8,0. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo. Numero romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día cero entre pHs. Numero diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día cuatro entre pHs.

Por otro lado, los valores de b^* disminuyeron rápidamente para pH 3,6 y 6,3 después del primer día de almacenamiento (aguas del método A y B) lo que significa que las betaxantinas de color amarillo fueron afectadas a estos pHs. De esta manera se confirmaría que las betacianinas de color rojo son más estables a pHs bajos. El parámetro b^* no presentó una tendencia clara con el tiempo a pH 8,0 para las aguas del método A o aumentó recién a los 4 días de almacenamiento en el caso de las aguas del método B (**Tabla 4,8 y 4,9**).

A pH 6,3, el ángulo de tono mostró que las aguas del método A y B tendieron al color rosa-rojo o rojo-anaranjado. A pH 3,6 tendieron a los colores

púrpura-rosa o rosa y, a 8,0, el color se desplazó hacia el amarillo verde o amarillo con el almacenamiento a 25°C. El valor del croma muestra que, en general, la saturación disminuye con el tiempo de almacenamiento.

Tabla 4.10. Parámetros CIELab de las aguas de escaldado de remolacha (método A) sometidas a distintos pHs y almacenadas 45°C.

pH	Días	L*	a*	b*	C*	h°*
3,6	0	48 ^{AI} ± 3	17 ^{AI} ± 1	7,640 ^{AI} ± 0,007	19 ^{AI} ± 1	23 ^{AI} ± 1
	1	54 ^B ± 3	0,5 ^B ± 0,4	3,1 ^B ± 0,3	3,2 ^B ± 0,3	80 ^B ± 1
	2	53 ^B ± 2	2,4 ^C ± 0,3	5,0 ^C ± 0,6	5,5 ^B ± 0,4	64 ^C ± 5
	3	52 ^B ± 1	-2,3 ^D ± 0,7	5,9 ^C ± 0,1	8,3 ^B ± 5	111 ^D ± 1
	4	54 ^{C1} ± 1	-2,9 ^{D1} ± 0,1	5 ^{C1} ± 1	5 ^{B1} ± 1	120 ^{D1} ± 1
6,3	0	50,07	11,41	10,28	15,36	42,02
	1	55,22	-1,82	8,32	8,52	102
	2	58,93	-1,66	6,41	6,62	104
	3	48,01	-2,25	4,75	5,26	115
	4	58,15	-2,7	5,34	5,98	116
8,0	0	40 ^{All} ± 3	4,6 ^{All} ± 0,6	5,7 ^{AI} ± 0,2	7,3 ^{All} ± 0,6	51 ^{All} ± 1
	1	52 ^{BC} ± 1	-2,8 ^B ± 0,6	7 ^B ± 1	7 ^B ± 1	112 ^B ± 2
	2	56 ^{BD} ± 3	-2,7 ^B ± 0,8	7,70 ^B ± 0,01	8,2 ^B ± 0,5	109 ^B ± 1
	3	48,3 ^C ± 0,4	-2,2 ^B ± 0,1	3,4 ^C ± 0,1	4,0 ^C ± 0,1	123 ^B ± 2
	4	60 ^{D2} ± 1	-2,9 ^{B1} ± 0,5	8,4 ^{B1} ± 0,3	8,9 ^{B2} ± 0,4	109 ^{B2} ± 4

* No determinado (ND). Valor promedio y desviación estándar (n=2) para pH 3,6 y 8,0. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo. Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre pHs. Número diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cuatro entre pHs.

En las **Tablas 4.10** y **4.11** se muestran los valores de los parámetros CIELab de las aguas de escaldado del método A y B almacenados a 45 °C. Se observa, para los dos métodos, que los valores de luminosidad aumentaron durante el tiempo de almacenamiento por efecto de la temperatura. Los valores de a* disminuyeron fuertemente, para ambas aguas, a partir del primer día de almacenamiento viéndose, en general, la pérdida de los rojos y llegando en

algunos casos a valores negativos del parámetro a^* , cercano a los verdes. El parámetro b^* disminuyó, en general, alterando los amarillos salvo para las aguas de escaldado del método B a pH 3,6 en que se vió un aumento y, para las aguas del método A a pH 8,0 donde se observó que los valores aumentaron volviéndose más pronunciado el amarillo después del segundo día de almacenamiento. Ello podría deberse a la ocurrencia de pardeamiento (pH básico) y/o a la deglicosilación de los pigmentos (pHs ácidos o básicos) seguida de oxidación lo cual puede determinar la aparición de pigmentos marrones, (Stintzing & Carle, 2004).

Tabla 4.11. Parámetros CIELab de las aguas de escaldado de remolacha (método B) sometidas a distintos pHs y almacenadas 45°C.

pH	Días	L*		a*		b*		C*		h°*	
3,6	0	30 ^{AI}	± 3	45 ^{AI}	± 4	17 ^{AI}	± 1	48 ^{AI}	± 1	21 ^{AI}	± 3
	1	35 ^A	± 3	55 ^A	± 2	15 ^A	± 1	57 ^B	± 2	15 ^A	± 1
	2	42 ^{AB}	± 5	25 ^B	± 1	45 ^B	± 4	43 ^A	± 2	34 ^B	± 4
	3	52 ^B	± 1	14 ^C	± 2	46 ^B	± 1	47 ^A	± 1	1,3 ^C	± 0,1
	4	48 ^{B1}	± 2	13 ^{C1}	± 3	49 ^{B1}	± 1	56 ^{B1}	± 2	1,27 ^{C1}	± 0,03
6,3	0	24,33		53,2		42,92		68,3		38,94	
	1	44,15		10,4		30,51		32,2		71,33	
	2	54,57		-3,8		17,54		17,9		102	
	3	53,38		-2,65		13,39		13,5		101	
	4	52,08		-0,94		23,11		23,1		92	
8,0	0	18 ^{All}	± 1	16,9 ^{All}	± 0,4	54 ^{All}	± 3	45 ^{AI}	± 5	30,9 ^{All}	± 0,8
	1	49 ^B	± 1	0,6 ^B	± 0,8	16 ^B	± 3	16 ^B	± 3	87 ^B	± 2
	2	45 ^C	± 1	-2,7 ^C	± 0,8	15 ^B	± 1	15 ^B	± 1	100 ^C	± 1
	3	51,8 ^B	± 0,4	-1,6 ^{BC}	± 0,3	14 ^B	± 1	14 ^B	± 1	97 ^D	± 1
	4	51,5 ^{B1}	± 0,2	-0,8 ^{BC2}	± 0,3	21 ^{B2}	± 1	21 ^{B2}	± 1	92 ^{D2}	± 1

* No determinado (ND). Valor promedio y desviación estándar (n=2) para pH 3,6 y 8,0. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo. Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día cero entre pHs. Número diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día cuatro entre pHs.

En términos generales, la saturación de color (C^*) disminuyó con el tiempo de almacenamiento por efecto de la temperatura y el cambio de pH para las aguas obtenidas a partir de la aplicación de los dos métodos de escaldado, pero a pH 3,6 en las aguas del método B, los valores se mantuvieron aproximadamente constantes.

La tonalidad (Hue), para las aguas de resultantes de la aplicación del método A y del B, mostró que se produce un cambio de color desde los rosas-rojos hacia el amarillo-verde durante el almacenamiento a 45°C, salvo para las aguas del método B a pH 3,6, en las cuales se observó que persiste el color luego del almacenamiento.

4.2.3.4. Análisis fotográfico de las aguas de escaldado almacenadas a los distintos pHs y temperaturas

En las **Figuras 4.7** y **4.8** se visualiza fotográficamente la influencia que tiene el pH y la temperatura sobre la estabilidad del color de las aguas de escaldado resultantes de la aplicación de los métodos A y B. Se observa que las aguas de escaldado del método A mostraron menor intensidad de color debido a la más baja relación que existe entre remolacha y agua para este método.

En la **Figura 4.7** se observa que las aguas de escaldado del método A, a temperatura de 5°C, mantuvieron el color rojo con poca variación. Esto está acorde con los resultados de los parámetros de color antes comentados. Cuando las aguas son almacenadas a temperatura de 25°C, se puede apreciar que el pH afectó la estabilidad del color a lo largo del tiempo, visualizándose a pH 3,6 que el

color rojo se mantuvo durante el tiempo de almacenamiento. En cambio, cuando el pH es 6,3 y 8,0, después del tercer día, el color cambió hacia los amarillos/marrones. De acuerdo con Cai et al. (2001), el pH óptimo para la estabilidad de las betalaínas en remolacha (*Beta vulgaris* L.), en presencia de oxígeno, se encuentra en valores entre 5,5-5,8, pero las betaxantinas presentan una estabilidad ligeramente mayor a valores de pH entre 4,0 y 7,0. Savolainen & Kuusi (1978) informaron que las betacianinas poseen una mayor estabilidad a un pH de 5,5.

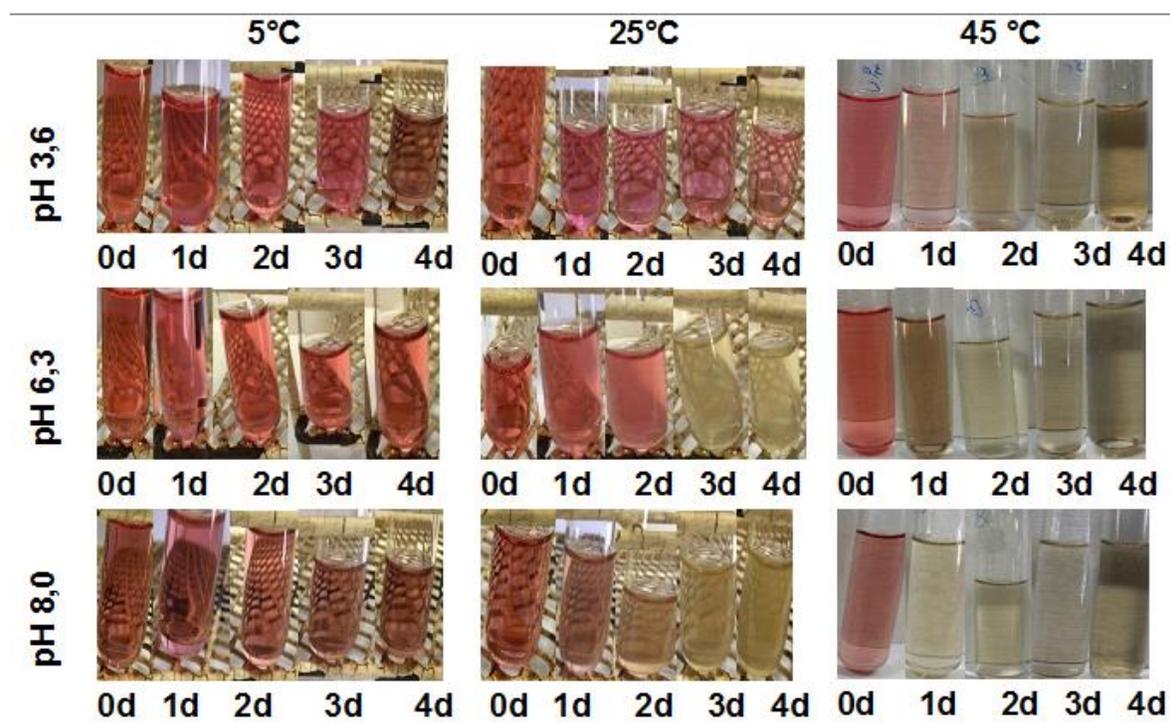


Figura 4.7. Visualización del color de las aguas de escaldado de la remolacha (método A) con diferentes pHs y sometidas a distintas temperaturas.

La temperatura influyó en la estabilidad del color de las aguas de escaldado, observándose ya la pérdida de color después del primer día de almacenamiento a 45 °C, transformándose durante los días posteriores a colores

más pardos y, con ello, el oscurecimiento al final del almacenamiento. Es importante destacar que las betalaínas pueden sufrir reacciones de pardeamiento y que las aguas de escaldado pueden contener azúcares pasibles de sufrir pardeamiento con el consiguiente efecto sobre el color.

En la **Figura 4.8** se observan las aguas de escaldado del método B. A temperatura de 5 °C y 25 °C, las muestras mantuvieron su color rosa-rojo a pH 3,6 y 6,3, en general, durante el tiempo de almacenamiento.

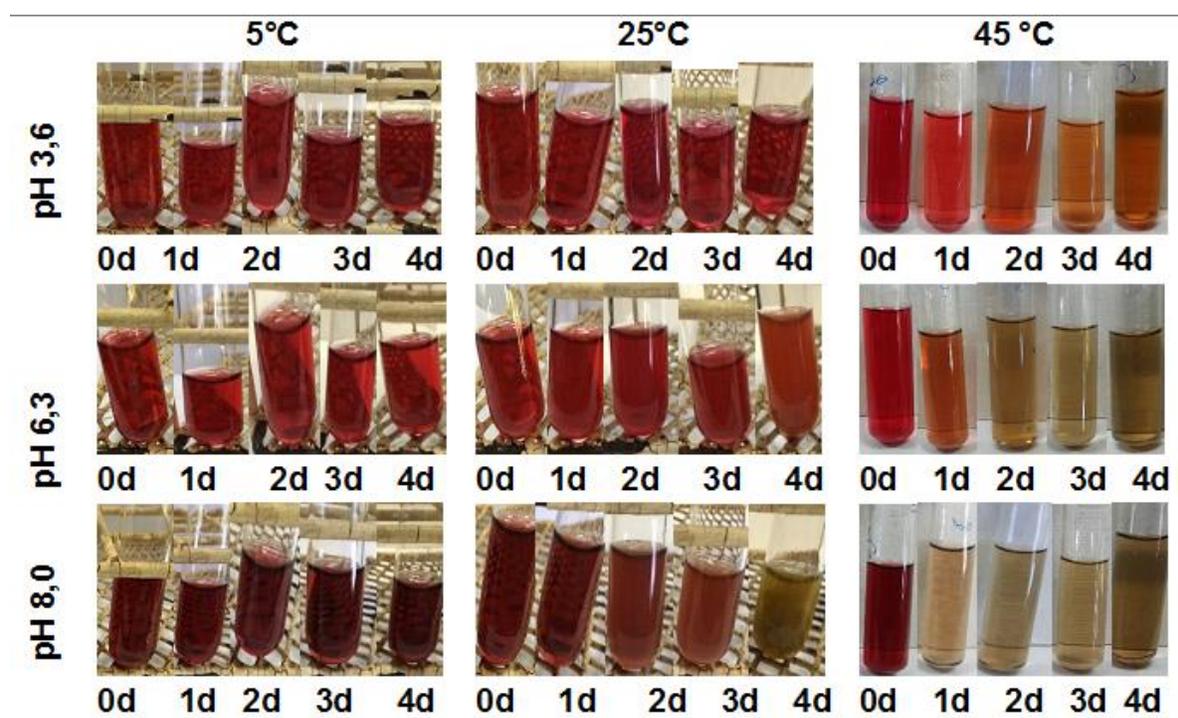


Figura 4.8. Visualización del color de las aguas de escaldado de la remolacha (método B) con diferentes pHs y sometidas a diferentes temperaturas.

En las muestras a pH 8,0 y almacenadas a 5 y 25 °C, en general, el color rojo se vió afectado cambiando hacia los colores amarillos y oscureciéndose. Este mismo comportamiento se vió en las aguas de escaldado del método A y el

cambio de color coincide con el decrecimiento del parámetro a^* así como con la disminución del contenido de betacianinas ya informado para este sistema.

El comportamiento del color a 45 °C fue similar a lo comentado para las temperaturas de 5°C y 25°C en los primeros días, pero a todos los pHs se vió un cambio de color a partir del segundo día. Esto se acentuó a pHs 6,3 y 8,0, observándose cambios hacia el amarillo así como aparición de otros colores los últimos días de almacenamiento.

La intensificación del color amarillo ha sido atribuida a distintas reacciones de degradación. De acuerdo con Sánchez-González, Fonseca, Martínez & Zepeda (2013), a pHs ácidos podría ocurrir una hidrólisis catalizada por la temperatura donde la betanina (roja) podría dar lugar a ácido betalámico (amarillo- naranja), con máxima absorbancia a 410 nm y productos intermedios como el *ciclo* Dopa-5-O-glucósido incoloro como se observa en la **Figura 4.9**.

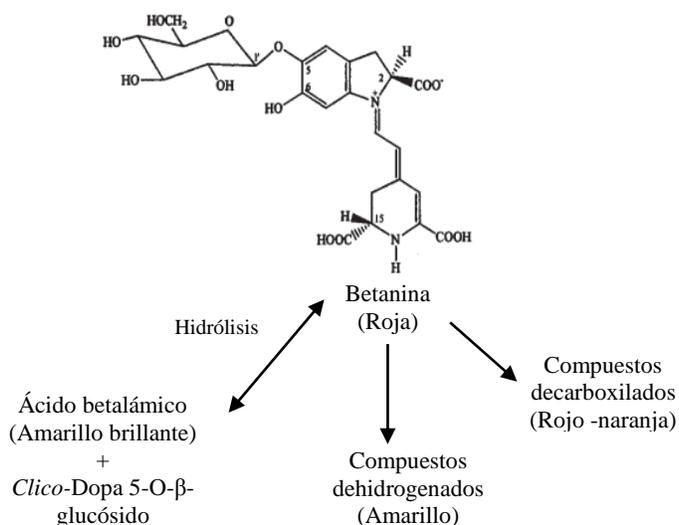


Figura 4.9. Etapas iniciales de la degradación térmica de betanina (Herbach et al., 2004).

Herbach et al. (2004) informaron que en tratamientos térmicos y condiciones aeróbicas, en jugos de remolacha roja ocurre la degradación de betacianinas de color rojo y se forman compuestos degradados de betacianinas de color amarillo, siendo la deshidrogenación la responsable de este fenómeno y que la decarboxilación conducía a colores rojo-naranja. Alard et al. (1985) y Kujala et al. (2001) informaron la posible formación de neobetanina a partir de la betanina, en remolacha rojas y, a través de una reacción de deshidrogenación (**Figura 4.9**). Herbach (2006b) informó la formación *de novo* de betaxantinas a partir de betacianinas.

Havlíková, Miková & Kyzlink (1983), Herbach et al. (2007), Saguy et al. (1978) y Reshmi, Aravindhan & Suganyadavi (2012) informaron que la concentración de betalaínas disminuye con el aumento de la temperatura de proceso y/o almacenamiento.

Herbach et al. (2005) reportaron el comportamiento de extractos de betalaína de pitaya púrpura (*Hylocereus polyrhizus*) en función del tiempo, para muestras que se mantuvieron a un pH constante de 5,0, en ausencia de luz y con temperaturas de 4, 25 y 68 °C, concluyendo que la temperatura fue una variable clave en cuanto al porcentaje del pigmento retenido. Así, la temperatura de 4 °C permitió mantener la estabilidad de los pigmentos pero a temperaturas de 25 y 68 °C, las muestras perdieron la coloración roja a expensas de un color amarillo.

4.2.4. Conclusiones parciales sobre la estabilidad frente al pH y la temperatura, de las betalainas presentes en las aguas de escaldado de remolacha

Cuando las aguas de escaldado fueron almacenadas a temperatura de 5°C, en general, mantuvieron el color rojo con poca variación en los parámetros de color. Es de destacar que el parámetro b* a pH 3,6 y el parámetro a* a pH 8,0 presentaron una tendencia a disminuir con el tiempo de almacenamiento. Coincidentemente, a esta temperatura, las betacianinas y betaxantinas tuvieron las menores variaciones de concentración y las imágenes fotográficas mostraron un color rosa-rojo.

A 25 °C, de acuerdo al pH de las muestras se observaron cambios en el parámetro a* (pH 8,0) o en el parámetro b* (pH 3,6). Se observó una mayor degradación de betacianinas a esta temperatura y las imágenes fotográficas mostraron desaparición del color rojo y aparición de color amarillo.

A 45 °C, las concentraciones de las betacianinas y betaxantinas cayeron muy rápidamente y se observaron cambios en los parámetros a* y b* a los 3 pHs evaluados. Las imágenes fotográficas mostraron pérdidas de color rojo con aparición de amarillos así como otros colores más oscuros, hacia el final del almacenamiento. Esto se acentuó a pHs de 6,3 y 8,0 y ello se debería a la degradación de los pigmentos, siendo este fenómeno más notable para las aguas de escaldado del método B.

La importante pérdida de pigmentos a 45 °C muestra la labilidad de los mismos. Ello determinaría que sea limitada la aplicación de este subproducto del escaldado de remolacha como tal y marca la necesidad de una protección de los pigmentos para minimizar su degradación a las mayores temperaturas y a los pHs ácidos (degradación mayor de las betaxantinas) o básicos (degradación mayor de betacianinas).

4.3. Estudio de la estabilidad de betalaínas en polvos liofilizados de remolacha (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*)

4.3.1. Análisis de polvos liofilizados

Se evaluó el rendimiento de los polvos y, los mismos fueron caracterizados en cuanto a contenido de humedad, actividad acuosa, contenido de betalaínas y de sólidos de pared celular, color y morfología.

Tabla 4.12. Rendimiento, actividad acuosa y contenido de humedad de los polvos liofilizados de remolacha.

Parámetro	RF ¹	Método A ²	Método B ²
Masa remolacha sin cáscara (g)	804,94	735,66	1614,14
Masa remolacha liofilizada(g)	119,86	73,91	197,94
Rendimiento (%)	15	10	12
a _w	0,41 ^a ±0,07	0,35 ^a ±0,04	0,28 ^a ±0,03
Humedad (%)	7,94 ^a ±0,03	5,91 ^b ±0,05	4,93 ^c ±0,02

¹Ensayo realizado con remolacha fresca sin tratamiento térmico. ² Ensayos de escaldado por las dos técnicas evaluadas. Letras minúsculas diferentes en una misma fila de a_w y humedad (significa que hay diferencias significativas con p< 0,05).

En la **Tabla 4.12** se observa el rendimiento de los polvos obtenidos luego de liofilización a partir de la remolacha fresca (RF) y de la remolacha escaldada por el método A o B.

En el caso de la remolacha escaldada por el método A y método B, la deshidratación de las rodajas dio lugar a un rendimiento de 10 g de polvo por cada 100 g de remolacha escaldada por el método A y un rendimiento de 12 g de polvo por cada 100 g de remolacha escaldada por el método B. En el caso de la remolacha fresca, el rendimiento de polvo fue de 15 g por cada 100 g de remolacha fresca. El rendimiento obtenido de los polvos con tamaño de partícula menor de 105 μm fue de 61-68% (método A y B, respectivamente) y el de partículas mayores de 105 μm fue de 37-31% (método A y B, respectivamente).

Se observa en la **Tabla 4.12** que el contenido de agua en los polvos provenientes de tejidos escaldados fue baja (5-6%). Asimismo, la actividad acuosa fue menor de 0,4, garantizando la estabilidad frente al deterioro (Muggeridge & Clay, 2001) durante el almacenamiento.

4.3.2. **Composición química de los polvos liofilizados de remolacha**

El contenido de proteínas, evaluado en los polvos liofilizados de menor y mayor granulometría, no mostró diferencias significativas entre los métodos A y B de escaldado ni diferencias entre ellos y los obtenidos de tejido de remolacha fresca (RF) (**Tabla 4.13**), observándose valores entre 9 y 10 g / 100 g de polvo. Algunas proteínas solubles en agua, las que están débilmente unidas a la matriz de la pared celular (Fry, 1986), podrían haber sido eliminadas durante el escaldado, pero sin embargo no se detectaron diferencias significativas.

Tabla 4.13. Composición química de los polvos liofilizados de remolacha.

Mayor a 105 µm de granulometría.			
	RF ¹	Método A ²	Método B ²
Proteínas (g/100g polvo)	10 ^{A a} ±1	10 ^{A a} ±1	9±1 ^{A a}
Carbohidratos no celulósicos (g/100g polvo)	47,9 ^{A a} ±0,6	34 ^{A b} ±1	46,5 ^{A a} ±0,6
Celulosa (g/100g polvo)	7,7 ^{A a} ±0,9	7,4 ^{A a} ±0,9	10 ^{A b} ±1
Ácidos Urónicos (g/100g polvo)	7,8 ^{A b} ±0,3	7,0 ^{A a} ±0,5	7,7 ^{A b} ±0,6
Lignina (g/100g polvo)	3,2 ^{A a} ±0,2	3,3 ^{A a} ±0,1	2,5 ^{A a} ±0,3
Menor a 105 µm de granulometría			
	RF ¹	Método A ²	Método B ²
Proteínas (g/100g polvo)	9,3 ^{A a} ±0,3	9,8 ^{A a} ±0,9	8,5 ^{A a} ±0,4
Carbohidratos no celulósicos (g/100g polvo)	46,4 ^{A a} ±0,9	35 ^{A b} ±2	30,9 ^{B c} ±0,8
Celulosa (g/100g polvo)	4,8 ^{B a} ±0,4	8,0 ^{A b} ±0,3	7,0 ^{B c} ±0,1
Ácidos Urónicos (g/100g polvo)	10,4 ^{B a} ±0,8	8,7 ^{A a} ±0,7	9,8 ^{B a} ±0,8
Lignina (g/100g polvo)	3,8 ^{A a} ±0,3	3,2 ^{A a} ±0,3	1,72 ^{B b} ±0,04

¹RF: remolacha fresca sin tratamiento térmico. ² Ensayos de escaldado por las dos técnicas evaluadas. Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) entre técnicas. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) para cada componente químico de la pared celular y entre granulometrías.

La cantidad de lignina en todos los polvos osciló entre 1,7 y 3,8 g/100g de polvo presentando un valor significativamente menor para los de menor granulometría y obtenidos a partir de la aplicación de la técnica de escaldado B. Los carbohidratos no celulósicos fueron mayores, en general, para el caso de la remolacha fresca. Por otra parte se observó una diferencia significativa entre los dos tipos de granulometrías ya que para el método B se presentaron valores más altos cuando las partículas fueron mayores de 105 µm. Igual tendencia se observó con respecto al contenido de celulosa. Con respecto a los ácidos urónicos, en cambio, se encontró un menor contenido para el método B y la mayor granulometría de sólidos así como un mayor contenido para la remolacha fresca respecto a los sólidos de mayor granulometría obtenidos luego de aplicar el método de escaldado A. Es importante remarcar que, debido a la técnica utilizada para la obtención de los polvos de remolacha, durante el procedimiento se pudo

haber perdido pectina soluble en agua (Vincken et al., 2003) y otros componentes del medio citoplasmático (i.e. proteínas globulares, aminoácidos, mono y disacáridos) como se comentó previamente.

4.3.3. **Análisis por microscopía de los polvos liofilizados de remolacha**

4.3.3.1. **Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de la muestra y permite obtener una imagen tridimensional de dicha superficie. Para ello, se trabaja enfocando y barriendo la superficie de la muestra con un haz de electrones, en condiciones de alto vacío.

La morfología de los polvos de remolacha se estudió por SEM para las muestras escaldadas por el método A y B, con un tamaño de partícula menor a $105\ \mu\text{m}$ y mayor a $105\ \mu\text{m}$ y se muestran las correspondientes imágenes en la **Figura 4.9**.

Las imágenes de las muestras de polvo de remolacha de tamaño de partícula menor a $105\ \mu\text{m}$ (A1, B1) mostraron una superficie más lisa y homogénea que la correspondiente a la mayor granulometría (A3, B3), lo que probablemente se deba a que la fibra se dividió en trozos pequeños por el proceso de molienda aplicado.

La imagen A1 correspondiente al método de escaldado A presentó una superficie menos rugosa que la imagen B1 correspondiente a polvos obtenidos a partir del método de escaldado B. Para ambos métodos de escaldado, es de

destacar que se observa en las imágenes, células parenquimatosas conteniendo algunos gránulos de almidón probablemente contenidos en células parenquimatosas (imágenes A2, A3, B2, B3). En la imagen B4 (método B) se ven grupos de fibras y en la imagen A4 (método A) se ven fibras más aisladas y partículas.

O sea que, en el caso del escaldado por el método B, se observa en las imágenes correspondientes a la menor granulometría, una topografía más rugosa y en las correspondientes a la mayor granulometría, una mayor densidad de fibras de celulosa, lo cual muestra las distintas características estructurales de los productos de ambos métodos de escaldado.

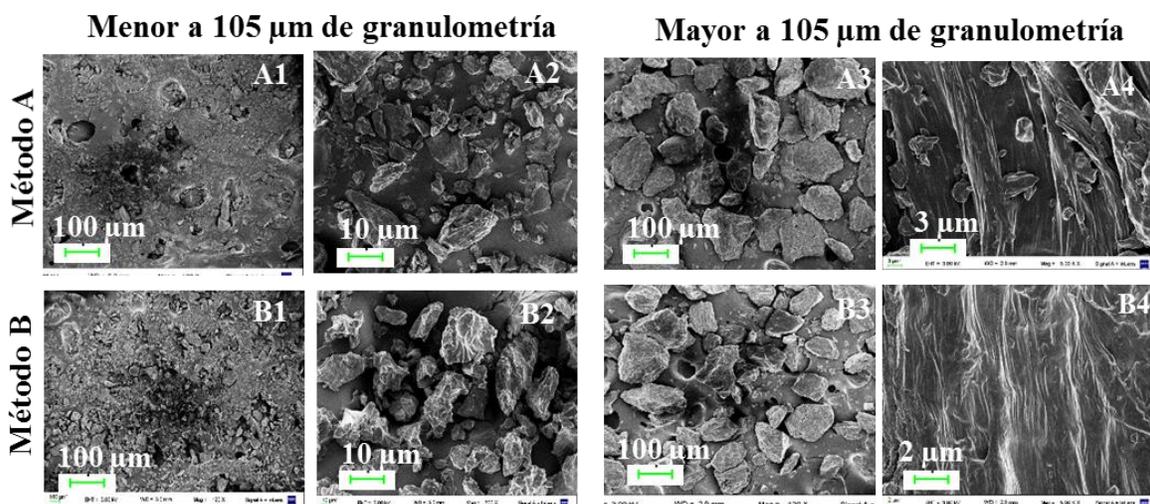


Figura 4.9. Fotos microscópicas de los polvos de remolacha de menor y mayor granulometría. Magnificación: A1, B1, A3, B3 (120 X). A2, B2 (800 X). A4, B4 (5000 X).

4.3.3.2. Espectroscopía de energía dispersiva (EDS)

El microanálisis por espectroscopía de energía dispersiva (SEM-EDS), permite determinar la distribución de elementos en distintos materiales (Newbery &

Ritchie, 2013). Esta técnica se aplicó con el fin de estudiar la composición química en las superficies de los polvos de remolacha.

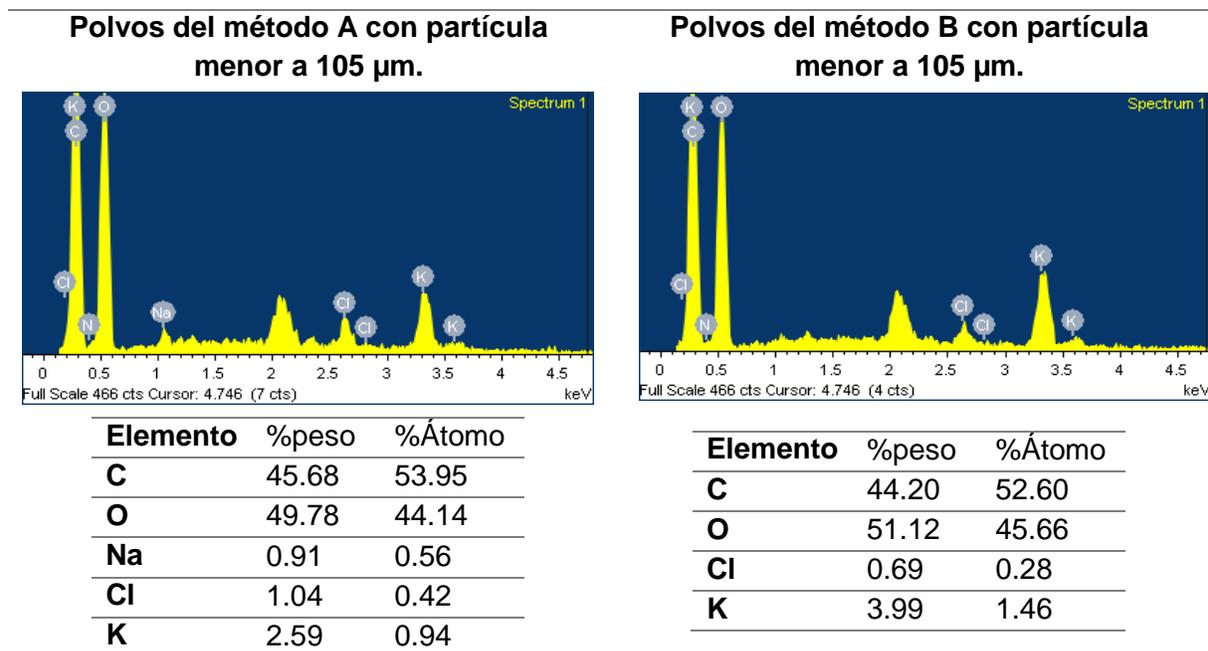


Figura 4.10. Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS) de los polvos de remolacha de menor granulometría.

Un espectro de dispersión de energía se presenta usualmente como un histograma donde el eje horizontal son unidades de energía en kilo-electronvoltios (KeV), en este caso de 0.00 a 5.00, y en el eje vertical se representa el número de cuentas o intensidad, con que se presentan los distintos elementos.

En este análisis se detectó la presencia de cuatro elementos, C, O, Cl y K (**Figuras 4.10 y 4.11**). Los de mayor concentración fueron el carbono y el oxígeno, seguidos del cloro y potasio. En los polvos del método A de partícula de menor y mayor a 105 μm se detectó la presencia de Na. No mostraron diferencias entre muestras en cuanto a la composición de la superficie.

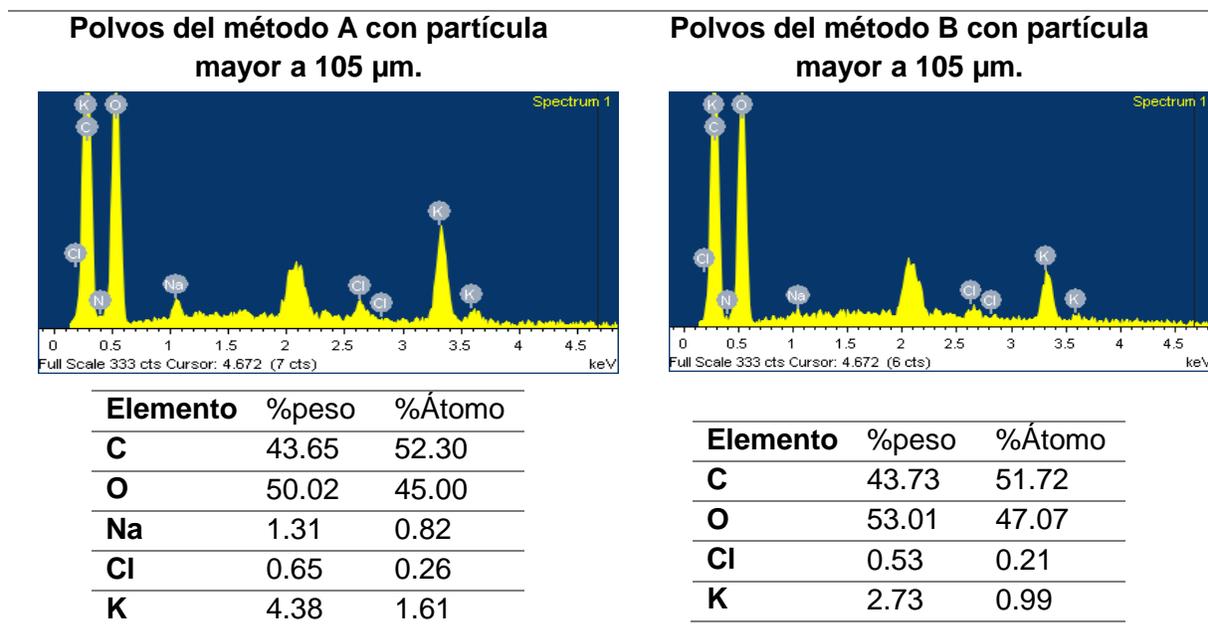


Figura 4.11. Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS) de los polvos de remolacha de mayor granulometría.

4.3.4. Parámetros de color para polvos liofilizados de remolacha

Como se observa en la **Tabla 4.14**, la luminosidad fue baja para todos los polvos, pero el polvo obtenido a partir de la aplicación del método de escaldado B presentó una luminosidad ligeramente más alta para ambas granulometrías, probablemente por la incidencia de aspectos estructurales ya que las concentraciones de pigmentos son semejantes (Item 4.3.5). Por otra parte se obtuvo, para estos mismos polvos, un valor más bajo del parámetro a^* , o sea menor intensidad de color rojo e igual valor del parámetro b^* , indicando intensidad semejante de color amarillo.

En relación al grado de tono (Hue) se detectaron valores del mismo en el orden de los rosas/rojos, presentando una mayor tonalidad rojiza los polvos de la remolacha fresca. La saturación del color (Croma) se redujo para los polvos

provenientes de la aplicación del método B de escaldado probablemente por la reducción que presenta del parámetro a*.

Tabla 4.14. Parámetros CIELab de los polvos liofilizados de remolacha.

Mayor a 105 µm de granulometría.			
Parámetros	RF¹	Método A²	Método B²
L*	14,78 ^a ± 0,03	15,2 ^a ± 0,5	17 ^b ± 1
a*	22,1 ^a ± 0,1	27,1 ^b ± 0,5	20,4 ^c ± 0,6
b*	5,38 ^a ± 0,01	3,18 ^b ± 0,06	3,95 ^b ± 0,08
C*	22,8 ^a ± 0,1	27,3 ^b ± 0,5	21,7 ^a ± 0,6
h^{o*}	13,64 ^a ± 0,07	6,6 ^b ± 0,2	10,45 ^c ± 0,08
Menor a 105 µm de granulometría.			
Parámetros	RF¹	Método A²	Método B²
L*	17,82 ^a ± 0,01	17,1 ^a ± 0,8	23,1 ^b ± 0,1
a*	37,52 ^a ± 0,06	42,2 ^b ± 0,9	35,3 ^c ± 0,1
b*	9,55 ^a ± 0,01	4,2 ^b ± 0,1	4,7 ^b ± 0,3
C*	36,78 ^a ± 0,05	42,4 ^b ± 0,9	38,3 ^a ± 0,2
h^{o*}	15,05 ^a ± 0,04	5,7 ^b ± 0,2	7,6 ^c ± 0,4

¹Polvos de remolacha sin tratamiento térmico y liofilizado. ²Ensayos de escaldado por las dos técnicas evaluadas. Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) entre las técnicas evaluadas.

En la **Figura 4.12** se observan las características de color de los polvos analizados para las muestras del método B. Dado que, a simple vista, no se detectaron diferencias respecto a los polvos provenientes de la aplicación del método escaldado A, no se informan dichas fotos.

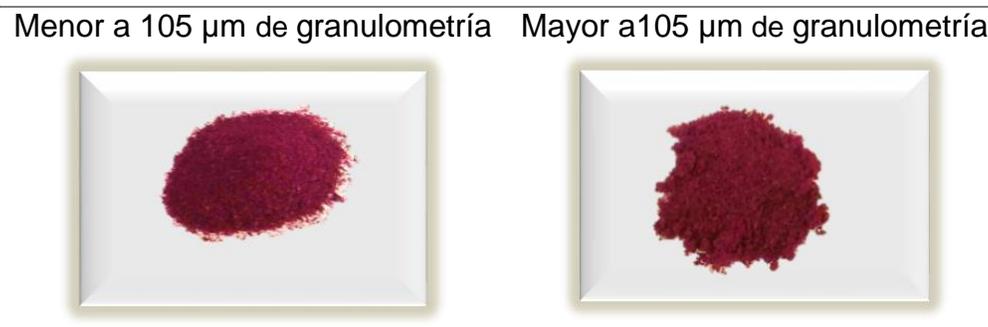


Figura 4.12. Visualización del color de los polvos liofilizados de remolacha.

4.3.5. Contenido de betacianinas y betaxantinas en polvos liofilizados de remolacha

Como se observa en la **Tabla 4.15**, el contenido de betacianinas y betaxantinas fue más alto para los polvos liofilizados obtenidos a partir de remolacha fresca (sin tratamiento térmico). Asimismo, se puede observar que los polvos tuvieron un contenido mayor de betacianinas que de betaxantinas, lo cual es coherente con los resultados obtenidos para los parámetros de color a* y b*.

Es de destacar que los polvos de mayor granulometría, provenientes de la aplicación del método de escaldado B, presentaron un contenido de betacianinas más alto. Esta tendencia observada podría ser un artefacto del proceso extractivo de los pigmentos previo a su dosaje lo cual podría deberse a las diferencias estructurales detectadas por SEM (ítem 4.3.3.1) para los polvos.

Tabla 4.15. Contenido de betacianinas y betaxantinas en los polvos liofilizados.

Contenido de betalaínas	Tamaño de partícula(µm)	RF	Método A	Método B
Bc (mg/g sólido)	< 105	0,55 ^a ±0,01	0,46 ^b ±0,03	0,47 ^b ±0,01
Bc (mg/g sólido)	> 105	0,56 ^a ±0,01	0,49 ^b ±0,03	0,54 ^a ±0,02
Bx(mg/g sólido)	< 105	0,35 ^a ±0,02	0,220 ^b ±0,003	0,260 ^b ±0,004
Bx(mg/g sólido)	> 105	0,37 ^a ±0,07	0,248 ^b ±0,003	0,261 ^b ±0,003

Bc: betacianinas; Bx betaxantinas. RF: Remolacha sin tratamiento de escaldado y liofilizada. Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05).

4.3.6. **Estudio de la estabilidad a 45°C de los polvos liofilizados obtenidos a partir de subproductos del escaldado de remolacha**

De acuerdo a ensayos preliminares realizados con los polvos liofilizados de remolacha, se concluyó que, en general, existía un efecto nulo del almacenamiento a 5 °C y 25 °C en la estabilidad de los mismos (Ver ANEXO 1). Por ello, se estudió en detalle sólo el efecto en dichos polvos del almacenamiento a 45 °C, a través de la determinación del espectro UV/Visible de las muestras, el contenido de betalaínas, la evaluación del color por el sistema CIELab y la caracterización fotográfica.

4.3.6.1. **Influencia del almacenamiento a 45 °C en los espectros UV/Visible de los polvos liofilizados de remolacha**

En la **Figura 4.13** se muestran los espectros UV/visible para los polvos liofilizados, con mayor y menor granulometría, en un intervalo de longitudes de onda entre 280 y 700 nm. Como se puede observar, las longitudes de onda donde se presentaron los picos de máxima absorción fueron ≈ 470 y ≈ 530 nm, correspondientes a las longitudes de absorción de las betaxantinas y betacianinas, respectivamente. Un comportamiento espectrofotométrico análogo fue previamente informado para las aguas de escaldado.

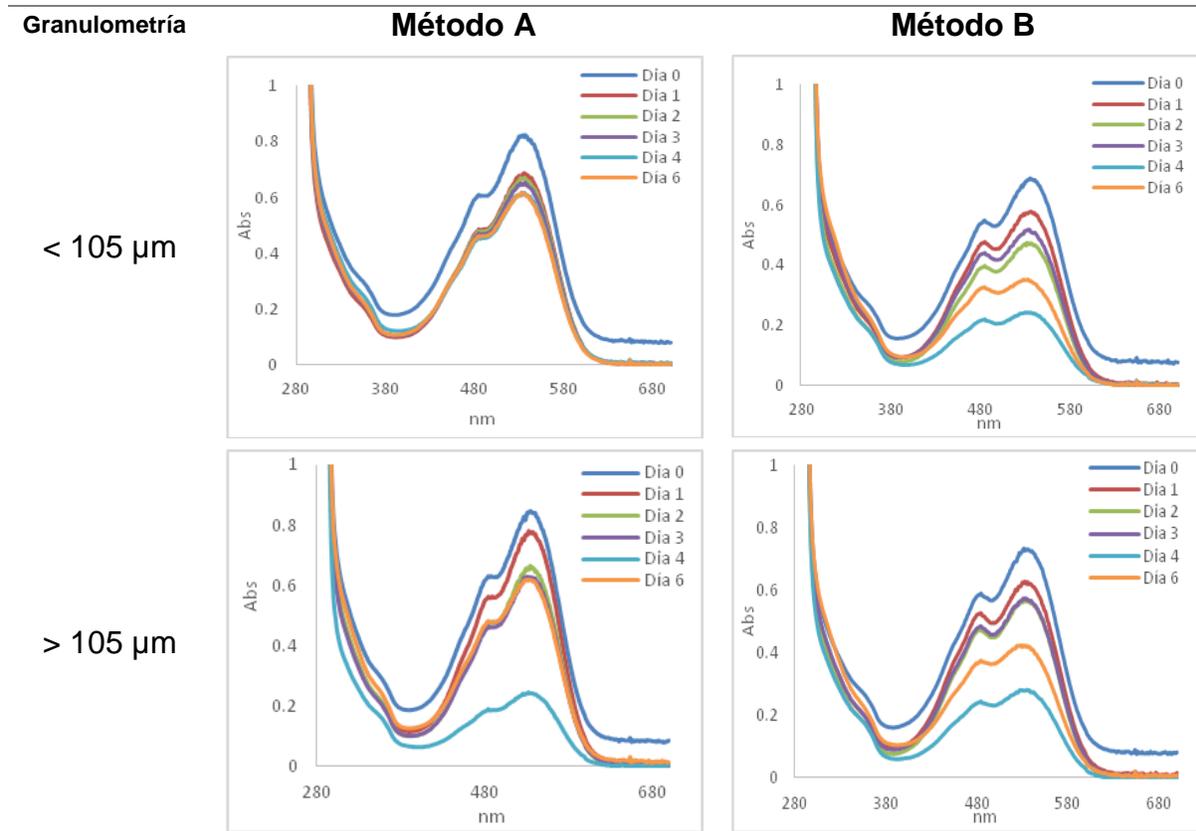


Figura 4.13. Espectros de absorción de los polvos liofilizados almacenados a 45°C y su variación con el tiempo.

Para todos los polvos liofilizados se observa que el pico de ≈ 530 nm presentó mayor absorbancia que el pico de ≈ 470 nm. Por lo general, los valores de absorbancia correspondientes a las longitudes de onda máximas, disminuyeron para todas las muestras a lo largo del almacenamiento, pero en las muestras provenientes del método de escaldado B, para las dos granulometrías, esta disminución de los dos picos fue más marcada y ocurrió para todos los días de almacenamiento. En el caso del método A y, para las partículas de menor granulometría, los picos disminuyeron su absorbancia en el primer día de almacenamiento; en los siguientes días, dicha absorbancia se mantuvo sin

cambios a la temperatura de 45°C y, para la mayor granulometría, se observó un marcado descenso para el mayor tiempo.

4.3.6.2. Influencia del almacenamiento a 45°C en la concentración de betalaínas en los polvos liofilizados de remolacha

En la **Tabla 4.16** se muestra la concentración de las betacianinas y betaxantinas de los polvos obtenidos de tejidos escaldados por el método A o B. Se observa, en todos los casos, que fue mayor el contenido de betacianinas que el de betaxantinas para los polvos estudiados.

Los valores correspondientes al contenido de betacianinas y betaxantinas, en general, variaron durante el almacenamiento para los polvos provenientes de la aplicación del método de escaldado A, tomando valores para las betacianinas de 19% y 9% para la menor y mayor granulometría, respectivamente, y de 13 % y 0 % para las betaxantinas para la menor y mayor granulometría. En cambio, para los polvos provenientes de la aplicación de método de escaldado B, se observó pérdida de betacianinas a lo largo del almacenamiento de 60% y 40 % (menor y mayor granulometría) y de 53 % (menor granulometría) y 33 % (mayor granulometría) para las betaxantinas. Estas diferencias entre los polvos provenientes de la aplicación del método A y del método B, podrían deberse a las diferencias estructurales. Es de destacar que, tal como se informó en los estudios de SEM, los polvos provenientes de tejidos escaldados por el método B, mostraron una estructura diferente que podría condicionar su extracción, lo cual podría afectar entonces los resultados obtenidos.

Tabla 4.16. Variación de la concentración de betacianinas (Bc) y betaxantinas (Bx) en polvos liofilizados de remolacha almacenados a 45°C.

Tamaño de partícula	Día	Método A				Método B			
		Bc (mg/g solido)		Bx (mg/g solido)		Bc (mg/g solido)		Bx (mg/g solido)	
< 105 µm	0	0,530 ^{A a}	± 0,008	0,24 ^{A a}	± 0,01	0,48 ^{A a}	± 0,01	0,253 ^{A a}	± 0,009
	1	0,508 ^{Ba}	± 0,006	0,228 ^{A a}	± 0,001	0,40 ^{Bb}	± 0,05	0,250 ^{A a}	± 0,009
	2	0,42 ^{Ca}	± 0,01	0,198 ^{B a}	± 0,006	0,40 ^{Ba}	± 0,01	0,23 ^{AB b}	± 0,01
	3	0,413 ^{Ca}	± 0,001	0,191 ^{B a}	± 0,001	0,34 ^{Bb}	± 0,02	0,20 ^{Ba}	± 0,01
	4	0,42 ^{Ca}	± 0,02	0,20 ^{B a}	± 0,01	0,246 ^{Cb}	± 0,001	0,156 ^{Cb}	± 0,001
	6	0,427 ^{Ca}	± 0,002	0,210 ^{B a}	± 0,002	0,19 ^{Cb}	± 0,03	0,12 ^{Db}	± 0,02
> 105 µm	0	0,49 ^{A a}	± 0,02	0,22 ^{A a}	± 0,01	0,486 ^{A a}	± 0,002	0,252 ^{Ab}	± 0,002
	1	0,48 ^{A a}	± 0,02	0,24 ^{B a}	± 0,01	0,44 ^{A a}	± 0,01	0,25 ^{ABa}	± 0,01
	2	0,469 ^{A a}	± 0,005	0,213 ^{A a}	± 0,002	0,30 ^{B b}	± 0,02	0,17 ^{Cb}	± 0,01
	3	0,40 ^{B a}	± 0,01	0,191 ^{C a}	± 0,009	0,38 ^{Ca}	± 0,04	0,22 ^{Bb}	± 0,02
	4	ND*		0,180 ^{C a}	± 0,004	0,212 ^{Db}	± 0,009	0,126 ^{Db}	± 0,008
	6	0,445 ^{C a}	0,002	0,224 ^{ABa}	± 0,003	0,29 ^{Bb}	± 0,02	0,17 ^{Cb}	± 0,01

* No determinado (ND). Bc: Betacianinas; Bx: Betaxantinas. Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila y entre Bc o Bx significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre métodos. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo. METODO A: disminución de la concentración de betacianinas menor granulometría: 19%; disminución de la concentración de betacianinas mayor granulometría: 9%; disminución de la concentración de betaxantinas menor granulometría 13 %; disminución de la concentración de betaxantinas mayor granulometría 0%. METODO B: disminución de la concentración de betacianinas menor granulometría 60%; disminución de la concentración de betacianinas mayor granulometría: 40%; disminución de la concentración de betaxantinas menor granulometría 53 %; disminución de la concentración de betaxantinas mayor granulometría 33%.

Cuando se analizan los resultados obtenidos para los polvos, se puede concluir que, independientemente de la granulometría, se observó una mayor estabilidad de los pigmentos en el tiempo, a 45°C, que para las aguas de escaldado previamente informadas. Cai et al. (1998) informaron una mayor estabilidad de pigmentos en polvos de *Amaranthus* en comparación con soluciones acuosas, atribuyendo esta tendencia a la menor actividad de agua de los polvos. Cai & Corke (2000) también estudiaron en polvos de *Amaranthus*, la

estabilidad de las betalaínas estableciendo que se incrementa la estabilidad de las betalaínas, a medida que aumenta la materia seca y con un contenido de humedad por debajo del 5%. Serris & Biliaderis (2001) informaron que la estabilidad de estos pigmentos aumenta a menor actividad de agua y que la estabilidad se incrementa por debajo de actividades acuosas de 0,63. En el presente trabajo, los polvos liofilizados de remolacha presentaron humedades entre $\approx 6\%$ (Método A) y $\approx 5\%$ (Método B) y actividades acuosas entre 0,355 (método A) y 0,284 (Método B) justificando la mayor estabilidad de la betacianinas y betaxantinas a 45°C en comparación con las aguas de escaldado.

Los polvos provenientes de tejidos escaldados presentaron sólidos de pared celular que podrían actuar como protectores de los pigmentos, ya sea físicamente lo que podría contribuir a evitar reacciones de degradación de los mismos o químicamente, evitando oxidaciones u otras reacciones de deterioro (Yilin You et al., 2019). En particular, es sabido que la lignina actúa como antioxidante y los polvos contienen este compuesto (**Tabla 4.13**), el cual podría desarrollar dicha actividad protegiendo a los pigmentos. Es de destacar que el polvo obtenido por el método B y de menor granulometría presentó un menor contenido de lignina y una mayor degradación de los pigmentos. Además, otros factores podrían afectar los resultados.

4.3.6.3. Influencia del almacenamiento a 45 °C en los parámetros de color de los polvos liofilizados de remolacha

Se estudió la variación del color en los polvos obtenidos a partir de tejidos escaldados por ambos métodos, exclusivamente para la menor granulometría que presenta pérdidas más altas de pigmentos (ítem 4.3.6.2). En la **Tabla 4.17** se ilustra la evolución del color con el tiempo para los polvos almacenados a temperatura de 45 ° C. Para ello, se informan los parámetros de color CIELab (L*, a*, b*, C* y h°*).

Tabla 4.17. Parámetros CIELab de los polvos liofilizados de remolacha del método A y B de menor granulometría durante el almacenamiento a 45°C.

Método	Días	L*		a*		b*		C*		h°*	
A	0	15,1 ^A	± 1	42,4 ^A	± 2	4,7 ^A	± 0,5	42,6 ^A	± 2	6,34 ^A	± 0,03
	1	14,9 ^B	± 0,4	41,2 ^A	± 1	3,4 ^A	± 0,2	41,4 ^A	± 0,9	4,73 ^B	± 0,01
	2	18,6 ^B	± 0,6	44,7 ^A	± 0,7	3,9 ^A	± 0,8	44,8 ^A	± 0,5	4,99 ^C	± 0,02
	3	20,7 ^B	± 0,9	45,7 ^{AB}	± 0,6	3,9 ^A	± 0,9	45,9 ^{AB}	± 0,4	4,87 ^D	± 0,02
	4	19,9 ^B	± 0,4	45,6 ^{AB}	± 0,1	3,5 ^A	± 0,7	45,7 ^{AB}	± 0,01	4,41 ^E	± 0,01
	6	20,4 ^B	± 0,2	45,7 ^{AB}	± 0,5	3,7 ^A	± 0,6	45,9 ^{AB}	± 0,8	4,67 ^B	± 0,02
B	0	20,4 ^A	± 0,2	32 ^A	± 1	3,7 ^A	± 0,3	32,1 ^A	± 1	6,57 ^A	± 0,07
	1	25,6 ^B	± 0,2	38 ^B	± 1	4 ^A	± 1	38,2 ^B	± 1	6,2 ^B	± 0,1
	2	29,42 ^C	± 0,05	43,6 ^C	± 0,2	5,0 ^A	± 0,2	43,9 ^C	± 0,2	6,49 ^A	± 0,01
	3	31,4 ^D	± 0,4	44 ^C	± 2	2,2 ^B	± 0,1	44,1 ^C	± 2	2,85 ^C	± 0,04
	4	30,15 ^C	± 0,07	43,7 ^C	± 0,3	5 ^A	± 1	44,0 ^C	± 0,4	5,89 ^D	± 0,01
	6	32,9 ^E	± 0,2	43,4 ^C	± 0,8	2,3 ^B	± 0,8	43,5 ^C	± 0,5	3,0 ^C	± 0,1

Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo.

Se observa que las muestras de los polvos liofilizados del método A mostraron un aumento de luminosidad con el almacenamiento tomando valores promedios de 18 cuando fueron almacenadas a 45 °C. Los polvos liofilizados del método B presentaron la misma tendencia y valores promedio de 26.

Respecto a los otros parámetros, se observó un mayor valor de a^* en las muestras lo que se expresa en el color fundamentalmente rojo de las mismas. Con el tiempo de almacenamiento se observó un incremento de dicho parámetro (polvos resultantes de la aplicación de los métodos de escaldado A y B) y una tendencia a la disminución en el parámetro b^* .

Durante el almacenamiento, el grado de tono (hue) disminuyó manteniéndose en los rosas-rojos durante todo el tiempo y la saturación del color (croma) aumentó.

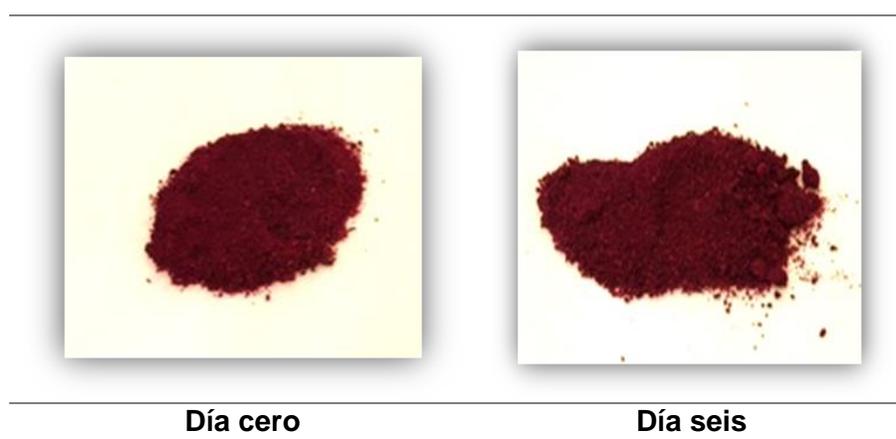


Figura 4.14. Imagen fotográfica del polvo de menor granulometría resultante de la aplicación del método de escaldado B almacenado a 45 °C.

En la **Figura 4.14** se observan las fotografías del polvo de menor granulometría resultante de la aplicación del método de escaldado B luego de 0 y 6 días de almacenamiento a 45°C. Se puede apreciar que los cambios por efecto del almacenamiento durante ese tiempo fueron mínimos.

4.3.7. Conclusiones parciales sobre la estabilidad frente a la temperatura de las betalaínas presentes en los polvos liofilizados de remolacha

En los espectros de UV/Visible, por lo general, los valores de absorbancia correspondientes a las longitudes de onda máximas, tendieron a disminuir para todas las muestras a lo largo del almacenamiento, pero en las muestras provenientes del método de escaldado B, para las dos granulometrías, esta disminución de los dos picos fue más marcada y ocurrió para todos los días de almacenamiento.

Los valores correspondientes al contenido de betacianinas y betaxantinas, en general, variaron significativamente durante el almacenamiento. En el caso de la aplicación del método de escaldado A, el decaimiento tomó valores para las betacianinas de 19% y 9% para la menor y mayor granulometría, respectivamente, y de 13 % y 0 % para las betaxantinas para la menor y mayor granulometría. En cambio, para los polvos provenientes de la aplicación del método de escaldado B, se observó pérdida de betacianinas a lo largo del almacenamiento de 60% y 40 % (menor y mayor granulometría) y de 53 % (menor granulometría) y 33 % (mayor granulometría) para las betaxantinas.

Durante el almacenamiento se observó un incremento en el parámetro a^* y una tendencia a la disminución en el parámetro b^* . El color de las muestras, fundamentalmente rojo, no mostró diferencias notables en las imágenes fotográficas.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos para los polvos, se pudo concluir que, independientemente de la granulometría, se observó una mayor estabilidad de los pigmentos en el tiempo, a 45°C, que para las aguas de escaldado previamente informadas a igual temperatura de almacenamiento.

4.3.8. **Estudio de la estabilidad frente al pH y la temperatura de betalaínas presentes en polvos de remolacha e incluidas en sistemas modelo**

El experimento realizado permitió evaluar conjuntamente el efecto de temperatura y pH. En la **Tabla 4.18** se observan los parámetros iniciales de color y el contenido de betacianinas y betaxantinas de los sistemas modelos formulados. El sistema S3 presentó un valor de luminosidad (L^*) significativamente menor que S1 y S2. Por otra parte, S3 mostró un valor menor del parámetro a^* , o sea menos intensidad de color rojo y también presentó un valor bajo y negativo del parámetro b^* . Por otra parte el b^* fue positivo y más alto para S2 que para S1. En relación al parámetro hue (h^{o*}), se observaron valores correspondientes a los rosas para los sistemas S1 y S2 y S3, presentó el mayor valor correspondiente al púrpura-rosa. Respecto al croma, se observa que el sistema S3 presentó el menor valor de saturación.

Tabla 4.18. Parámetros iniciales previos al almacenamiento, de color, contenido de betacianinas y betaxantinas de cada sistema.

Sistema	S1 pH 3,6	S2 pH 6,3	S3 pH 8,0
Análisis de Color			
L*	23,5 ^a ±0,1	23,5 ^a ±0,3	20,3 ^b ±0,1
a*	24,7 ^a ±0,2	24,6 ^a ±0,8	10,4 ^b ±0,4
b*	3,2 ^a ±0,2	5,1 ^b ±0,5	-0,9 ^c ±0,1
C*	24,9 ^a ±0,2	25,1 ^a ±0,9	10,4 ^b ±0,3
h°*	7,3 ^a ±0,3	11,8 ^b ±0,6	354 ^c ±1
Análisis de betalaínas			
Betacianinas (mg/100g sólido)	0,65 ^a ±0,02	0,60 ^a ±0,03	0,493 ^b ±0,006
Betaxantinas (mg/100g sólido)	0,210 ^a ±0,004	0,32 ^b ±0,02	0,228 ^a ±0,003

Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$)

En la **Figura 4.15** se visualizan las características fotográficas de color para el alimento modelo ajustado a los distintos pHs.



Figura 4.15. Visualización del color inicial previo al almacenamiento de cada sistema.

Como se informa en la **Tabla 4.18**, el contenido de betacianinas fue mayor en los sistemas S1, S2 lo cual es coherente con los resultados obtenidos para el parámetro de color a*. S2 presentó el mayor contenido de betaxantinas y el mayor valor de b*.

4.3.8.1. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los espectros de absorción UV/visible de las betalainas presentes en los sistemas modelo

En la **Figura 4.16** se presentan los espectros de absorción UV/visible de los sistemas modelo de actividad acuosa 0,98, almacenados a distintos pHs y temperaturas. Se observa que para los sistemas S2 y S3 (pH 6,3 y 8,0) almacenados a 5°C, el pico de $\lambda_{\text{máx}}$ 530 nm presentó mayor absorbancia que el de $\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm, y, a lo largo del almacenamiento, sus intensidades, en general, disminuyeron. En particular, para el sistema S1 (pH 3,6), el pico de absorción a 470 nm, correspondiente a las betaxantinas fue prácticamente imperceptible, a las tres temperaturas, a tiempo inicial y ello podría atribuirse a que estos pigmentos **son estables**, de acuerdo con Cai & Corke (2001), a pHs entre 4,0 y 7,0. El pico de absorción de 530 nm, correspondiente a las betacianinas, conservó su intensidad, en los sistemas S1 y S2, durante el almacenamiento aunque a pH 8,0 se observó un descenso de la misma.

Los sistemas almacenados a 25°C y 45 °C mostraron un claro efecto de la temperatura sobre los picos de absorción de ambas longitudes de onda. Se observó para los sistemas S2 y S3, correspondientes a pH 6,3 y 8,0 que los picos de ≈ 470 nm y ≈ 530 nm estaban bien definidos al inicio del ensayo y los mismos decayeron fuertemente durante los días de almacenamiento por la degradación de las betalainas por efecto de la temperatura. A pH 3,6, a tiempo cero, el pico de ≈ 530 nm tuvo mayor absorbancia y durante el almacenamiento disminuyó su intensidad. Y estas tendencias fueron más marcadas a la mayor temperatura.

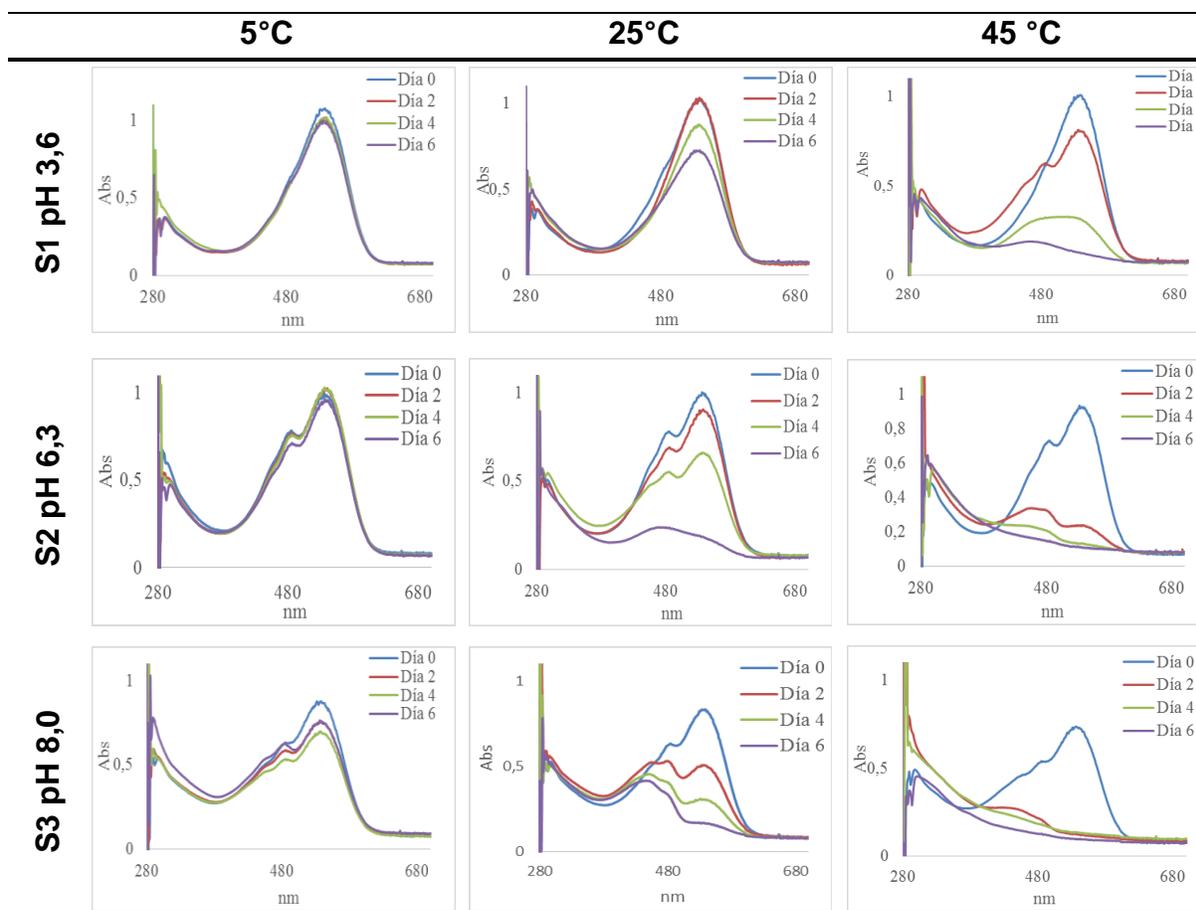


Figura 4.16. Efecto del pH y la temperatura en los espectros de absorción de las betalainas de los sistemas modelo y su variación con el tiempo.

Se observó que para el sistema de pH 8,0 (S3), almacenado a 45 °C, hubo un leve aumento en los valores de absorbancia a longitudes de onda entre 400 nm y 500 nm para los dos días de almacenamiento. Este hecho podría deberse a la formación de compuestos de pardeamiento, como consecuencia del proceso térmico (Stintzing & Carle, 2007; Wybraniec et al., 2013) y/o a la formación de compuestos de degradación de color amarillo (Herbach et al., 2006a y 2006b).

4.3.8.2. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en la concentración de las betalaínas presentes en los sistemas modelo

Se realizó la cuantificación del contenido de betacianinas y betaxantinas en cada uno de los sistemas (**Figura 4.17**), siendo mayor la concentración de las betacianinas (0,5-0,6 mg/100 g sistema modelo para las betacianinas y 0,2-0,3 mg/100 g sistema modelo para las betaxantinas) a tiempo inicial para todos los sistemas. Las tablas de datos se informan en el ANEXO 2. En general, se produjo una disminución de la concentración de estos pigmentos a 25°C y 45°C con el tiempo de almacenamiento, observándose que la disminución es mayor para los sistemas almacenados a 45°C, lo cual podría comprometer el color de los sistemas. Como ya se mencionó anteriormente, la temperatura es un factor importante que influye en la estabilidad de estos pigmentos, generando degradación, por ejemplo por isomerización, descarboxilación, deshidrogenación.

En los sistemas S1 y S2 almacenados a 5°C, la concentración de las betacianinas y betaxantinas presentó un leve descenso con el tiempo (entre 6 y 14%). Para el sistema S3 (pH 8,0) a 5 °C, se observó una disminución de las betacianinas de 16 % y las betaxantinas se mantuvieron prácticamente constantes. Por consiguiente, en sistemas de actividad acuosa alta ($a_w \approx 0,98$), a pHs en el rango 3,6 a 8,0 y en condiciones de almacenamiento a temperaturas de refrigeración, podrían utilizarse los polvos de remolacha estudiados como colorantes naturales. Se destaca la importancia de estudiar el efecto del control de la actividad acuosa de los alimentos como factor de disminución de la degradación

de los pigmentos (Herbach et al., 2006a y b) para poder concluir acerca de la posibilidad de usarlos para otros alimentos que requieran mayores temperaturas y tiempos de almacenamiento y que estén en este rango de pHs.

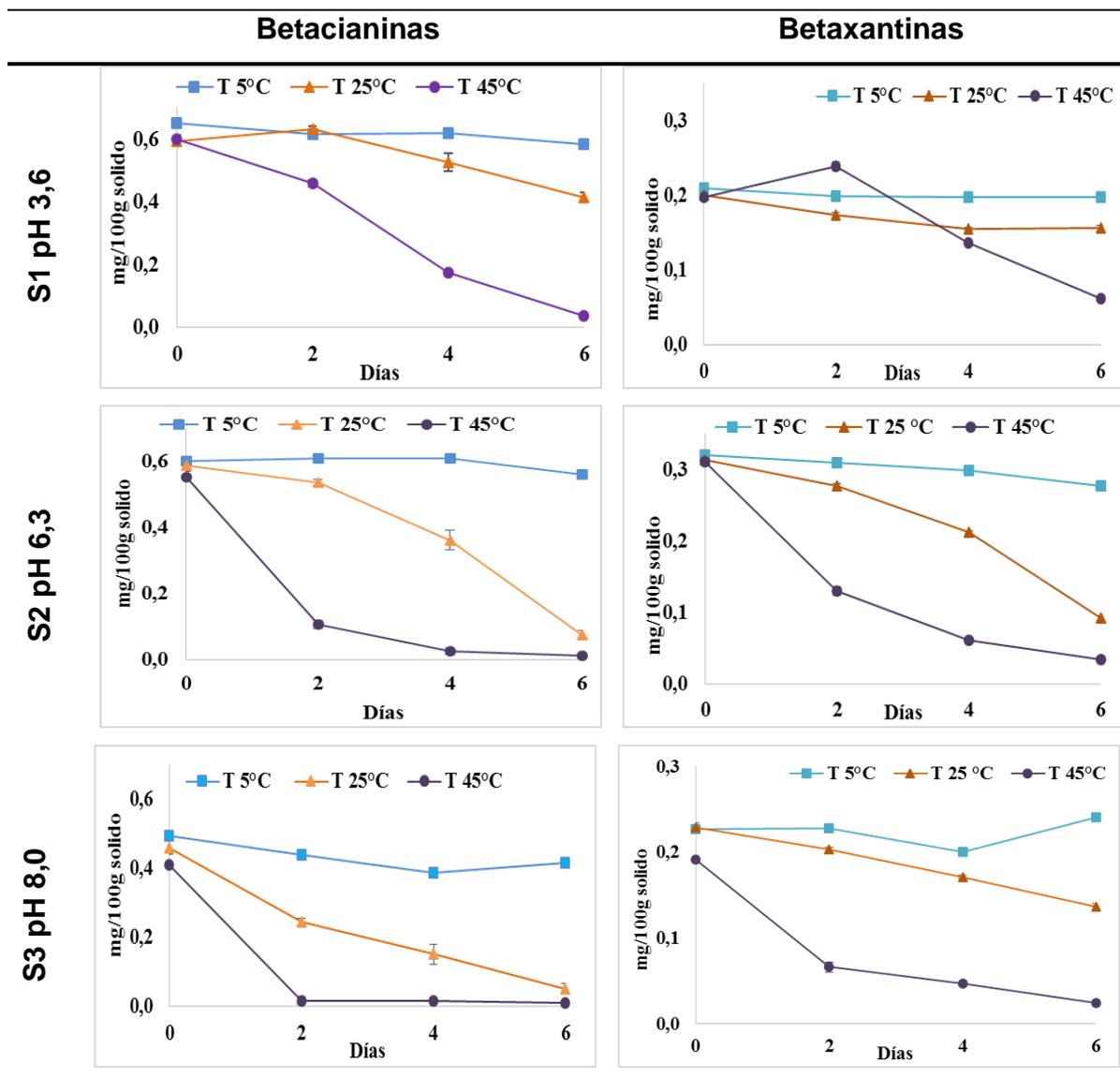


Figura 4.17. Contenido de betacianinas y betaxantinas en sistemas modelo durante el almacenamiento a distintas temperaturas y pH.

Los sistemas S1 (pH 3,6) y S2 (pH 6,3) almacenados a 25 °C mostraron una disminución de la concentración de los pigmentos, siendo ésta más marcada para el sistema S2. El sistema S1 presentó una reducción de contenido del 30% y

22% de betacianinas y betaxantinas, respectivamente, en cambio para S2 la reducción fue del 88% y 71% al final del almacenamiento. En el sistema S3 (pH 8,0), la concentración de las betacianinas decayó un 89% al final del almacenamiento, en cambio las betaxantinas decayeron un 40%.

A 45°C los decaimientos de la concentración de betacianinas fueron de 94, 98, 98% (S1, S2, S3) para las betacianinas y de 69, 88, 87% (S1, S2, S3) para las betaxantinas mostrando el fuerte efecto de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos.

Se puede concluir entonces que las betacianinas, presentaron una tendencia al incremento de la degradación con el aumento de pH en el sistema modelo. Y a 25°C presentaron la menor degradación a pH 3,6. Las betaxantinas a 25°C presentaron una mayor estabilidad a pH 8 que las betacianinas. Como ya se mencionó previamente ha sido reportado en bibliografía que las betaxantinas presentan una estabilidad ligeramente mayor a valores de pH entre 4,0 y 7,0 (Cai & Corke, 2001), mientras que las betacianinas poseen una mayor estabilidad a un pH de 3,0 a 5,5 (Savolainen y Kuusi, 1978).

4.3.8.3. Influencia del pH de las muestras y temperatura de almacenamiento en los parámetros de color de los sistemas modelo

En la **Figura 4.18** se ilustra la evolución del color de los sistemas (S1, S2 y S3) durante los seis días de almacenamiento a temperatura de 5 °C, 25 °C y 45 °C. Los datos numéricos se informan en el ANEXO 2.

A tiempo inicial, la luminosidad (L^*) fue levemente menor en el sistema S3 en comparación a los sistemas S1 y S2 pero las diferencias no fueron significativas. Por otra parte, se observó que se produjo un aumento en la luminosidad durante el tiempo de almacenamiento para los tres sistemas, siendo más marcado este aumento durante el almacenamiento a 45 °C. Este cambio fue observado también por Khan y Giridhar (2014) cuando evaluaron la estabilidad térmica de las betalaínas y el color, a 90°C por 36 minutos, en muestras de jugo de frutos rojos.

Para los sistemas S1 y S2 a tiempo inicial, para las tres temperaturas de almacenamiento, se observaron valores mayores en el parámetro a^* que en el sistema S3, o sea un aumento del pH causó una disminución de los rojos y esto es acorde con la información referente al contenido inicial de betacianinas (**Figura 4.17**). Se observó que a pH 3,6 (S1) los valores de a^* se mantuvieron constantes durante el tiempo de almacenamiento a temperatura de 5°C y 25 °C e incluso a 45°C hasta el día dos, lo que es coherente con la mayor estabilidad de las betacianinas a pHs bajos. En cambio a pH 6,3 y 8,0 se observó pérdida de los rojos con el tiempo de almacenamiento a 45 °C (**Figura 4.18**).

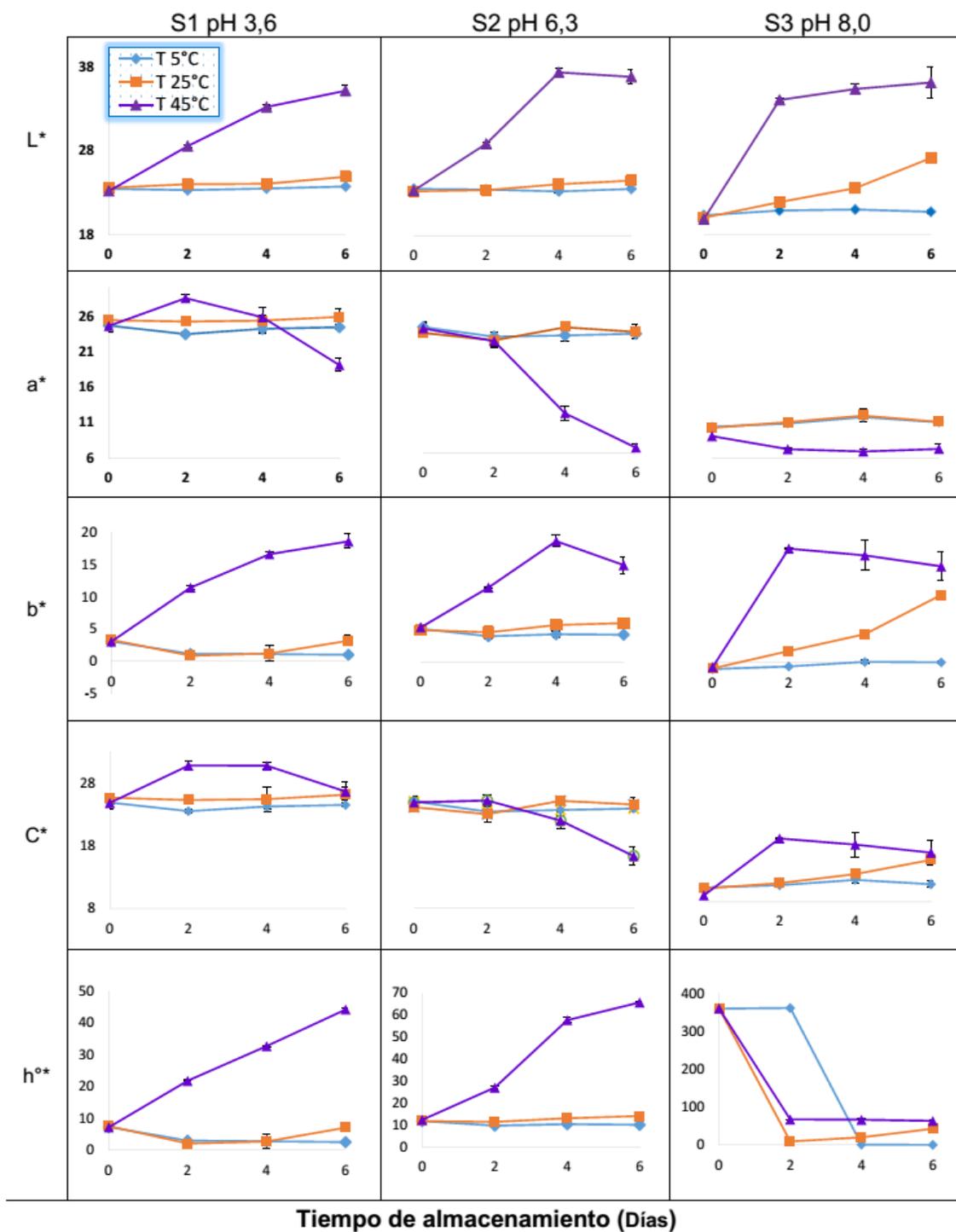


Figura 4.18. Parámetros CIELab de los sistemas modelos almacenados a 5 °C (azul), 25°C (naranja) y 45 °C (lila).

El parámetro b* no presentó una tendencia clara a temperatura de 5°C. A 25 °C, aumentó para el sistema S3. Para los sistemas almacenados a 45°C, el

parámetro b^* aumentó, en general, durante el tiempo de almacenamiento lo que significa un aumento del color amarillo, lo cual podría ser atribuido a la destrucción de las betacianinas y/o a la formación de compuestos de pardeamiento por reacciones de degradación de las betalaínas (Herbach et al.2006a).

A 5 y 25 °C, el parámetro hue mostró, en general, que los colores se mantenían en los rosas-rojos. A la más alta temperatura estudiada, dicho parámetro, mostró un corrimiento desde los rosas a los anaranjados-amarillos.

La saturación de color no presentó una tendencia clara pero disminuyó con el tiempo de almacenamiento a 45 °C y pH 6,3.

En la **Figura 4.19** se caracteriza fotográficamente la influencia que tiene el pH y la temperatura sobre la estabilidad del color de los sistemas modelos. Se observa que los sistemas mantuvieron más eficientemente el color rojo inicial, con el tiempo de almacenamiento, a temperatura de 5°C. Pero en el sistema S3 se perdieron los rojos y ello podría deberse al descenso del parámetro b^* tendiendo a los azules.

Cuando los sistemas modelo fueron almacenados a temperatura de 25°C, se visualiza que en los sistemas S1 (pH 3,6) y S2 (pH 6,3) se conservó el color rojo inicial durante el tiempo de almacenamiento. En cambio, en el sistema S3 a pH 8,0, se perdieron los rojos y ello podría deberse al valor negativo del parámetro b^* tendiendo a los azules. Y a partir del día cuatro de almacenamiento se observa la aparición de color amarillo/pardo (aumento de b^*), demostrando el efecto del cambio del pH en la estabilidad del color.

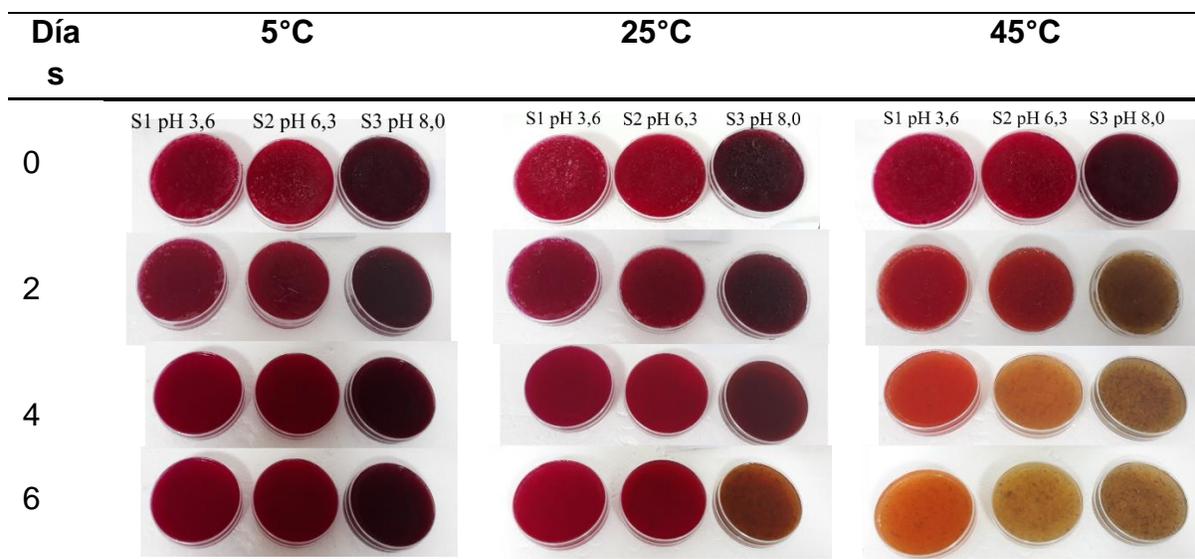


Figura 4.19. Visualización del color de los sistemas modelo obtenidos a diferentes temperaturas.

El almacenamiento de los sistemas a 45°C tuvo una fuerte influencia en la estabilidad del color. A todos los pHs, la degradación de las betalaínas determinó la aparición de colores amarillo/naranjas/pardos y esto ocurrió antes a pH 8,0 y 6,3 y después para el pH 3,6. A pHs de 6,3 y 8,0 se observaron colores pardos al final del almacenamiento. Como se comentó previamente, las agliconas de las betacianinas pueden sufrir oxidación y el producto oxidado podría sufrir pardeamiento con aparición entonces de coloraciones marrones (Stintzing & Carle, 2004). También azúcares eventualmente presentes podrían favorecer o determinar la ocurrencia de dicha reacción.

4.3.9. Conclusiones parciales sobre la estabilidad frente a la temperatura de las betalainas presentes en los polvos liofilizados de remolacha e incluidas en sistemas modelo

Los sistemas modelo de actividad acuosa 0,98 mostraron un claro efecto de las temperaturas de 25°C y 45 °C sobre las betacianinas y betaxantinas, a través de los estudios de los espectros, contenido de pigmentos y parámetros de color. La disminución de las mismas fue mayor para los sistemas almacenados a 45°C, lo cual podría comprometer el color de los sistemas.

Las betacianinas, presentaron una tendencia al incremento de la degradación con el aumento de pH en el sistema modelo. Y a 25°C presentaron la menor degradación a pH 3,6. Las betaxantinas a 25°C presentaron una mayor estabilidad a pH 8 que las betacianinas.

A 5 y 25 °C, el parámetro hue mostró que, en general, los colores se mantenían en los rosas-rojos. A 45 °C se observó un corrimiento desde los rosas a los anaranjados-amarillos.

Se concluye entonces que la temperatura y el pH son factores importantes sobre la estabilidad del pigmento en los sistemas modelos, afectando el contenido de betalainas y el color.

En base a estos resultados, se concluye que estos polvos serían adecuados para aportar color rojo a alimentos de bajo pH y almacenados a temperatura de refrigeración. Es de destacar que es necesario explorar el efecto de la actividad acuosa del alimento en las tendencias observadas con el objetivo

de determinar en que grado las mismas son afectadas por este parámetro. Ello permitirá concluir acerca de la posibilidad de uso de estos polvos colorantes en otros alimentos que requieran mayores temperaturas y tiempos de almacenamiento y que estén en este rango de pHs.

4.4. Análisis cromatográfico de betalaínas presentes en los polvos y aguas de escaldado de tejidos de remolacha sin y con almacenamiento a 45 °C

A los fines de identificar las betalaínas presentes en los polvos (método de escaldado B, menor granulometría) y aguas de escaldado (método B), se realizó el análisis cromatográfico de estos productos.

4.4.1. Análisis cromatográfico de betalaínas presentes en los polvos con y sin tratamiento térmico a 45 °C

Los compuestos betalámicos presentes en los polvos liofilizados de remolacha sin(I) y con almacenamiento a 45 °C por 6 días (II), se determinaron mediante HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/MS a partir de los extractos concentrados metanólicos, con el fin de analizar el efecto de la temperatura sobre estos pigmentos contenidos en una matriz sólida y de baja actividad acuosa. Los compuestos se identificaron por comparación de sus $\lambda_{\text{máx}}$, tiempos de retención (tr) y espectros MS/MS, con datos de bibliografía (Herbach et al., 2004; Nemzer et al., 2011; Sawicki et al., 2016).

Del análisis de los cromatogramas de HPLC-DAD registrados a 470 y 530 nm de longitud de onda (**Figura 4.20**) se confirmó que los principales pigmentos betalámicos presentes en estos polvos pertenecen a la familia de las betacianinas

(bc), con un máximo de absorbancia en el espectro UV/visible a 530 nm, siendo los responsables del color rojo intenso y a la familia de betaxantinas (bx), con un máximo a 470 nm otorgando el color amarillo.

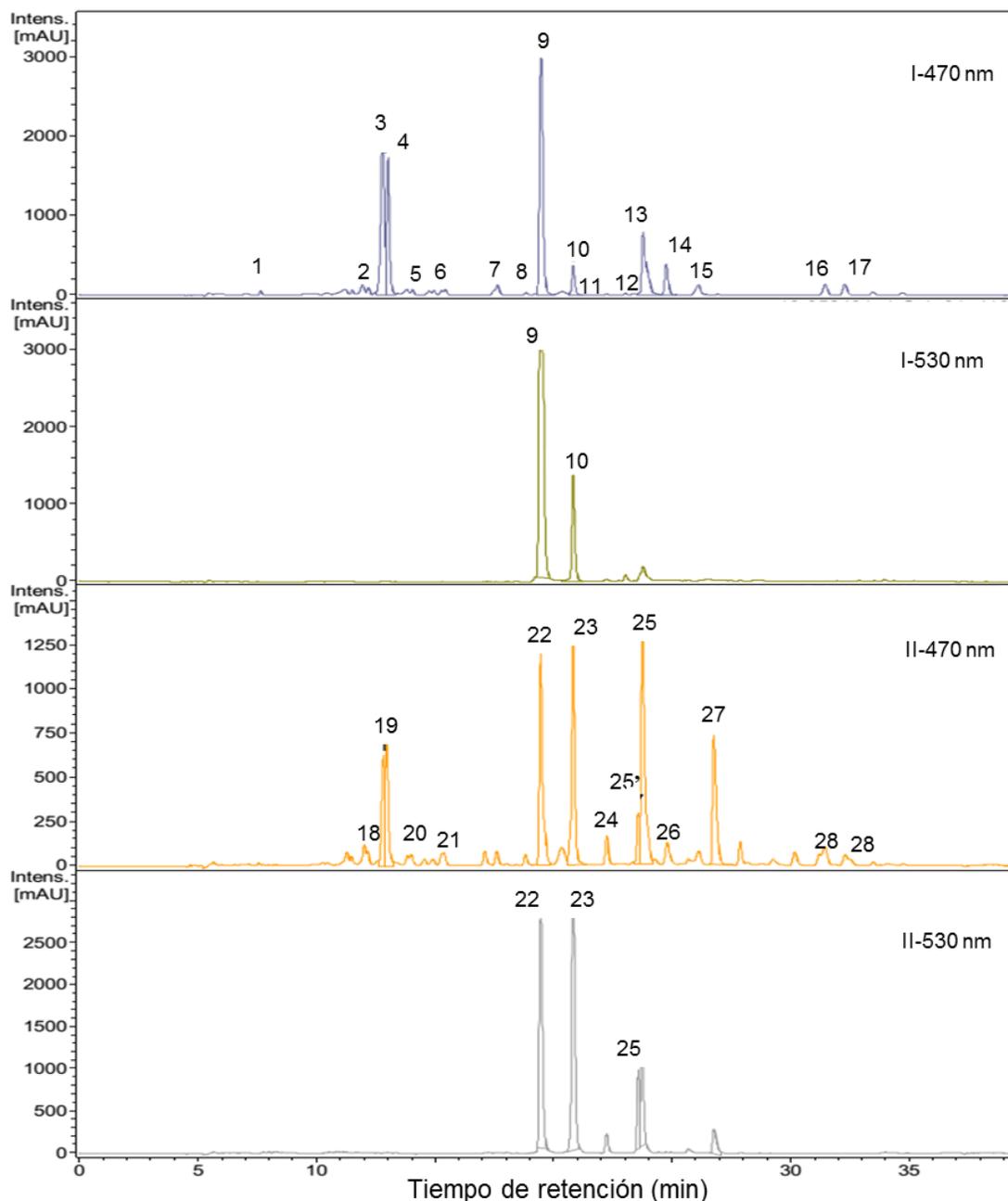


Figura 4.20. Cromatogramas de HPLC-DAD obtenidos a longitudes de onda de 470 y 530 nm. Polvos sin (I) y con almacenamiento de 6 días a 45°C (II).

En los polvos sin tratamiento térmico se pudieron identificar los compuestos betalámicos que se presentan en la **Tabla 4.21**. Dentro de los pertenecientes a la familia de las betaxantinas (**Figura 4.20** I-470 nm), principalmente se pudo identificar a la vulgaxantina I (glutamina bx) correspondiente al pico 3 y 4 dando origen a los iones pseudomoleculares $[M+H]^+$ de m/z 340,1155 y 340,1141 ($C_{14}H_{18}N_3O_7$) respectivamente, presentando en sus espectros MS/MS dos fragmentos característicos, uno de m/z 323,0893 $[M+H -17]^+$ que se forma por la eliminación de un hidroxilo, y otro de m/z 277,0828 $[323 - 46]^+$ originado por la descarboxilación y di-deprotonación (Sawicki, Bączek & Wiczowski, 2016). Según lo observado se podría inferir que estos dos compuestos (picos 3 y 4) que presentan la misma $\lambda_{\text{máx}}$ y espectro MS/MS son los dos diastereoisómeros posibles de la vulgaxantina I por las configuraciones que puede tener el C11.

También se pudieron identificar, aunque se encuentran en baja proporción, serina bx, vulgaxantina II, III y IV, isoindicaxantina y miraxantina V, entre otras. Esta familia de compuestos presenta fragmentaciones características que corresponden a pérdida de los aminoácidos correspondientes, desaminaciones y descarboxilaciones.

Tabla 4.21. Análisis de los compuestos betalámicos por HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/MS de los polvos de remolacha sin tratamiento térmico (I).

Nº Pico	Betacianina	Betaxantina (bx)		Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	MS (M+H) ⁺	MS/MS (M+H) ⁺
		Nombre común	Aminoácido / amina					
1		Vulgaxantina III	Asparagina bx	C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₇	7,8	471	326,0971	-
2			Serina bx	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₇	11,9	470	299,0888	-
3		Vulgaxantina I	Glutamina bx	C ₁₄ H ₁₈ N ₃ O ₇	12,8	470	340,1155	323,0893 277,0827
4		Iso-Vulgaxantina I	Glutamina bx	C ₁₄ H ₁₈ N ₃ O ₇	13	470	340,1141	323,0893 277,0828
5	2,17-Bidecarboxi-2,3-dehidro-neobetanina			C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₉	14	463	459,1574	330,1123
6		Vulgaxantina II	Acido glutámico bx	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₈	14,9	471	341,0986	194,0441 150,0580
7			γ -Acido amino butírico bx	C ₁₃ H ₁₇ N ₂ O ₆	17,5	463	297,1071	-
8		Isoindicaxantina/ Indicaxantina	Prolina/ Iso bx	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₆	18,7	477	309,1060	-
9	Betanina			C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₁₃	19,5	533	551,1502	389,0951
10	Isobetanina			C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₁₃	20,8	533	551,1502	389,0951
11		Miraxantina V	Dopamina bx	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₆	21,8	456	347,1211	303,1353 211,0725 137,0598
12		Portulacaxantina	Tirosina bx	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₇	22,8	472	375,1177	211,0812 178,0662
13	Neobetanina (4,15-dehidrobetanina)			C ₂₄ H ₂₅ N ₂ O ₁₃	23,8	465	549,1307	387,0739
14			Valina bx/Isovalina bx	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₆	24,6	466	311,1221	267,1286 221,1298 193,1312 150,0542
15		Vulgaxantina IV	Leucina bx	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₆	26,2	470	325,1363	281,1470
16			Fenilalanina bx	C ₁₈ H ₁₉ N ₂ O ₆	31,2	470	359,1200	-
17			Triptófano bx	C ₂₀ H ₂₀ N ₃ O ₆	32,1	472	398,1330	-

De la familia de las betacianinas (**Figura 4.20**, I-530 nm), se identificaron en los tiempos de retención (tr) de 19,5 y 20,8 min. (**Figura 4.20** I-530 nm, picos 9 y 10), la betanina e isobetanina (Wybraniec 2007; Sawicki et al., 2016), mostrando en el espectro MS el ion pseudomolecular [M+H]⁺ con m/z de 551,1501

($C_{24}H_{27}N_2O_{13}$) y, en el espectro de MS/MS, un fragmento característico de m/z 389,0951 $[M+H - 162]^+$ el cual se forma por la pérdida de la molécula de glucosa dando lugar a la presencia de agliconas $[betanidina +H]^+$ o $[isobetanidina +H]^+$.

Además, se encontró la neobetánina (**Figura 4.20**, I-470 nm, pico 13) con un t_r mayor (23,8 min) en relación con betánina e isobetánina, un $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 465 nm debido a que presenta un doble enlace extra, el cual cambia la resonancia generando el corrimiento de la $\lambda_{m\acute{a}x}$, dando en el espectro de masa un ion $[M+H]^+$ de m/z 549,1307 y en el espectro de MS/MS un fragmento de 387,0739 también formado por la pérdida de la molécula de glucosa, ruptura característica de estos compuestos (Sawicki, Bączek & Wiczowski, 2016).

En la **Figura 4.20** y **Tabla 4.22** se muestran los resultados del análisis por HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/MS de los compuestos betalámicos, obtenidos a partir de los polvos de remolacha que fueron almacenados durante 6 días a 45°C (II).

Al comparar los cromatogramas de los polvos tal cual (I) y tratados térmicamente (II) (**Figura 4.20**) se observó que algunas betaxantinas son más sensibles a la temperatura, ya que los picos 1,7 ,8 ,12 y 16 correspondientes a la asparagina bx, γ -ácido aminobutírico bx, prolina/Iso bx, tirosina bx y fenilalanina bx respectivamente, no aparecieron en el cromatograma II-470.

Tabla 4.22: Análisis de los compuestos betalámicos por HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/MS de los polvos de remolacha almacenados a 45 °C durante 6 días.

Nº PI/PII	Betacianina	Betaxantina (bx)		Fórmula molecular	Tiempo retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	MS (M+H) ⁺	MS/MS [M+H] ⁺
		Nombre común	Aminoácido/ amina					
2/18			Serina bx	C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₇	11,8	471	299,0888	-
3,4/19		Vulgaxantina I	Glutamina bx	C ₁₄ H ₁₈ N ₃ O ₇	12,8	470	340,1143	323,0827 277,0893
5/20	2,17 Bidecarboxi- 2,3-dehidro- neobetánina			C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₉	14	463	459,1575	-
6/21		Vulgaxantina II	Acido glutámico bx	C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₈	15	471	341,0995	-
9,10/22	Betanina			C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₁₃	19,5	536	551,1485	389,0885
9,10/23	Isobetánina			C ₂₄ H ₂₇ N ₂ O ₁₃	20,8	536	551,1523	389,0885
24	17-decarboxi betánina			C ₂₃ H ₂₇ N ₂ O ₁₁	21,9	515	507,1629	345,1127
13/25	Neobetánina (4,15- dehidrobetánina)			C ₂₄ H ₂₅ N ₂ O ₁₃	23,7	465	549,1358	387,0802
25'	2-decarboxi neobetánina			C ₂₂ H ₂₅ N ₂ O ₁₁	23,9	- ^b	505,1464	343,0877
11/26		Miraxantina V	Dopamina bx	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₆	24,8	456	347,1238	303,1353 211,0725 137,0599
14/27			Valina bx/Isovalina bx	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₆	26,6	466	311,1195	267,1286 221,1247 193,1322 150,0533
15/28		Vulgaxantina IV	Leucina bx	C ₁₅ H ₂₁ N ₂ O ₆	31,9	470	325,1363	281,1471
17/29			Triptófano bx	C ₂₀ H ₂₀ N ₃ O ₆	32,2	472	398,1354	-

b: $\lambda_{\text{máx}}$ no fue detectada debido a la co-elución con otro compuesto. PI: Número de pico correspondiente al cronograma I-470/530 nm. PII: Número de pico correspondiente al cronograma de II-470/530 nm.

Además, se observó que aparecen dos nuevos compuestos derivados de las betacianinas (**Figura 4.20**, picos 24 y 25'). El pico 24 corresponde a la 17-decarboxi betánina dando el ion pseudomolecular [M+H]⁺ de m/z 507,1629 y un fragmento MS/MS de m/z 345,1127 (507-162 (glc)) y $\lambda_{\text{máx}}$ 515nm. El pico 25' corresponde a la 2-decarboxi neobetánina, [M+H]⁺ de m/z de 505,1464 y MS/MS de m/z 343,0877 (505-162 (glc)). La 17-decarboxi betánina es el resultado de la descarboxilación de la betánina (507=551-44), y la 2-decarboxi neobetánina de la descarboxilación de la neobetánina (505=549-44). Las descarboxilaciones pueden

ocurrir en las posiciones C2, C15, C17 las cuales difieren en su susceptibilidad. Y se producen por efecto de la temperatura según fue informado por Herbach et al. (2004) en estudios de la estabilidad del jugo de remolacha al calentarlo a 85°C durante 8h.

El desplazamiento del máximo de absorbancia a 515 nm de la 17-decarboxi betanina con respecto a la betanina/isobetanina ($\lambda_{\text{máx}}$ 536 nm) se debe a la deslocalización de los electrones π por la descarboxilación del C17 (Minale, Piattelli & Nicolaus 1965; Stintzing et al., 2004). Analizando las relaciones de áreas isobetanina/betanina, neobetanina/betanina de los polvos tal cual y tratados térmicamente (**Figura 4.20**), se detecta que hubo un aumento en la relación isobetanina/betanina luego del tratamiento térmico (0,25 a 1) debido a la isomerización de la betanina a isobetanina por efecto de la temperatura (Herbach et al., 2014). Pero para la relación neobetanina/betanina el aumento que se produjo no fue importante (0,21 a 0,25). Este aumento de neobetanina debido a que, por efecto de la temperatura, ocurre la deshidrogenación de la betanina, fue informado por Herbach et al (2014) al analizar la estabilidad térmica en jugo de remolacha tratado a 85°C durante 8h, generando el cambio de color de rojo a amarillo.

Por lo tanto, tras un tratamiento térmico prolongado, pueden producirse diversidad de productos de degradación de betanina por múltiples descarboxilaciones o mediante reacciones de descarboxilación y deshidrogenación combinadas. Wybraniec (2005) y Wybraniec & Mizrahi (2005) informaron la ocurrencia de múltiples descarboxilaciones en extractos purificados

de remolacha roja y pitaya púrpura, dando lugar a betacianinas y neobetacianinas mono, di o tridecarboxiladas.

4.4.2. **Análisis cromatográfico de las aguas de escaldado con y sin tratamiento térmico a 45 °C**

Se analizaron los compuestos betalámicos presentes en las aguas de escaldado (pH 6,3) obtenidas por aplicación del método B (I) y en las mismas luego de almacenamiento a 45°C durante 2 días (II). Los resultados se muestran en la **Figura 4.21** y **Tabla 4.23**.

La identificación de estos compuestos se realizó basándose en los resultados del análisis previo de los polvos por HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/MS.

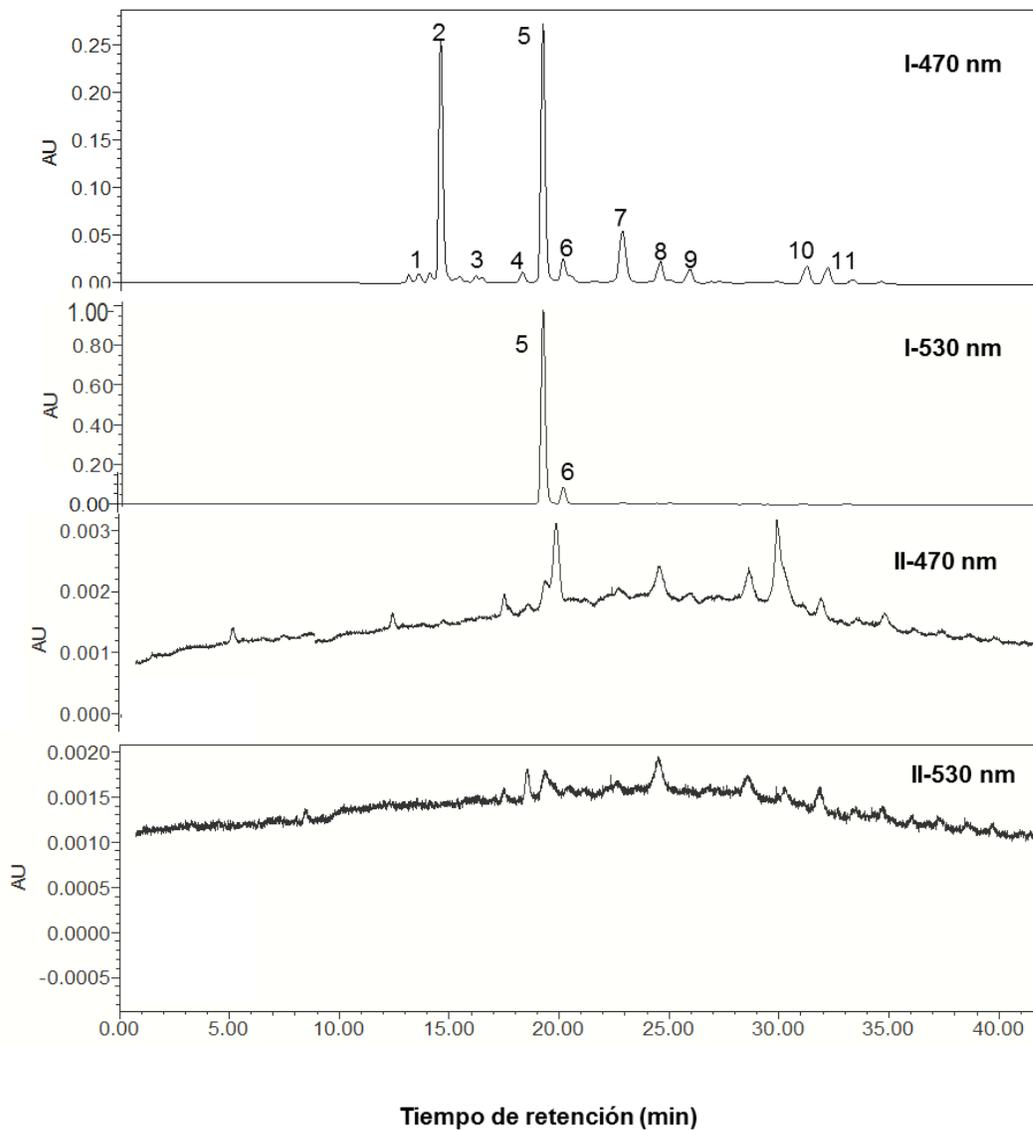


Figura 4.17. Cromatogramas de HPLC-DAD obtenidos a longitudes de onda de 470 y 530 nm de aguas de escaldado sin (I) y con almacenamiento de 2 días a 45°C (II)

Se identificaron 11 compuestos betalámicos entre betacianinas y betaxantinas, concluyéndose que se trata de los mismos que se encuentran en los polvos.

Tabla 4.23. Análisis de los compuestos betalámicos por HPLC-DAD y HPLC-ESI-MS/MS de las aguas de escaldado no tratados térmicamente

Pico	Betacianina	Betaxantina (bx)		Tiempo retención (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
		Nombre común	Aminoácido amina		
1			Serina bx	14,0	471
2		vulgaxantina I	Glutamina bx	14,5	470
3	2,17-Bidecarboxi-2,3-dehidro-neobetanina			16	463
4		Isoindicaxantina/ Indicaxantina	Prolina Iso bx/bx	18,5	477
5	Betanina/Isobetanina			19,5	536
6	Betanina/Isobetanina			20,5	536
7		Miraxantina V	Dopamina bx	22,5	456
8		Portulacaxantina	Tirosina bx	24,5	472
9	Neobetanina (4,15-dehidrobetanina)			26,0	464
10		Vulgaxantina IV	Leucina bx	31,5	470
11			Fenilalanina bx	32,0	470

Cuando las aguas de escaldado se almacenaron a 45 °C durante cuatro días, se observó en los análisis de HPLC-DAD (**Figura 4.17**) que, a partir del segundo día de almacenamiento, se produce una degradación casi total de los compuestos betalámicos provocando la decoloración de las muestras por la pérdida de las betacianinas y betaxantinas.

4.4.3. **Conclusiones parciales sobre el análisis cromatográfico de betalaínas en polvos y aguas de escaldado**

Se identificaron 16 compuestos betalámicos en polvos de remolacha utilizando métodos cromatográficos y se comprobó que un tratamiento térmico a 45 °C durante 6 días, afectaba la estabilidad química de estos compuestos.

En las aguas de escaldado se identificaron 11 compuestos betalámicos. Cuando las aguas se almacenaron a 45 °C, se observó que, a partir del segundo día de almacenamiento, se producía una degradación prácticamente total de betacianinas y betaxantinas.



5. CONCLUSIONES

Se ha estudiado la estabilidad a 5, 25 y 45 °C de los pigmentos presentes en las aguas y polvos liofilizados, subproductos de la aplicación del proceso industrial de escaldado a la remolacha. Se realizó este estudio en diferentes condiciones de pH, con el fin de representar las posibles situaciones que se podrían encontrar cuando se añaden dichos pigmentos como colorante natural en productos alimenticios.

Las betalaínas en aguas de escaldado mostraron una marcada sensibilidad a la temperatura y el pH. Su uso como colorante natural se encontraría limitado por ello, condicionando su aplicación como sustituyente de colorantes sintéticos en la gama del rojo para alimentos industrializados. Esta tendencia marca la necesidad de la estabilización previa a su uso.

En el caso de los polvos liofilizados, únicamente a 45°C se observó sensibilidad a la temperatura. La degradación a dicha temperatura fue mucho menor que en las aguas de escaldado. Todo ello muestra el efecto de los sólidos de pared como material protector sobre los pigmentos.

En el caso de la inclusión de los polvos en sistemas modelo de alimentos de actividad acuosa 0,98, se observó una mayor sensibilidad de los pigmentos a temperatura y pH que en los polvos previamente estudiados. Sin embargo se debe destacar que a 5 °C y 25 °C hubo una notoria mayor estabilidad a los tres pHs (5 °C) o a pH 3,6 (25 °C), con respecto a la estabilidad de los pigmentos en las aguas mostrando entonces los beneficios de usar los polvos liofilizados como fuente de pigmentos. Se destaca la importancia de estudiar el efecto del control de la

actividad acuosa de los alimentos como factor de disminución de la degradación de los pigmentos

De manera complementaria se identificaron 16 compuestos betalámicos en polvos liofilizados de remolacha por cromatografía y se comprobó que un tratamiento térmico a 45 °C durante seis días afecta la estabilidad química de estos compuestos, produciendo una diversidad de productos de degradación de betalaínas que, como ya se dijo, afectan la posibilidad de utilización de estos polvos como colorantes naturales en alimentos que sean sometidos a un tratamiento térmico posterior a su inclusión en la formulación.

En las aguas de escaldado se encontraron 11 compuestos betalámicos entre betacianinas y betaxantinas, que se habían indentificado previamente en los polvos liofilizados. Cuando las aguas de escaldado se almacenaron a 45 °C durante cuatro días, se observó que, a partir del segundo día de almacenamiento, se produce una degradación casi total de los compuestos betalámicos provocando la decoloración de las muestras por la pérdida de las betacianinas y betaxantinas confirmando que los compuestos son más sensibles a los efectos térmicos cuando presentes en las aguas que en los polvos.

Se espera que los resultados de esta investigación colaboren al agregado de valor a la materia prima alimenticia *Beta vulgaris* L. variedad *conditiva*, contribuyendo así a su aprovechamiento integral así como al desarrollo de tecnologías limpias de industrialización y al desarrollo de alimentos sanos.



6. BIBLIOGRAFÍA

Agricultura Argentina (2017). El Sur del Sur. Recuperada el 7 de diciembre del 2017: <http://surdelsur.com/es/agricultura-argentina/>.

Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Ore, F. D., Benajiba, A., & Puigserver, A. (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Journal of Food Science*, 66(7), 926-931.

Alard, D., Wray, V., Grotjahn, L., Reznik, H., & Strack, D. (1985). Neobetanin: isolation and identification from *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, 24(10), 2383-2385.

Allegra, M., Furtmüller, P. G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Tesoriere, L., Livrea, M. A., & Obinger, C. (2005). Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(3), 837-844.

Amin, K. A., Hameid II, H. A., & Elsttar, A. A. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994-2999.

Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.

Attoe, E. L., & Elbe, J. H. (1981). Photochemical degradation of betanin and selected anthocyanins. *Journal of Food Science*, 46(6), 1934-1937.

Azeredo, H. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International journal of food science & technology*, 44(12), 2365-2376.

Azeredo, H. M., Santos, A. N., Souza, A. C., Mendes, K. C., & Andrade, M. I. R. (2007). Betacyanin stability during processing and storage of a microencapsulated red beetroot extract. *American Journal of Food Technology*, 2(4), 307-312.

Belhadj Slimen, I., Najar, T., & Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(4), 675-689.

Bilyk, A., Kolodij, M. A., & Sapers, G. M. (1981). Stabilization of red beet pigments with isoascorbic acid. *Journal of Food Science*, 46(5), 1616-1617.

Bilyk, A. (1981). Extractive fractionation of betalains. *Journal of Food Science*, 44(4), 1249-1251.

Boyer, J. S. (2009). Evans Review: Cell wall biosynthesis and the molecular mechanism of plant enlargement. *Functional Plant Biology*, 36(5), 383-394.

Brownleader, M. D., Jackson, P., Mobasheri, A., Pantelides, A. T., Sumar, S., Trevan, M., & Dey, P. M. (1999). Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(2), 149-164.

- Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 370-376.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288-2294.
- Cai, Y. Z., & Corke, H. (2001). Effect of Postharvest Treatments on Amaranthus Betacyanin Degradation Evaluated by Visible/Near-Infrared Spectroscopy. *Journal of food science*, 66(8), 1112-1118.
- Cai, Y. Z., & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. *Journal of food science*, 65(7), 1248-1252.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (1998). Colorant properties and stability of Amaranthus betacyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4491-4495.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399.
- Carpita, N. (2000). The cell wall. *Biochemistry and molecular biology of plants*, 52-109.
- Carpita, N.C. (1990). *The chemical structure of the cell walls of higher plants*. En: Dietary Fiber: Chemistry, Physiology and Health Effects. D. Kritchevsky, C. Bonfield and J. W. Anderson (Eds.). Plenum Press, New York. Pp. 15-30.
- Castellar, M. R., Obón, J. M., & Fernández-López, J. A. (2006). The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 122-128.
- Castellar, R., Obón, J. M., Alacid, M., & Fernández-López, J. A. (2003). Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(9), 2772-2776.
- Cejudo-Bastante, M. J., Hurtado, N., Mosquera, N., & Heredia, F. J. (2014). Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (*Ullucus tuberosus*) extracts under different pH and thermal conditions. *Food research international*, 64, 465-471.
- Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A., & Wittwer, F. G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*, 33(3).
- Código Alimentario Argentino (CAA) (2018). Capítulo XVIII. *Alimentos lácteos*. Recuperado el 24 de enero del 2018 en http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf

- Coseteng, M. Y., & Lee, C. Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52(4), 985-989.
- Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850.
- Czapski, J. (1990). Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 191(4-5), 275-278.
- Davies, K. (Ed.). (2009). *Annual plant reviews, plant pigments and their manipulation* (Vol. 14). John Wiley & Sons.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3), 173-289.
- Desai, K. G. H., & JinPark, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- Drunkler, D. A., Fett, R., & Luiz, M. T. B. (2006). The evaluation of stability of betalains in beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract add to of α -, β - and γ -cyclodextrins. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(1).
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Boletín 3. Febrero de 2016. Pérdidas y desperdicios de alimentos en América Latina y el Caribe. Recuperado el 6 de agosto de 2017. <http://www.fao.org/3/a-i5504s.pdf>
- FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2001. General Standard for Food Additives. CODEX STAN 192, Rev.3-2001.
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488.
- Filisetti-Cozzi, T. M., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry*, 197(1), 157-162.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual review of plant physiology*, 37(1), 165-186.
- Gandia-Herrero, F., Jimenez-Atienzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., & Escribano, J. (2010). Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10646-10652.

- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2016). Biological activities of plant pigments betalains. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(6), 937-945.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: natural plant pigments with potential application in functional foods. *Food Science and Technology*, 64(2), 645-649.
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of research of the national bureau of standards*, 81(1), 89-96.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., & Myhrstad, M.C.W. (2002). A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition*, 132, 461–471.
- Han, D., Kim, S.J., & Kim, D.M. (1998). Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. *Journal of Food Science* 63, 69–72.
- Harris, N. N., Javellana, J., Davies, K. M., Lewis, D. H., Jameson, P. E., Deroles, S. C., & Schwinn, K. E. (2012). Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BMC plant biology*, 12(1), 34.
- Havlíková, L., Miková, K., & Kyzlink, V. (1983). Heat stability of betacyanins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 177(4), 247-250.
- Hendry, G. A. F., & Houghton, J. D. (Eds.). (1996). *Natural food colorants*. Springer Science & Business Media.
- Herbach, K. M., Maier, C., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Effects of processing and storage on juice colour and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice. *European Food Research and Technology*, 224(5), 649-658.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., & Carle, R. (2006a). Betalain stability and degradation – structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science* 71, R41–R50.
- Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006b). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 39(6), 667-677.
- Herbach, K. M., Stintzing, F.C., & Carle, R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *Journal of Food Science* 69, C491-498.
- Huang A.S. & von Elbe JH. (1987). Effect of pH on the degradation and regeneration of betanine. *Journal of Food Science* 52, 1689–93.
- İnanç, A. L. (2011). Chlorophyll: Structural Properties, Health Benefits and Its Occurrence in Virgin Olive Oils. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 9(2), 26-32

Industria Alimentaria, (2012). Los Colores dan Vida al Mercado Global. Recuperado el 15 de agosto 2017, de <https://www.industriaalimenticia.com/articulos/85942-los-colores-dan-vida-al-mercado-global>.

Itle R.A., Kabelka E.A. 2009. Correlation between L*a*b* color space values and carotenoid content in pumpkins and squash (*Cucurbita* spp.). *Horticultural Science*, 44(3), 633-637.

Jackman, R. L., & Smith, J. L. (1996). Anthocyanins and betalains. In *Natural food colorants* (pp. 244-309). Springer, Boston, MA.

Jarvis, M.C (2011). Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids*.25 (2011) 257–262.

Khan, M. I., & Giridhar, P. (2014). Enhanced chemical stability, chromatic properties and regeneration of betalains in *Rivina humilis* L. berry juice. *LWT-Food Science and technology*, 58(2), 649-657.

Kapadia, G.J., Tokuda, H., Konoshima, T. & Nishino, H. (1996). Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Letters*, 100, 211–214.

Knox, J. P. (2008). Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 308-313.

Kugler, F., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Identification of betalains from petioles of differently colored Swiss chard (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla* [L.] Alef. Cv. Bright Lights) by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(10), 2975-2981.

Kujala, T., Loponen, J., & Pihlaja, K. (2001). Betalains and phenolics in red beetroot (*Beta vulgaris*) peel extracts: extraction and characterisation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(5-6), 343-348.

Latorre, M.E., Narvaiz, P., Rojas, A.M., Gerschenson, L.N. (2010). Effects of gamma irradiation on bio-chemical and physico-chemical parameters of fresh-cut red beet (*Beta vulgaris* L. var. *conditiva*) root. *Journal of Food Engineering*. 98 (2), 178–191

Latorre, M. E. (2011). Influencia de las radiaciones gamma y de microondas en las características químicas, bioquímicas y mecánicas de tejidos vegetales con especial referencia a *Beta vulgaris* L. var. *conditiva*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

Laufenberg G., Kunz B., & Nystroem M., (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, 167-198.

- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spraydrying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids* 21, 928-935.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- MacDougall D. B. (2001). *Intrumentation and sensors for food industry*. Chapter 3: Principles of colour measurement for food. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC.
- Manchali, S., Murthy, K. N. C., Nagaraju, S., & Neelwarne, B. (2013). Stability of betalain pigments of red beet. *In Red beet biotechnology* (pp. 55-74). Springer, Boston, MA.
- Marangoni, A. G., Jackman, R. L., & Stanley, D. W. (1995). Chilling-associated softening of tomato fruit is related to increased pectinmethylesterase activity. *Journal of Food Science*, 60(6), 1277-1281.
- Martínez, H. M. (2010). Plasticidad estructural de la pared celular tipo II en cultivos celulares de maíz (*Zea mays* L.) habituados a diclobenil. Universidad de León.
- May C.D.(2000). Phillips & P.A. Williams (Eds) Handbook of Food Hydrocolloids. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, England
- McGuire, R. 1992. Reporting of objective color measurements. *Horticultural Science*, 27(12), 1254-1255.
- McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1980). Structure of plant cell walls: X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant physiology*, 66(6), 1128-1134.
- Minale, L., Piattelli, M., & Nicolaus, R. A. (1965). Pigments of centrospermae—IV: On the biogenesis of indicaxanthin and betanin in *Opuntia ficus-indica* Mill. *Phytochemistry*, 4(4), 593-597.
- Moore, R., Clark, W.D., & Vodopich, D.S (1996). "Botany". 2nded. Páginas. 56, 60, 67. WCB/McGraw-Hill, Boston.
- Mokrzycki, W. S., & Tatol, M. (2011). Colour difference ΔE -A survey. *Machine Graphics and Vision*, 20(4), 383-411.
- Morales, M., Sáenz, C., & Robert, P. (2007, October). Bioactive compounds in toppings from colored cactus pear cultivated in Chile. In *VI International Congress on Cactus Pear and Cochineal 811* (pp. 127-130).
- Moreiras, O., Carbajal; Cabrera, L. & Cuadrado, C. (2010). Tablas de Composición de Alimentos. Pirámide Ediciones S.A, España.

- Moßhammer, M.R., Stintzing, F.C. & Carle, R. (2006). Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear. *Innovative Food Science & Emerging Technology* 7, 275– 287.
- Moßhammer, M. R., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2005). Development of a process for the production of a betalain-based colouring foodstuff from cactus pear. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(2), 221-231.
- Muggeridge, M., & Clay, M. (2001). Quality specifications for herbs and spices. *Handbook of herbs and spices*, 1, 13-21.
- Nemzer, B., Pietrkowski, Z., Spórna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michałowski, T., & Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food chemistry*, 127(1), 42-53.
- Newbery D.E., & Ritchie N.W. (2013). Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDS) Quantitative?. *Scanning*, 35(3), 141-168
- Ng, A., Parr, A. J., Ingham, L. M., Rigby, N. M., & Waldron, K. W. (1998). Cell wall chemistry of carrots (*Daucus carota* Cv. Armstrong) during maturation and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2933-2939.
- Niklas, K. J (2004). The cell walls that bind the tree of life . *Bioscience*. 54, 831–841
- Otálora, M.C., Carriazo, J.G., Iturriaga.L., & Osorio.C.E.(2016). Encapsulating betalains from *Opuntia ficus-indica* fruits by ionic gelation: Pigment chemical stability during storage of beads. *Food Chemistry*. 202, 373–382
- Oudgenoeg, G., Dirksen, E., Ingemann, S., Hilhorst, R., Gruppen, H., Boeriu, C. G., ... & Voragen, A. G. (2002). Horseradish peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid on a template of a tyrosine-containing tripeptide. *Journal of Biological chemistry*, 277(24), 21332-21340.
- Pasch, J. H., & Von Elbe, J. H. (1979). Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. *Journal of food Science*, 44(1), 72-75.
- Piattelli, M. (1981). The betalains: structure, biosynthesis, and chemical taxonomy. *The biochemistry of plants*, 557-575.
- Pitalua, E., Jimenez, M., Vernon-Carter, E. J., & Beristain, C. I. (2010). Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2-3), 253-258.
- Pokorny J., Yanishlieva N., y Gordon M. (2005). *Antioxidantes de los alimentos*. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.

Ravichandran, K., Palaniraj, R., Saw, N. M. M. T., Gabr, A. M., Ahmed, A. R., Knorr, D., & Smetanska, I. (2014). Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of food science and technology*, 51(9), 2216-2221.

Reshmi, S. K., Aravindhan, K. M., & Suganyadavi, P. (2012). The effect of light, temperature, pH on stability of betacyanin pigments in basella alba fruit. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 4(3), 107-110.

Rivas, A., Biengino, C., Alvarez de Toledo, B., Franco, D. (2015). Ejercicio de estimación de las pérdidas y desperdicio de alimentos (PDA) en Argentina. Dirección de Agroalimentos (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Ministerio de Agroindustria).

Sáenz, C., Tapia S., Chavez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry* 114, 616–622.

Saguy, I. (1979). Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthin–I): influence of pH and temperature. *Journal of Food Science*, 44(5), 1554-1555.

Saguy, I., Kopelman, I.J., & Mizrahi S. 1978. Thermal kinetic degradation of betanine and betalamic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 360–2.

Sanchez-Gonzalez, N., Jaime-Fonseca, M. R., San Martin-Martinez, E., & Zepeda, L. G. (2013). Extraction, stability, and separation of betalains from *Opuntia joconostle* cv. using response surface methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(49), 11995-12004.

Sapers, G. M., & Hornstein, J. S. (1979). Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. *Journal of Food Science* 44, 1245-1248.

Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., & Ochi, H. (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 37-41.

Savolainen, K., & Kuusi, T. (1978). The stability properties of golden beet and red beet pigments: influence of pH, temperature, and some stabilizers. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 166(1), 19-22.

Sawicki, T., Bączek, N., & Wiczkowski, W. (2016). Betalain profile, content and antioxidant capacity of red beetroot dependent on the genotype and root part. *Journal of Functional Foods*, 27, 249-261.

Serris, G. S., & Biliaderis, C. G. (2001). Degradation kinetics of beet root pigment encapsulate in polymeric matrices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 691–700.

Sing de Ugaz ,O. L.,(1997), *Colorantes Naturales*. Ponteficia Universidad Catonica del Perú. Fondo Editorial. Lima, Perú

Socaciu, C. (Ed.). (2007). *Food colorants: chemical and functional properties*. CRC Press.Boca Raton. Florida.

Sokal, R.R., & Rohlf, J.B. (2000). *Biometry*. The principles and practice of statistics in biological research. San Francisco: WH Freeman and Company, pp 253-380.

Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Betalains–emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science & Technology*, 18(10), 514-525.

Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., & Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442-451.

Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in food science & technology*, 15(1), 19-38.

Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002). Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2302-2307.

Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.

Swarna, J., Lokeswari, T. S., Smita, M., & Ravindhran, R. (2013). Characterisation and determination of in vitro antioxidant potential of betalains from *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd. *Food chemistry*, 141(4), 4382-4390.

Tapia, S.2007. Micro encapsulación de compuestos bioactivos de tuna(*Opuntia ficus-indica*).Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agropecuarias, mención Producción Agroindustrial.Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago, Chile. 69p

Tesoriere, L., Butera, D., Allegra, M., Fazzari, M., & Livrea, M.A. (2005). Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1266-1270.

The Pubchem Project. (2018). Recuperada el 14 de febrero del 2018 en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Torres, V. (2008). Microencapsulación de “polifenoles y betalaínas” desde un extracto acuoso de tuna (*Opuntia ficus-indica*), mediante secado por atomización. Universidad Tecnológica Metropolitana.

Tsuda, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(1), 159–170.

US Food and Drug Administration. (2018). Electronic Code of Federal regulations of federal regulations title 21. Color and Additives Part, 70.

Vaillant, F., Pérez, A., Dávila, I., Dornier, M., & Reynes, M. (2005). Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits* 60, 1–10.

Vincent, K. R., & Scholz, R. G. (1978). Separation and quantification of red beet betacyanins and betaxanthins by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 812-816.

Vincken, J. P., Schols, H. A., Oomen, R. J., Beldman, G., Visser, R. G., & Voragen, A. G. (2003). *Pectin—the hairy thing*. In *Advances in pectin and pectinase research* (pp. 47-59). Springer, Dordrecht.

Von Elbe, J. H., Maing, I. Y., & Amundson, C. H. (1974). Color stability of betanin. *Journal of Food Science* 39, 334-337.

Von Elbe J. H. y Goldman I. L. (2000). “The betalains”, en *Natural Food Colorants*, Ed. por G. J. Lauro y F. J. Francis. Basic Symposium Series. Marcel Dekker, Nueva York.

Walton DC., & Sondheimer E. (1968). Effects of Abscisic Acid on Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Excised Bean Axes. *Plant Physiology*, 43(3), 467-469.

Wang, J. P., Zhao, X. P., Guo, H. L., & Zheng Q. (2004). Preparation of microcapsules containing two-phase core materials. *Langmuir* 20, 10845-10850.

Wybraniec, S., Starzak, K., Skopińska, A., Nemzer, B., Pietrkowski, Z., & Michałowski, T. (2013). Studies on nonenzymatic oxidation mechanisms in neobetanin, betanin, and decarboxylated betanins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(26), 6465-6476.

Wyler, H., & Dreiding, A. S. (1984). Deuterierung von Betanidin und Indicaxanthin, (E/Z)-Stereoisomerie in Betalainen. *Helvetica chimica acta*, 67(7), 1793-1800.

Xuan L., Yanxiang G., Xiaoting P., Bin Y., Honggao X., & Jian Z. (2008). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with high pressure carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 24-31.

Yilin You, Na Li, Jielong Guo, Yu Zhao, Weidong Huang and Jicheng Zhan. 2019. The effect of six phenolics acids and tannic acid on colour stability and the anthocyanin content of mulberry juice during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology*. Published online. In press.

Zou, D., Brewer, M., & Garcia, F.(2005). Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 4, 25. Plant betalains: *Chemistry and biochemistry. Phytochemistry*.117, 267–295.

Zrýd, J. P., & Christinet, L. (2009). 6 Betalains. *Annual Plant Reviews, Plant Pigments and their Manipulation*, 14, 185.



7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1. Estudio de la estabilidad de los pigmentos en los polvos de remolacha tratados a 5, 25 y 45 °C.

Materiales y Métodos

Se realizó un seguimiento de la estabilidad de los polvos de remolacha almacenados a 25, 35 y 45 °C durante 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días con el objetivo de evaluar el efecto de la temperatura en las betalaínas presentes.

Para ello, en una serie de frascos de color caramelo (30 ml) se pesaron, aproximadamente, 3,000 g de los polvos de remolacha de menor granulometría provenientes de la aplicación del método B de escaldado a los tejidos de remolacha. Posteriormente, se almacenaron durante 6 días a las temperaturas precitadas y se tomó muestra diariamente.

El material tratado fue caracterizado por: determinación de su espectro UV/Visible, determinación del contenido de betalaínas totales, color por sistema CIELab.

Resultados y Discusión

Como se observa en los gráficos y tablas adjuntadas más abajo, la única temperatura que mostró cambios significativos a lo largo del tiempo fue la de 45°C.

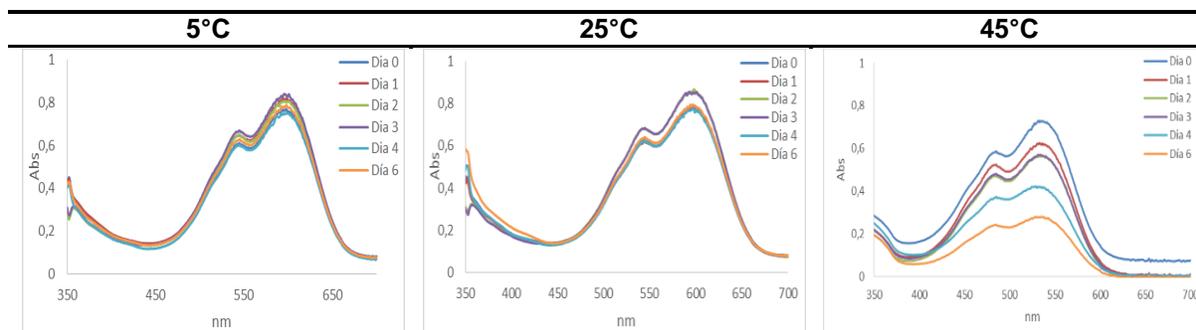


Figura . 7.1. . Espectros UV/visible de los polvos liofilizados del método B de mayor granulometría almacenados a 5,25 y 45°C y su variación con el tiempo.

Tabla 7.1. Variación de la concentración de betacianinas en polvos liofilizados de remolacha del método B de menor granulometría almacenados a 5, 25 y 45 °C.

	5°C	25°C	45°C
Días	Bc (mg/g sólido)	Bc (mg/g sólido)	Bc (mg/g sólido)
0	0,50 ^{Aa} ± 0,01	0,48 ^{Aa} ± 0,01	0,48 ^{Aa} ± 0,01
1	0,505 ^{Aa} ± 0,004	0,48 ^{Aa} ± 0,01	0,40 ^{Bb} ± 0,05
2	0,54 ^{Ba} ± 0,01	0,54 ^{Ba} ± 0,02	0,40 ^{Ba} ± 0,01
3	0,53 ^{Ba} ± 0,03	0,562 ^{Ba} ± 0,004	0,34 ^{Bb} ± 0,02
4	0,49 ^{Aa} ± 0,01	0,47 ^{Aa} ± 0,02	0,246 ^{Cb} ± 0,001
6	0,504 ^{Aa} ± 0,001	0,502 ^{Ba} ± 0,004	0,19 ^{Cb} ± 0,03

Bc: Betacianinas. Se informa el valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila y significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) entre valores de contenido de Bc. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo.

Tabla 7.2. Variación de la concentración de betaxantinas en polvos liofilizados de remolacha del método B de menor granulometría almacenados a 5, 25 y 45 °C.

	5°C	25°C	45°C
Días	Bx(mg/g sólido)	Bx(mg/g sólido)	Bx(mg/g sólido)
0	0,266 ^{Aa} ±0,005	0,262 ^{Aa} ±0,006	0,253 ^{Aa} ±0,009
1	0,267 ^{Aa} ±0,006	0,257 ^{Aa} ±0,006	0,250 ^{Aa} ±0,009
2	0,293 ^{Ba} ±0,001	0,295 ^{Ba} ±0,008	0,23 ^{ABb} ±0,01
3	0,288 ^{Ba} ±0,002	0,306 ^{Ba} ±0,005	0,20 ^{Ba} ±0,01
4	0,264 ^{Aa} ±0,002	0,255 ^{Aa} ±0,003	0,156 ^{Cb} ±0,001
6	0,269 ^{Aa} ±0,001	0,269 ^{Aa} ±0,004	0,12 ^{Db} ±0,02

Bx: Betaxantinas. Se informa el valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila y significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) entre valores de

contenido de Bx. Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo.

Tabla 7.3. Parámetros CIELab de los polvos liofilizados de remolacha del método B de menor granulometría durante el almacenamiento a 5°C.

Días	L*	a*	b*	C*	h°*
0	21,3 ^A ± 0,2	31,9 ^A ± 0,9	3,7 ^A ± 0,3	33 ^A ± 1	6,6 ^A ± 0,5
1	21,32 ^A ± 0,04	33,9 ^A ± 0,1	4,13 ^A ± 0,01	35,13 ^A ± 0,07	6,53 ^A ± 0,05
2	21,5 ^A ± 0,2	32,0 ^A ± 0,7	3,8 ^A ± 0,5	33,2 ^A ± 0,8	6 ^A ± 1
3	21,8 ^A ± 0,8	34,4 ^A ± 0,9	4,2 ^A ± 0,1	35,7 ^A ± 0,9	6,62 ^A ± 0,08
4	19,7 ^A ± 0,7	33,7 ^A ± 0,3	4,1 ^A ± 0,2	34,9 ^A ± 0,3	6,5 ^A ± 0,3
6	22 ^A ± 1	34 ^A ± 1	4,2 ^A ± 0,6	34 ^A ± 1	6 ^A ± 1

Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo.

Tabla 7.4. Parámetros CIELab de los polvos liofilizados de remolacha del método B de menor granulometría durante el almacenamiento a 25°C.

Días	L*	a*	b*	C*	h°*
0	20,43 ^A ± 0,08	32 ^A ± 2	3,7 ^A ± 0,4	33 ^A ± 2	6,6 ^A ± 0,4
1	21 ^A ± 1	32 ^A ± 1	4,3 ^A ± 0,4	33 ^A ± 1	7,1 ^A ± 0,4
2	21,4 ^A ± 0,2	33,23 ^A ± 0,07	4,7 ^A ± 0,3	34,63 ^A ± 0,02	7,4 ^A ± 0,8
3	19,9 ^A ± 0,6	29 ^A ± 1	3,9 ^A ± 0,3	31 ^A ± 1	6,7 ^A ± 0,2
4	20,6 ^A ± 0,1	30,4 ^A ± 0,5	3,9 ^A ± 0,1	31,6 ^A ± 0,5	6,3 ^A ± 0,1
6	21 ^A ± 1	33 ^A ± 3	4,3 ^A ± 0,8	34 ^A ± 3	7,4 ^A ± 0,6

Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo.

Tabla 7.5. Parámetros CIELab de los polvos liofilizados de remolacha del método B de menor granulometría durante el almacenamiento a 45°C.

Días	L*	a*	b*	C*	h°*
0	20,4 ^A ± 0,2	32 ^A ± 1	3,7 ^A ± 0,3	32,1 ^A ± 1	6,57 ^A ± 0,07
1	25,6 ^B ± 0,2	38 ^B ± 1	4 ^A ± 1	38,2 ^B ± 1	6,2 ^B ± 0,1
2	29,42 ^C ± 0,05	43,6 ^C ± 0,2	5,0 ^A ± 0,2	43,9 ^C ± 0,2	6,49 ^A ± 0,01
3	31,4 ^D ± 0,4	44 ^C ± 2	2,2 ^B ± 0,1	44,1 ^C ± 2	2,85 ^C ± 0,04
4	30,15 ^C ± 0,07	43,7 ^C ± 0,3	5 ^A ± 1	44,0 ^C ± 0,4	5,89 ^D ± 0,01
6	32,9 ^E ± 0,2	43,4 ^C ± 0,8	2,3 ^B ± 0,8	43,5 ^C ± 0,5	3,0 ^C ± 0,1

Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) con el tiempo.

De acuerdo a lo antedicho, se profundizó el estudio del efecto del almacenamiento a 45°C, para los polvos obtenidos a partir de la aplicación del método B y la menor granulometría.

7.2. ANEXO 2. Datos experimentales correspondientes al estudio realizado sobre el sistema modelo.

Tabla 7.6. Contenido de betacianinas en los sistemas modelo del alimento a diferentes pHs y temperatura, con el tiempo.

Temperatura		5°C	25°C	45°C
pH	Días	Betacianinas (mg/100g solido)	Betacianinas (mg/100g solido)	Betacianinas (mg/100g solido)
S1pH 3,6	0	0,650 ^{Aal} ± 0,016	0,59 ^{Aal} ± 0,02	0,598 ^{Aal} ± 0,006
	2	0,617 ^{Aa} ± 0,002	0,63 ^{Aa} ± 0,01	0,458 ^{Bb} ± 0,012
	4	0,618 ^{Aa} ± 0,006	0,53 ^{Ab} ± 0,03	0,172 ^{Cc} ± 0,009
	6	0,58 ^{Ba} ± 0,01	0,41 ^{Bb} ± 0,02	0,036 ^{Dc} ± 0,004
S2pH 6,3	0	0,600 ^{Aal} ± 0,03	0,587 ^{Aal} ± 0,002	0,552 ^{Acl} ± 0,005
	2	0,609 ^{Aa} ± 0,004	0,535 ^{Bb} ± 0,008	0,106 ^{Bc} ± 0,008
	4	0,608 ^{Aa} ± 0,004	0,361 ^{Cb} ± 0,01	0,026 ^{Cc} ± 0,004
	6	0,559 ^{Aa} ± 0,006	0,07 ^{Db} ± 0,02	0,012 ^{Dc} ± 0,001
S3pH 8,0	0	0,493 ^{Aall} ± 0,006	0,46 ^{Aall} ± 0,02	0,408 ^{Abll} ± 0,004
	2	0,436 ^{Ba} ± 0,009	0,24 ^{Bb} ± 0,02	0,0153 ^{Bc} ± 0,0006
	4	0,39 ^{Ca} ± 0,01	0,149 ^{Cb} ± 0,003	0,0151 ^{Bc} ± 0,0006
	6	0,414 ^{Ca} ± 0,003	0,050 ^D ± 0,001	0,009 ^{Dc} ± 0,002

Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre los sistemas modelos. Disminución de la concentración de betacianinas S1 y 5°C: 11 %; S2 y 5°C: 7 %; S3 y 5°C: 16 %. Disminución de la concentración de betacianinas S1 y 25°C: 30 %; S2 y 25°C: 88 %; S3 y 25°C: 89 %. Disminución de la concentración de betacianinas S1 y 45°C: 94 %; S2 y 45°C: 98 %; S3 y 45°C: 98 %.

Tabla 7.7. Contenido de betaxantinas en los sistemas modelo del alimento a diferentes pHs y temperatura, con el tiempo.

Temperatura		5°C	25°C	45°C
pH	Días	Betaxantinas (mg/100g solido)	Betaxantinas (mg/100g solido)	Betaxantinas (mg/100g solido)
S1pH 3,6	0	0,210 ^{Aa1} ± 0,004	0,201 ^{Aa1} ± 0,005	0,198 ^{Ab1} ± 0,002
	2	0,1998 ^{BDa} ± 0,0008	0,174 ^{Bb} ± 0,003	0,239 ^{Bc} ± 0,006
	4	0,1983 ^{CDa} ± 0,0003	0,156 ^{CEb} ± 0,002	0,137 ^{Cc} ± 0,002
	6	0,198 ^{Da} ± 0,002	0,156 ^{Deb} ± 0,004	0,062 ^{Dc} ± 0,003
S2pH 6,3	0	0,32 ^{Aa11} ± 0,02	0,313 ^{Aa11} ± 0,001	0,31 ^{Aa11} ± 0,02
	2	0,309 ^{ABa} ± 0,002	0,278 ^{Bb} ± 0,004	0,130 ^{Bc} ± 0,003
	4	0,299 ^{ABa} ± 0,001	0,21 ^{Cb} ± 0,01	0,062 ^{Cc} ± 0,007
	6	0,276 ^{Ba} ± 0,003	0,09 ^{Db} ± 0,01	0,035 ^{Dc} ± 0,001
S3pH 8,0	0	0,228 ^{Aa1} ± 0,003	0,229 ^{Aa1} ± 0,005	0,191 ^{Ab1} ± 0,001
	2	0,228 ^{Aa} ± 0,004	0,203 ^{Bb} ± 0,009	0,066 ^{Bc} ± 0,002
	4	0,201 ^{Ca} ± 0,006	0,171 ^{Cb} ± 0,002	0,047 ^{Cc} ± 0,006
	6	0,2409 ^{Da} ± 0,0003	0,1365 ^{Db} ± 0,0008	0,025 ^{Dc} ± 0,001

Valor promedio y desviación estándar (n=3). Letras minúsculas diferentes en una misma fila significa que hay diferencias significativas (p< 0,05). Letras mayúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. . Número romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre los sistemas modelos. Disminución de la concentración de betaxantinas S1 y 5°C: 6 %; S2 y 5°C: 14 %; S3 y 5°C: 0 %. Disminución de la concentración de betaxantinas S1 y 25°C: 22 %; S2 y 25°C: 71 %; S3 y 25°C: 40 %. Disminución de la concentración de betaxantinas S1 y 45°C: 69 %; S2 y 45°C: 88 %; S3 y 45°C: 87 %.

Tabla 7.8. . Parámetros CIELab de los sistemas modelo del alimento a distintos pHs y almacenados a 5°C.

	Día	L*	a*	b*	C*	h ^{o*}
S1pH 3,6	0	23,5 ^{al} ±0,1	24,7 ^{al} ±0,2	3,2 ^{al} ±0,2	24,9 ^{al} ±0,2	7,3 ^{al} ±0,3
	2	23,3 ^a ±0,3	23,5 ^a ±0,3	1,2 ^b ±0,1	23,5 ^a ±0,3	3,0 ^b ±0,3
	4	23,5 ^a ±0,1	24,2 ^a ±0,5	1,2 ^b ±0,1	24,3 ^a ±0,6	2,8 ^b ±0,3
	6	23,7 ^{a1} ±0,1	24,5 ^{a1} ±0,4	1,1 ^{b1} ±0,2	24,5 ^{a1} ±0,4	2,5 ^{b1} ±0,4
S2pH 6,3	0	23,5 ^{al} ±0,3	24,6 ^{al} ±0,8	5,1 ^{all} ±0,5	25,1 ^{al} ±0,9	11,8 ^{all} ±0,6
	2	23,5 ^a ±0,3	23,2 ^a ±0,6	4,0 ^a ±0,4	23,5 ^a ±0,7	9,8 ^a ±0,7
	4	23,2 ^a ±0,2	23,4 ^a ±0,8	4,3 ^a ±0,5	23,8 ^a ±0,9	10,4 ^a ±0,8
	6	23,5 ^{a1} ±0,2	23,6 ^{a1} ±0,2	4,2 ^{a2} ±0,04	24,0 ^{a1} ±0,2	10,1 ^{a2} ±0,1
S3pH 8,0	0	20,3 ^{al} ±0,1	10,4 ^{all} ±0,4	-0,9 ^{alll} ±0,1	10,4 ^{all} ±0,3	355 ^{all} ±1,0
	2	20,85 ^a ±0,04	10,8 ^a ±0,2	-0,6 ^a ±0,1	10,8 ^a ±0,2	357 ^b ±1,0
	4	21,0 ^a ±0,1	11,7 ^a ±0,7	0,2 ^b ±0,3	11,7 ^a ±0,7	0,8 ^c ±0,1
	6	20,7 ^{a1} ±0,3	11,0 ^{a2} ±0,5	0,1 ^{cb3} ±0,3	11,0 ^{a2} ±0,5	0,3 ^{c3} ±0,1

Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. Numero romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el dia cero entre sistemas modeo.

Tabla 7.9. . Parámetros CIELab de los sistemas modelo de alimento a distintos pHs y almacenados a 25°C.

	Día	L*	a*	b*	C*	h ^{o*}
S1pH 3,6	0	23,6 ^{al} ±0,2	25,5 ^{al} ±0,6	3,4 ^{al} ±0,3	25,7 ^{al} ±0,6	7,6 ^{al} ±0,4
	2	24,00 ^a ±0,05	25,3 ^a ±0,4	0,9 ^a ±0,3	25,3 ^a ±0,4	2,1 ^b ±0,7
	4	24,0 ^a ±0,6	25 ^a ±2	1 ^a ±1	25 ^a ±2	3 ^{ab} ±2
	6	24,9 ^{a1} ±0,3	26 ^{a1} ±1	3,3 ^{a1} ±0,8	26 ^{a1} ±1	7 ^{a1} ±1
S2pH 6,3	0	23,2 ^{al} ±0,1	23,72 ^{al} ±0,3	5,0 ^{all} ±0,2	24,2 ^{al} ±0,4	11,8 ^{all} ±0,3
	2	23,4 ^a ±0,4	23 ^a ±1	4,6 ^a ±0,5	23 ^a ±1	11,4 ^a ±0,6
	4	24,1 ^a ±0,2	24,6 ^a ±0,6	5,7 ^a ±0,2	25,2 ^a ±0,6	13,1 ^a ±0,2
	6	24,5 ^{a1} ±0,1	24 ^{a1} ±1	6,0 ^{a2} ±0,7	25 ^{a1} ±1	14,1 ^{ab2} ±0,9
S3pH 8,0	0	20,0 ^{al} ±0,2	10,2 ^{all} ±0,2	-0,8 ^{alll} ±0,1	10,3 ^{all} ±0,2	355,3 ^{alll} ±0,7
	2	21,9 ^b ±0,1	11,0 ^a ±0,5	1,8 ^b ±0,2	11,2 ^{ad} ±0,5	9,2 ^b ±0,8
	4	23,5 ^c ±0,3	11,9 ^a ±0,9	4,4 ^c ±0,2	12,7 ^{bd} ±0,9	20,1 ^c ±0,4
	6	27,1 ^{d1} ±0,3	11,1 ^{a2} ±0,4	10,3 ^{d3} ±0,3	15,1 ^{c2} ±0,5	43,0 ^{d3} ±0,1

Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. Numero romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el dia cero entre sistemas modeo.

Tabla 7.10. Parámetros CIELab de los sistemas modelo del alimento a distintos pHs y almacenados a 45°C.

	Día	L*	a*	b*	C*	h°*
S1pH 3,6	0	23,2 ^{al} ±0,4	24,65 ^{al} ±0,9	3,1 ^{al} ±0,3	24,8 ^{al} ±1,0	7,2 ^{al} ±0,4
	2	28,6 ^b ±0,2	28,57 ^b ±0,5	11,5 ^b ±0,4	30,8 ^b ±0,6	21,8 ^b ±0,3
	4	33,2 ^c ±0,2	25,87 ^c ±0,3	16,6 ^c ±0,4	30,7 ^b ±0,5	32,7 ^c ±0,3
	6	35,2 ^{d1} ±0,6	19,11 ^{d1} ±0,9	19 ^{d1} ±1	27 ^{a1} ±1	44,2 ^{d1} ±0,3
S2pH 6,3	0	23,3 ^{al} ±0,2	24,40 ^{al} ±0,7	5,4 ^{all} ±0,4	25,0 ^{al} ±0,8	12,4 ^{all} ±0,6
	2	28,9 ^b ±0,2	22,52 ^d ±0,9	11,5 ^b ±0,2	25,3 ^a ±0,8	27,1 ^b ±0,8
	4	37,3 ^c ±0,5	12 ^c ±1,0	18,7 ^c ±0,9	22 ^b ±1	58 ^c ±1,0
	6	36,8 ^{c1} ±0,9	6,74 ^{d2} ±0,5	15 ^{d1} ±1	16 ^{c2} ±1	65,7 ^{d2} ±0,3
S3pH 8,0	0	19,8 ^{all} ±0,1	9,05 ^{all} ±0,6	-0,6 ^{alll} ±0,2	9,1 ^{all} ±0,6	355,9 ^{alll} ±1,4
	2	34,1 ^b ±0,2	7,23 ^{ac} ±0,1	17,4 ^b ±0,2	18,8 ^b ±0,2	67,4 ^b ±0,2
	4	35,4 ^b ±0,6	6,88 ^{bc} ±0,3	16 ^b ±2	18 ^b ±2	67 ^b ±2
	6	36 ^{b1} ±2	7,25 ^{ac2} ±0,6	15 ^{b1} ±2	16 ^{b2} ±2	64 ^{b2} ±1

Valor promedio y desviación estándar (n=2). Letras minúsculas diferentes en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) con el tiempo al mismo pH. Numero romano diferente en una misma columna significa que hay diferencias significativas (p< 0,05) en el día cero entre sistemas modelo.