

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PIGMENTOS NATURALES  
PRESENTES EN *BETA VULGARIS* (REMOLACHA) PARA LA PROPUESTA DE  
UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA Y EVALUACIÓN DE SU ESTABILIDAD  
FISICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA**

**Informe de Tesis**

Presentado por:

Lucía Melisa Orellana Barahona

Para optar al título de

Química Farmacéutica

Guatemala, abril 2015

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A	Secretaria
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Br. Michael Javier Mó Leal	Vocal IV
Br. Blanqui Eunice Flores de León	Vocal V

## ACTO QUE DEDICO A

- A DIOS  
Por regalarme una vida maravillosa, llenarla de bendiciones y oportunidades, por estar a mi lado, cuidarme y guiarme siempre aún en los peores momentos.
- A MIS PAPÁS Y HERMANO  
Como una eterna gratitud por su valiosa, inigualable e incondicional ayuda. Los quiero.
- A MI NOVIO  
Por ser parte de mi vida, por llenar tantos años de momentos inigualables, lindos recuerdos y felicidad. Por reír, llorar, enojarnos y crecer juntos. Te amo.
- A MI FAMILIA  
Por su cariño y por cada vez que me preguntaron “¿y cómo vas?” porque de una u otra forma han estado al pendiente de mí. También a mi “Mimi” por ser mi eterna acompañante.
- A MIS AMIGOS  
Por cada momento en que necesité de su ayuda y siempre han estado allí, por darme su cariño y ser parte de mi vida.
- A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA  
Por sembrar en mí el amor a la Academia y a Guatemala, por formarme como una profesional enfocada en contribuir a engrandecer nuestro hermoso país.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por iluminar mi camino, por las oportunidades que a lo largo de mi vida me ha regalado y por permitirme llegar a este inolvidable momento.

A MIS PAPÁS Y HERMANO

A mis papás Julio Manuel Orellana y Olga Violeta Barahona y mi hermano Julio David Orellana por darme lo mejor que han podido, por su ayuda y comprensión. Gracias Mami por contarme de la monjita que se pintaba los cachetes con remolacha, porque eso inspiró este trabajo.

A LUIS CARLOS CONTRERAS JUAREZ

Por ser mi apoyo y mi mejor amigo, por cada momento que necesité y que nunca dijiste no, por darme ánimos y regañarme cuando debías.

A LA LICDA. DOMITILA JUAREZ, LIC. CARLOS CONTRERAS Y SERGIO CONTRERAS

Por los buenos consejos que me han dado, por ser mi segunda familia y por todo su cariño. No hay forma que pueda agradecerles lo suficiente por todo lo que han hecho por mí.

A MI FAMILIA

A mi abuelita, tíos, tías, primas y primos por su cariño y ayuda. A mi tío Hugo Ángel por todo el apoyo brindado. A mi prima Nancy Barahona por su optimismo y alegría.

A MIS AMIGOS

A Nandy Nufio, Candy Marroquín, Víctor Mejía, Marilyn Contreras, Analy Corado, Pamela Cifuentes, Julio Espinoza, Hugo Meza y a mis compañeros de promoción. Por su amistad sincera y por los bonitos momentos que hemos compartido.

AL LIC. RODRIGO CASTAÑEDA,  
AL LIC. GERBER SOLÓRZANO, A  
LA LICDA. NEREIDA  
MARROQUÍN, A LA LICDA.  
BEATRIZ MEDINILLA

Por su valiosa colaboración, tiempo y contribución en la realización de este trabajo, porque sin su inigualable aporte no hubiera sido posible.

A LA CORPORACIÓN  
PHARMALAT, S.A. DE  
GUATEMALA

Y a la Licda. Elizabeth Beltrán por abrirme las puertas y permitirme trabajar en sus instalaciones, porque fueron un apoyo fundamental en la realización de este trabajo de investigación.

AL DEPARTAMENTO DE  
FARMACOGNOSIA Y  
FITOQUÍMICA, AL  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS  
APLICADO Y AL DEPARTAMENTO  
DE FARMACIA INDUSTRIAL

Por el préstamo de instalaciones y materiales que fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

AL LABORATORIO DE  
INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS  
NATURALES (LIPRONAT)

Por brindarme su apoyo, prestarme el equipo, instalaciones y materiales. Por integrarme a su equipo de trabajo pero principalmente por todo ese cariño de la familia Lipronat.

A LA DRA. SULLY CRUZ

Por todo su apoyo, tiempo y contribución para guiarme de la mejor manera para que este trabajo fuera posible. Muchas gracias.

AL LIC. JULIO CHINCHILLA

Por todos sus consejos y colaboración para la realización de este trabajo.

## ÍNDICE

Título	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Colorantes naturales en relación con la Industria Cosmética	3
3.2. Efectos adversos relacionados al uso de colorante FD&C Rojo No 40	6
3.2.1. Toxicidad	6
3.2.2. Aspectos bioquímicos	8
3.3. La Remolacha ( <i>Beta vulgaris</i> )	10
3.4. Pigmentos naturales presentes en <i>Beta vulgaris</i>	15
3.4.1. Generalidades	15
3.4.2. Estructura	19
3.4.3. Biosíntesis	22
3.4.4. Fuentes	25
3.4.5. Conversión de betacianinas a betaxantinas	26
3.4.6. Estabilidad	27
3.4.6.1. pH	27
3.4.6.2. Efecto de antioxidante	28
3.4.6.3. Efecto de oxígeno	28
3.4.6.4. Efecto de secuestrantes	29
3.4.6.5. Efecto de la actividad del agua	30
3.4.6.6. Efecto de enzimas	30
3.4.6.7. Temperatura	31
3.4.6.8. Luz	34
3.4.6.9. Propiedades adicionales	34
3.5. Betanina	35
3.6. Métodos de extracción y purificación	38
3.6.1. Extracción	38
3.6.2. Aislamiento	41
3.6.3. Secado	43
3.6.3.1. Componentes de un sistema de atomización	44
3.6.3.2. Ventajas y desventajas del secado por aspersion	48
3.7. Estudios de estabilidad en cosméticos	49
3.7.1. Estabilidad Física	51
3.7.2. Estabilidad Química	51
3.7.3. Estabilidad Microbiológica	51
3.7.4. Estabilidad a largo plazo	52
3.7.5. Estabilidad a corto plazo	52
4. JUSTIFICACIÓN	53
5. OBJETIVOS	54
6. HIPÓTESIS	55
7. MATERIALES Y MÉTODOS	56
7.1. Universo (población) y muestra	56
7.2. Materiales	56

7.2.1.	Para la extracción de los pigmentos	56
7.2.2.	Para la caracterización del extracto	57
7.2.3.	Para el aislamiento de los pigmentos extraídos	57
7.2.4.	Para la producción de los cosméticos	58
7.3.	Métodos y procedimientos	59
7.3.1.	Recolección del material vegetal	59
7.3.2.	Extracción de los pigmentos de <i>Beta vulgaris</i>	59
7.3.3.	Caracterización del extracto obtenido	60
7.3.3.1.	Cromatografía en capa fina	60
7.3.3.2.	Espectrofotometría UV-VIS	61
7.3.4.	Aislamiento de los pigmentos extraídos	61
7.3.5.	Propuesta de una formulación cosmética que integre el extracto obtenido	61
7.3.5.1.	Fabricación de rubor	62
7.3.6.	Evaluación de la estabilidad	63
7.3.6.1.	Estabilidad física	64
7.3.6.2.	Estabilidad química	65
7.3.6.3.	Estabilidad microbiológica	65
7.4.	Diseño de la investigación	66
8.	RESULTADOS	67
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	71
10.	CONCLUSIONES	77
11.	RECOMENDACIONES	78
12.	REFERENCIAS	79
13.	ANEXOS	85
13.1.	Anexo 1	85
13.2.	Anexo 2	85
13.3.	Anexo 3	86
13.4.	Anexo 4	87
13.5.	Anexo 5	88
13.6.	Anexo 6	90
13.7.	Anexo 7	91
13.8.	Anexo 8	92
13.9.	Anexo 9	95

## 1. RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación consistió en la evaluación de los pigmentos de la remolacha para brindar una propuesta de una formulación cosmética, mediante la extracción por percolación, secado a través de *Spray Dryer* e incorporación de los pigmentos presentes en la remolacha en una formulación cosmética, con la consiguiente evaluación de la estabilidad fisicoquímica y microbiológica.

Esta investigación aporta una metodología para obtención de un extracto completamente seco para el aislamiento de los pigmentos presentes en la remolacha a través de una extracción acuosa por percolación y su posterior secado por equipo de *spray dryer*, lo cual permite obtener un polvo fino con el potencial para ser utilizado en una amplia gama de productos.

El análisis físicoquímico del estudio se basó principalmente en la evaluación del mantenimiento de las propiedades organolépticas y la determinación cualitativa sobre la presencia o ausencia del colorante en el cosmético, para ello el producto final se sometió a cromatografía en capa fina y espectrofotometría UV, determinando el valor de Rf y la máxima absorbancia respectivamente en comparación con los datos teóricos. La estabilidad fisicoquímica y microbiológica se evaluó con relación a la normativa vigente.

Para comprobar la calidad del cosmético formulado, éste fue sometido a un estudio de estabilidad acelerada. Al cabo de 30 días de iniciado el estudio, se verificó la integridad del producto observándose decoloración completa por lo que la investigación concluyó 60 días antes del tiempo programado, comprobando la ausencia del colorante al realizar la respectiva identificación por cromatografía en capa fina y el análisis en espectrofotómetro UV.

Sumado al incumplimiento en los parámetros organolépticos, los resultados microbiológicos describieron contaminación por mesófilos aerobios, lo cual es posible corregir al enfatizar el cuidado en las buenas prácticas de manufactura lo cual fue demostrado al realizar una prueba microbiológica a otro lote de producto que se elaboró reforzando la esterilidad en la elaboración del cosmético.

Los resultados obtenidos corresponden a lo esperado en un estudio preliminar, pese a no obtener resultados completamente satisfactorios, se genera información valiosa para continuar con estudios que apoyen la utilización de las betalainas de la remolacha en formulaciones cosméticas. No obstante, se logró brindar una propuesta de una sombra en polvos sueltos como una formulación cosmética con la incorporación de pigmentos vegetales extraídos de *Beta vulgaris* que resultó ser bastante estable en condiciones de anaquel pero que en condiciones de estabilidad acelerada no cumple con las especificaciones requeridas.

Conforme transcurrió el tiempo de la evaluación de la estabilidad acelerada y la finalización de la fase experimental de este trabajo de investigación, simultáneamente se almacenaron muestras de los productos cosméticos formulados bajo condiciones de anaquel, lo cual demostró que las sombras en polvo suelto fabricadas mantuvieron su estabilidad por más de 6 meses de almacenamiento.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los pigmentos presentes en la remolacha son llamados betalaínas y se dividen en dos grupos: los rojos o betacianinas (en donde figura en mayor proporción el pigmento rojo llamado betanina) y los amarillos o betaxantinas.

La remolacha, *Beta vulgaris*, es una fuente natural con un alto potencial para ser utilizada por sus propiedades colorantes. La utilización de estos pigmentos naturales ha generado mayor interés, a tal grado que el *Codex Alimentarius Commission* en el año 2004 autorizó su empleo con el nombre de “rojo remolacha” bajo el código E162, en el cual el colorante principal es la betanina que integra el 75 a 95% pero además, incluye pequeñas cantidades de betaxantinas. La industria cosmética también se ha beneficiado de este colorante natural, sin embargo, la industria nacional no ha incorporado su uso y es por esto que las betalainas requieren aún mayores estudios para generar propuestas que aporten mayor interés en la promoción, desarrollo e inversión en productos nacionales de origen natural.

La Unión Europea incluye al rojo remolacha dentro de su listado de colorantes permitidos en cosméticos sin especificar en qué área corporal es utilizado (Unión Europea, 2009) por lo que no se puede definir qué tipos de productos se encuentran disponibles en la actualidad; Por otro lado, la FDA aprueba su utilización únicamente en alimentos (FDA, 2013).

Este trabajo de investigación abre las puertas para la utilización de esta fuente natural de colorantes, para su aprovechamiento y el desarrollo de nuevas investigaciones que complementen los resultados obtenidos.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1. Colorantes naturales en relación con la industria cosmética**

Las plantas utilizadas como colorantes se dividen en varios grupos: colorantes naturales, tintes naturales y pigmentos naturales. Los colorantes naturales son productos que se adicionan a los alimentos para proporcionarles un color en específico y hacerlos más agradables a la vista. Los tintes naturales se usan para teñir telas, madera y cuero. Finalmente, los pigmentos naturales son los compuestos responsables del color visible de una planta; además de ser utilizados por la industria farmacéutica y cosmética.

El uso de sustancias provenientes de la naturaleza, ha tomado auge, tal es el caso de los cosméticos naturales o verdes, donde todas las materias primas involucradas son de origen vegetal, o los llamados fitocosméticos que incluyen dentro de su formulación uno o más componentes de origen vegetal. Es por ello que en años recientes se ha renovado el interés en colorantes naturales por las limitaciones en el uso de algunos colorantes sintéticos en alimentos, medicamentos y en productos cosméticos debido a su toxicidad. Son frecuentes las denuncias por el uso de colorantes no adecuados en estos productos de uso humano. Esto ha originado un considerable interés mundial en el desarrollo de los colorantes naturales. Un indicativo de ello, es el número y distribución de las patentes reportadas a nivel mundial, entre los años 2003 a 2008, entre estos 5 años de un total de 427 patentes 356 estaban referidas a colorantes naturales y 71 a colorantes sintéticos (Cruz, 2008).

Al escoger una planta para extraer su colorante, se debe considerar: que sea disponible a un precio razonable, proceso de extracción no muy costoso y técnicamente factible con el menor impacto ambiental obteniendo un producto

que satisfaga las necesidades industriales y los requerimientos legales (Lock, 1997)

La desventaja de los colorantes naturales es el costo de su obtención, ya que los colorantes naturales puros tienen una relación 30 a 100 veces mayor que el gastado al producir colorantes sintéticos certificados. Esta diferencia económica provoca la reducción de la explotación de las fuentes naturales. Sin embargo, es necesario desarrollar estrategias biotecnológicas más económicas para motivar la extracción de estas fuentes (Lock, 1997).

Por otro lado, los colorantes artificiales son más fáciles de usar que los naturales: son más resistentes a los tratamientos térmicos, son estables en amplios intervalos de pH y casi no se degradan con la luz (Aceituno, 2010).

Las tendencias de aplicación de colorantes en la actualidad, se pueden resumir en:

- Conseguir las ventajas que ofrecen los colorantes sintéticos utilizando colorantes naturales, mediante modificaciones de los últimos, y así conseguir: mayor estabilidad, homogeneidad, intensidad de coloración, facilidades de manejo, aprovechando la mayor aceptación de los colorantes que se encuentran en la naturaleza.
- Una nueva tendencia hacia productos con tonalidades de coloreado más suaves, para una percepción del consumidor como alimentos más naturales.
- Aplicación de nuevos métodos de búsqueda de colorantes a partir de sustratos naturales como pueden ser hongos o extractos de plantas, vegetales o frutos con gran cantidad de pigmentos vegetales como: antocianos, betacarotenos, betalainas, etc
- Una ventaja marcada de los colorantes naturales con respecto a los artificiales es el riesgo que presentan a la salud de los consumidores (García, 2008).

## 3.2. Efectos adversos relacionados al consumo de colorante FD&C Rojo No 40

### 3.2.1. Toxicidad

La preocupación sobre el tema ha generado la formación de organizaciones y campañas por parte de los consumidores, tal es el caso de La Campaña por Cosméticos Seguros – The Campaign for Safe Cosmetics – una coalición de organizaciones dedicadas a la salud y el medio ambiente, que desde hace varios años ha estado presionando a las empresas de cosméticos para eliminar sustancias químicas cuyo uso ha sido vinculado con cáncer, defectos de nacimiento y otros problemas de salud. La coalición argumenta que la exposición repetida a los productos químicos de uso diario podrían tener consecuencias negativas en la salud a largo plazo (Cohen, 2007).

La preocupación de los colorantes artificiales con relación a la seguridad, en lo que respecta a su efecto sobre la salud, ha impulsado su estudio en forma exhaustiva, reduciéndose generalmente su campo de aplicación. También la presión del público ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir, cuando es económica y tecnológicamente factible, los colorantes artificiales por otros naturales (Calvo, s. f.)

El uso del colorante FD&C Rojo No. 40 está permitido por la Food and Drug Administration –FDA- para ser utilizado en el área de ojos, mucosas y uso externo sin ninguna clase de limitación específica (FDA, 2010). Es también conocido como Rojo Allura y su naturaleza es de tipo azoico. Ha sido relacionado con posibles efectos carcinógenos desde 1983 en un estudio realizado en ratas (Vorhees *et al*, 1983).

El rojo Allura cuando se administra por vía oral sufre reducción azo parcial antes de la absorción. Los estudios metabólicos indican que el color no se

absorbe bien en el cuerpo, y la principal vía de la excreción es a través de las heces. En un estudio de reproducción multigeneracional en ratas, se demostró que la progenie de los padres que fueron alimentados con 51.9 gramos del colorante por kilogramo de alimento demostró un ligero aumento en la depresión. El nivel “sin efecto” en la fisiología de la reproducción de este colorante en la rata es de 13.9 g/kg de alimento. Los estudios de teratogenicidad en ratas y conejos no mostraron efectos embriotóxicos. La variedad de estudios de mutagenicidad realizados con Rojo allura indican que no hubo efectos mutagénicos. Otro estudio sobre toxicidad oral aguda y a corto plazo en varias especies reveló que, a parte de la coloración de la orina y las heces, no había otras respuestas relacionados con el compuesto. Estudios dérmicos (tanto a corto como a largo plazo) también indicaron una ausencia de toxicidad inducida por el color, exhibiendo reacciones adversas en menor proporción en comparación con el control. En estudios de alimentación a largo plazo en ratones y ratas, la mayoría de las observaciones consistentes es que los animales que recibieron mayor cantidad de color (51.9g/kg de alimento) exhibieron menores pesos corporales en comparación con los animales de control. Un estudio sugirió que los ratones que fueron alimentados con este colorante mostraron un inicio más temprano de padecimientos de tumores del sistema linfático en comparación con el control, en ratones. Sin embargo, un segundo estudio más amplio en ratones no apoyó esto. El estudio a largo plazo de mutagenicidad indica que el Rojo Allura no posee potencial carcinogénico (IPCS, s.f.)

De acuerdo a lo anteriormente descrito, se ha permitido el uso de tal colorante, sin embargo, cabe resaltar que la sustancia es relativamente segura pero no inocua, ya que aunque presenta efectos adversos en menor proporción, se ha comprobado que sí presenta reacciones adversas a las dosis usuales.

En los últimos años se ha buscado prohibir el rojo allura tanto en Europa como en Estados Unidos. El primer país que mostró interés por hacerlo fue

Inglaterra. En ese país se realizaron dos estudios con niños para verificar la existencia de la relación entre el rojo allura (con otros 5 colorantes azoicos) y la hiperactividad en los niños. El estudio mostró que los colorantes no sólo provocan hiperactividad sino también déficit de atención.

En el estudio se evaluaron los efectos de los colorantes artificiales con el preservante benzoato de sodio al administrarse alimentos con estos aditivos a niños de la población británica y que no se sospechase que fuesen sensibles a los colorantes. El estudio fue llamado “*The Southampton six*”, los colorantes estudiados fueron: tartrazina (E102), amarillo quinolina (E104), amarillo sunset (E110), carmiosina (E122), ponceau 4R (E124) y rojo allura (E129) (Aceituno, 2010).

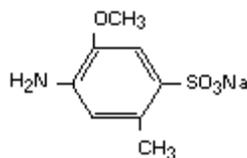
### **3.2.2. Aspectos bioquímicos**

En un estudio realizado en 1970, en ratas que fueron alimentadas con una dieta que contenía 5.19% de Rojo Allura, se observó que el 0.1% y el 29% del colorante intacto fue excretado en la orina y las heces, respectivamente. En estudios posteriores, ratas y perros fueron tratados previamente a diario con Rojo Allura no radioactivo. Posteriormente, los animales fueron dosificados con el compuesto marcado con  $^{35}\text{S}$  y estudiados por hasta 72 horas para patrones de excreción y distribución del color. Ambas especies mostraron una absorción limitada del compuesto con la ruta principal de excreción, siendo ésta la vía fecal. En el perro, el 92 a 95% de la radioactividad recuperada en las heces apareció dentro de 72 horas, mientras que en la rata 76 a 92% de la radioactividad recuperada apareció en las heces dentro de este plazo. La recuperación urinaria del color en ratas y perros, respectivamente varió entre 5.7 y 19.8% en los roedores y 2.7 y 3.6% en los caninos. Después del sacrificio, la retención significativa de radiactividad se encuentra en el contenido intestinal de ambas especies y en los intestinos lavados de las ratas. Esto se cree que es debido a la adherencia del compuesto a la pared intestinal, ya que el total de

canal y las vísceras de estos animales contenían menos de 0.4% de la dosis administrada.

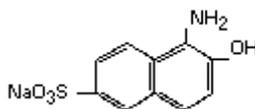
Se encontró que el metabolito principal del Rojo Allura en la orina de estas dos especies fue el ácido cresidenesulfónico, no medible. Además otros dos metabolitos no identificables se encontraron en la orina de las ratas. En los extractos fecales de las ratas, el ácido cresidinesulfónico fue el metabolito principal junto con dos desconocidos y el compuesto original. La muestra fecal de perro reveló un patrón idéntico al de la rata y, además, un tercero desconocido fue descubierto. Uno de los desconocidos compuestos urinarios demostró un valor de Rf que fue idéntico a uno de los compuestos desconocidos en las heces, lo cual sugiere que era uno y el mismo. Los otros desconocidos exhibieron distintos valores de Rf lo cual indica que estos metabolitos eran diferentes. Se ha postulado que con la reducción azo por la flora intestinal del colorante se obtendrán dos componentes del compuesto de origen:

**Figura 1.** Ácido 2-metoxi-5-metil-anilina-4-sulfónico (Ácido cresidina-4-sulfónico)



Fuente: (IPCS, s.f.).

**Figura 2.** Ácido 1-amino-2-naftol-6-sulfónico



Fuente: (IPCS, s.f.).

Parece que se absorben cantidades insignificantes de Rojo 40 intactas y se excreta en la orina, y que la mayor parte del colorante es excretada como metabolitos en las heces (IPCS, s.f.)

### 3.3. La Remolacha (*Beta vulgaris*)

- Nombre Científico

*Beta vulgaris* L. var. *rapacea* (K.) Allen.

- Nombres Populares

Español: *remolacha, betarraga, betabel.*

Portugués: *beterraba*

Inglés: *beet*

Otros: *barbabetola (Italiano), Gemeine rübe (Alemán), betterave (Francés), barba (Árabe).*

La remolacha pertenece a la Familia Chenopodiaceae y su nombre científico es *Beta vulgaris* L., variedad cruenta Alef. o *Beta vulgaris* L. spp. vulgaris, var. conditiva Alef.

Existen numerosas variedades de la especie, de las cuales algunas se emplean para la alimentación humana, otras como pienso para ganado, y otras para la producción de azúcar (la remolacha azucarera, *Beta vulgaris* variedad altísima); otras, entre ellas la *Beta vulgaris* variedad cicla, se cultivan por sus hojas.

La remolacha de mesa es una planta muy apreciada, sobre todo en los países anglosajones. Determinadas industrias extraen de la remolacha el colorante rojo, la

betanina, utilizado en sopas deshidratantes, yogures, ketchup, etc. Algunas variedades forman en mayor cuantía el colorante amarillo denominado betaxantina.

En función de la forma de sus “raíces”, comercialmente se distinguen dos grupos: alargadas (pueden llegar hasta 30 - 40 cm de longitud) y redondeadas o aplastadas. Este segundo tipo de remolachas de mesa son las más cultivadas y las de mayor aceptación con miras a la exportación (Garcia, 2011).

- Partes Utilizadas

La raíz tuberosa.

- Descripción Botánica

Se trata de una hierba anual o bianual, perteneciente a la familia de las *Chenopodiaceae*, caracterizada por presentar una raíz muy ramificada, cuya fracción primaria crece hasta casi dos metros de profundidad y las raíces secundarias lo hacen en un radio de 50-60 cm. De la parte superior de la raíz principal se forma un cuerpo escarnoso comestible, de forma globular, color rojo oscuro. El tallo es erguido y de crecimiento lento durante el primer año. Presenta hojas sencillas, pecioladas a ovada-oblongas, que se transforman en brácteas lineales en la inflorescencia. Las flores son hermafroditas, dispuestas en grandes panículas. El fruto es utricular.

- Hábitat

La remolacha procede de la llamada acelga bravía o remolacha marítima y es originaria de los países del Mediterráneo. Hoy se cultiva en casi todos los países del mundo con clima templado.

- Historia

La remolacha fue considerada desde tiempo antiguo como una planta alimenticia. Pero en 1747, un farmacéutico berlinés llamado A. Markgraf descubre que en su composición interviene la sacarosa, la misma sustancia proveniente del azúcar de caña. Franz Achard cuarenta años más tarde repite la experiencia lo cual permitió que a fines del siglo XVIII se creara el primer establecimiento industrial destinado a la extracción y purificación de este producto, aunque el tenor de azúcar que se extraía hasta ese momento era escaso: 8%. Con el correr del tiempo la incorporación de nueva tecnología permitió alcanzar cifras del 27%, de tal manera que una hectárea cultivada puede rendir 500 quintales de azúcar. Con respecto a la denominación científica *Beta*, la misma deriva del formato en que se doblan los tallos en su parte superior cuando están cargados de simientes, asemejando a la letra griega (Alonso, 1998).

- Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico de la remolacha roja (*Beta vulgaris*) muestra la presencia de sacarosa, pigmentos (fundamentalmente betaína), colina, glutamina, vitaminas A, B y C, saponósidos y fitoestrógenos (Aceituno, 2010).

- Composición Química de la raíz o tubérculo

- Azúcares: sacarosa (15-20%), fructosa, glucosa.
- Minerales: En forma de sales: potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro (en escasa cantidad).
- Otros: vitaminas A, B1, B2 y C, fibras, glutamina, colina, betaína, asparagina, triptofano, sustancias volátiles (piridina y derivados como la geosmina), ácido betalámico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, rafanol, bitinas (poteínas), saponinas, triterpenoides, fitoalexinas, isoramnetina, ciclodopa y N-

formilciclodopa (glucósidos), pectinas y ramnosiliso-vitexina (flavonoides). En la remolacha azucarera encontramos además vanilina.

- Efectos Adversos y/o Tóxicos

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

En cambio, algunos animales que se alimentan de manera copiosa con remolacha forrajera verde (especialmente cerdos y bovinos) pueden presentar señales de toxicidad. Se observa, por ejemplo, hematuria, diarrea y estado de debilidad extrema que puede hacer caer al animal con gran dificultad para incorporarse. También se observa cese de la rumia, rechinar de dientes, indigestión y señales de dolor abdominal. Se tratan eficazmente con inyecciones de calcio, magnesio o ambos en forma conjunta. En ganado vacuno se ha observado una actividad anticonceptiva o antifertilizante. Extractos de la parte aérea (no de la raíz) evidenciaron actividad mutagénica en modelos microbianos. Extractos de la raíz en cambio, no demostraron efectos embriotóxicos, mutagénicos ni abortivos en ratas gestantes (Alonso, 1998).

- Conservación

Una vez recolectada la remolacha, su conservación debe hacerse a 0°C y 90-95% de humedad relativa, lo que puede mantenerla en buenas condiciones durante uno a tres meses (García, 2008).

- **Contraindicaciones**

Pacientes con tendencia a la formación de cálculos (debido a su contenido en ácido oxálico), y primer trimestre de embarazo.

- **Status Legal**

La remolacha se encuentra registrada en las Farmacopeas de Chile (3ª Ed), China (1953), Corea (2ª Ed.), México (4ª Ed.), USA (19ª Ed.) y Códex británico Farmacéutico (1973) entre otras (Alonso, 1998).

- **Usos como colorante natural:**

Las remolachas (*Beta vulgaris*) se emplean en la industria agroalimentaria para la obtención del colorante llamado rojo de remolacha, conocido como E-162.

El uso de betalaínas está autorizado por el Codex Alimentarius Commission (2004) y es comercializado en EEUU y la UE con el nombre de “rojo remolacha”. Se consigue como concentrados (producidos por concentración al vacío de jugo de remolacha al 60-65% de sólidos totales) o polvos producidos por liofilización o *spray-dry* con un 0.3 a 1% de pigmento. Es un colorante relativamente potente, alcanzándose el color deseado con dosis que no exceden los 50 mg/kg calculado como betanina (Wilson, s.f.).

Dado que no se conocen efectos nocivos de este colorante y la Organización Mundial de la Salud -OMS- no ha fijado un límite de dosis diaria admisible, la betanina se usa frecuentemente como colorante en productos alimentarios en donde el pigmento se conserva más fácilmente: gelatinas, bebidas, yogurts y postres en general. En España se utiliza en bebidas refrescantes, conservas vegetales y mermeladas (300 mg/kg), conservas de pescado (200 mg/kg), en yogurts (hasta 18 mg/kg) y preparados a base de queso fresco (hasta 250 mg/kg) (Aceituno, 2010).

### **3.4. Pigmentos naturales presentes en *Beta vulgaris***

#### **3.4.1. Generalidades**

A partir de la remolacha se extrae el pigmento natural presente en esta raíz que le confiere su color rojo característico. Esta sustancia hace que la orina y las heces adquieran un color rojizo después de haber comido remolacha. Esto se debe a que se carece de la enzima que metaboliza dicho pigmento en el intestino, por lo que éste se elimina tal cual junto con la orina y las heces.

Las betalainas son pigmentos vacuolares hidrosolubles presentes en las plantas del orden de las Centrospermas, como el Betabel (*Beta Vulgaris*) (Yanchapanta, 2011).

Wohlpert y Mabry introdujeron por primera vez el nombre “betalaina” durante 1968 para describir estos pigmentos como derivados del ácido betalámico identificado en la planta de remolacha (*Beta vulgaris*), la cual es la mayor fuente comercial de betalainas. Debido a sus propiedades colorantes recientemente están ganando alta importancia como colorantes en varias formulaciones alimenticias y farmacéuticas.

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

Los pigmentos naturales de la remolacha son las betalainas (aminoácidos de amonio cuaternario) compuestas principalmente por betacianinas (rojas) y en menor medida betaxantinas (amarillas). Entre las betacianinas destacan las vulgaxantinas I y II, indicaxantina, isobetanina, prebetanina, neobetanina y betanina (Alonso, 1998).

Las betalainas se acumulan en las vacuolas de las células que las sintetizan, sobre todo en los tejidos epidermal y subepidermal (García, 2008).

Las betalainas son estables en productos deshidratados con una actividad de agua menor a 5.0, la betalaína se vuelve más inestable a medida que se aumenta la actividad de agua y el contenido de humedad del alimento; por esta razón, los sólidos de remolacha deben almacenarse con la menor cantidad de agua posible y en las condiciones más secas.

El colorante rojo remolacha es obtenido de las raíces de *Beta vulgaris* como jugo prensado o extracto acuoso; compuesto por diferentes pigmentos pertenecientes a la clase betalaína, el colorante principal consiste en betacianinas (rojo) de las cuales la betanina integra el 75 a 95%, pequeñas cantidades de betaxantina (amarillo) y productos de degradación de betalainas (marrón claro) pueden estar presentes. El contenido de betanina en extractos de remolacha sufrirá una degradación progresiva que es acelerada por la elevación del pH, temperatura y actividad del agua; por lo tanto se espera que todos los productos comerciales lentamente perderán su color y alterarán su tonalidad de acuerdo a las condiciones de almacenamiento (FAO, 2002).

Las betalainas son uno de los pigmentos autorizados como aditivos por la FDA (Foods and Drugs Administration) de Estados Unidos y también está admitido en la Unión Europea con la designación de E-162, comercializándose de dos maneras, como polvo de remolacha, que incluye el pigmento y estabilizantes como azúcares y

proteínas y antioxidantes, y como extracto líquido concentrado. Las betalainas se obtienen en forma de concentrado o de deshidratado a partir de una extracción acuosa a pH ácido; la purificación de los pigmentos se logra por medio de ultrafiltración y de ósmosis inversa. Incluso, debido a su potencial, se ha ensayado el cultivo de tejidos para producir remolachas con un mayor contenido de betaninas (García, 2008).

Además de los colorantes, el jugo o extracto contiene azúcares, sales y/o proteínas que se encuentran naturalmente en las remolachas. La solución puede concentrarse y algunos productos pueden refinarse a fin de eliminar la mayor parte de los azúcares, sales y proteínas. Ácidos de grado alimenticio (por ejemplo, cítrico, láctico, ácido L-ascórbico) pueden ser añadidos como agentes de control del pH, estabilizadores y portadores (por ejemplo, maltodextrina) se pueden añadir como ayuda para la fabricación de polvos secos (FAO, 2002).

Watson y Gabelman (1982) estudiaron la influencia que sobre determinados parámetros de interés para la industria tienen factores de cultivo tan diversos como la variedad, la época de cultivo y sus interacciones. En el caso del contenido en betacianina (colorante rojizo), las variaciones experimentadas a lo largo del ciclo eran muy heterogéneas según la variedad y el ciclo utilizados, mientras que en el caso de la betaxantina (colorante amarillento) y los sólidos disueltos, su contenido se incrementaba a lo largo del ciclo de cultivo. Durante los primeros 83 días de desarrollo se constataba una correlación negativa entre el peso de introducción de las raíces y el contenido en ambos colorantes, pero esta relación se atenuaba al final del ciclo de cultivo (135 días) (García, 2008).

Como se describió anteriormente, desde hace algún tiempo se ha aceptado el uso de las betalainas de la remolacha como colorantes naturales para alimentos. En los últimos años, dada la prohibición de los colorantes rojos sintéticos, ha aumentado su

demanda, lo que motivó que muchas compañías, en diferentes países, se dediquen a la venta de colorantes de betabel.

En general existen tres presentaciones comerciales de las betalainas de la remolacha:

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

Las últimas dos presentaciones son completamente solubles, pero son más caras que la primera presentación. Por lo general las tres presentaciones contienen entre 0.3 y 1.0 % de colorantes, dependiendo de la variedad de betabel utilizado y de las condiciones de cultivo y cosecha; el resto de los concentrados está constituido por azúcares (75-80%), proteína cruda (10 %) y cenizas (8-10%). Usualmente se les adiciona ácido ascórbico como estabilizante y propionato de sodio como conservador. Las tres presentaciones están en la lista de colorantes aceptadas para su uso en alimentos en Estados Unidos desde 1960 y no necesitan certificación.

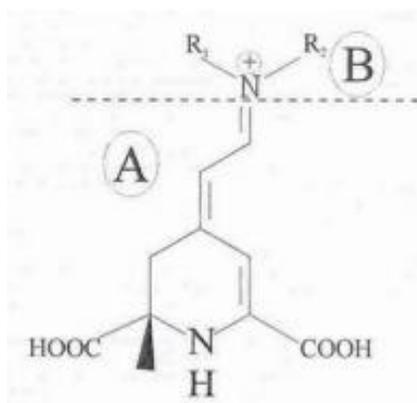
A pesar de las limitaciones que presentan las betalainas debido a su estabilidad, las preparaciones de betabel son usadas para dar color a productos que tengan corto tiempo de almacenamiento, empacados en reducida exposición a la luz, oxígeno y

alta humedad, no sean sometidos a largos tratamientos térmicos y además, sean vendidos en estado seco (Franco, 2004).

### 3.4.2. Estructura

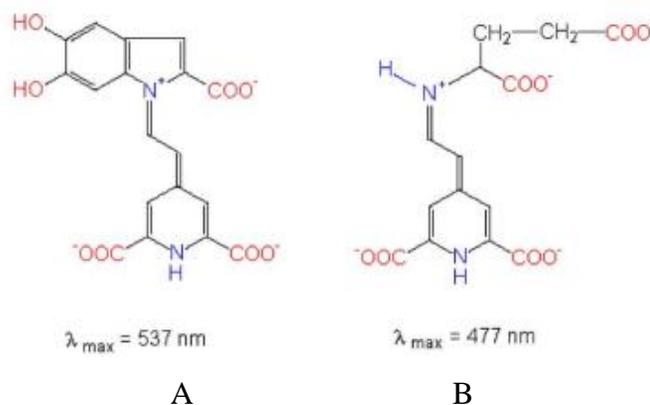
La forma general de las betalainas representa la condensación de una amina primaria o secundaria con ácido betalámico (García, 2008).

**Figura 3.** Fórmula general de las betalainas



Fuente: (García, 2008)

**Figura 4.** Fórmula general de las A) betacianinas (rojo-púrpura) y B) de las betaxantinas (amarillo)



Fuente: (García, 2008)

Las características estructurales de todas las betalainas es la presencia del cromóforo ácido betalámico, una mitad hidropiridina unida a través de un grupo vinilo a otro grupo nitrogenado. Las betaxantinas se forman por la condensación de un aminoácido o de una amina con el grupo aldehído del ácido betalámico, lo que resulta en una base de Schiff. Esta estructura básica proporciona el color amarillo fuerte o amarillo-anaranjado a las betaxantinas con una máxima absorbancia a 470-486 nm. A pesar de las diferencias de color, las betacianinas están también formadas por ácido betalámico unido a una molécula de ciclo-DOPA. El color violeta de estas últimas se debe a una estructura aromática induciendo un fuerte cambio de 60 nm en el máximo de absorbancia (534-554 nm) (Thimmaraju, 2005).

**Figura 5.** Estructura general de las betalainas (B) y del ácido betalámico (A)

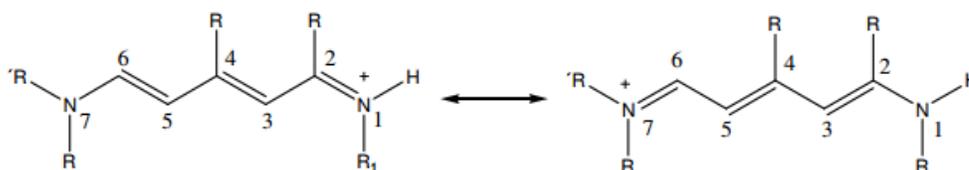


(Mandujano, 2006)

Las betalainas son un grupo de aproximadamente 70 pigmentos glicosidados hidrosolubles derivados de la 1,7-diazoheptametina. El color de las betalainas (Figura 5) se atribuye a las estructuras de resonancia. Si R o R' no extienden resonancia, el compuesto es amarillo (betaxantina), si R o R' extienden la conjugación con un anillo aromático sustituido, el compuesto es rojo (betacianina) (Lock, 1997).

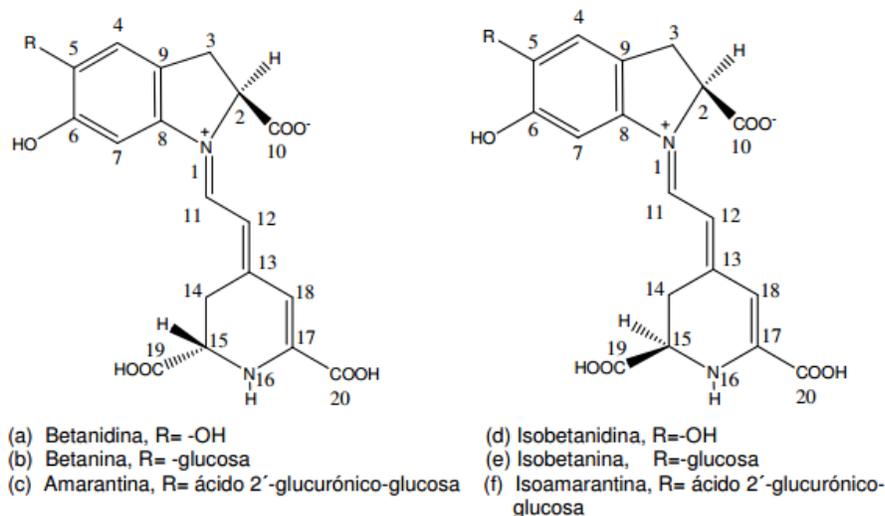
Se conocen más de 50 betalainas, y todas tienen la misma estructura básica, en la cual R y R' puede ser un hidrógeno o un sustituyente aromático. Su color se le atribuye a los dobles enlaces conjugados en resonancia del núcleo aromático sustituido con el cromóforo del 1,7-diazoheptametinamino (Figura 6).

**Figura 6.** Estructura del catión diazoheptametina



Fuente: (Sánchez, 2006)

Cuando 'R (Figura 6) no amplía la conjugación del sistema 1,7-diazaheptametina, el compuesto exhibe un máximo de absorción de luz a aproximadamente 480 nm, característico de las betaxantinas amarillas. Si la conjugación se amplía a 'R, el máximo de absorción de luz se desplaza aproximadamente a 540 nm, característico de las betacianinas rojas. Las betacianinas son ópticamente activas porque tienen 2 carbonos quirales C-2 y C15 (Figura 7). La hidrólisis de la betacianina produce la betanidina o el epímero en C-15 isobetainina (Figura 7d) o una mezcla de las dos agliconas isómeras (Sánchez, 2006).

**Figura 7.** Estructura de las betacianinas

Fuente: (Sánchez, 2006).

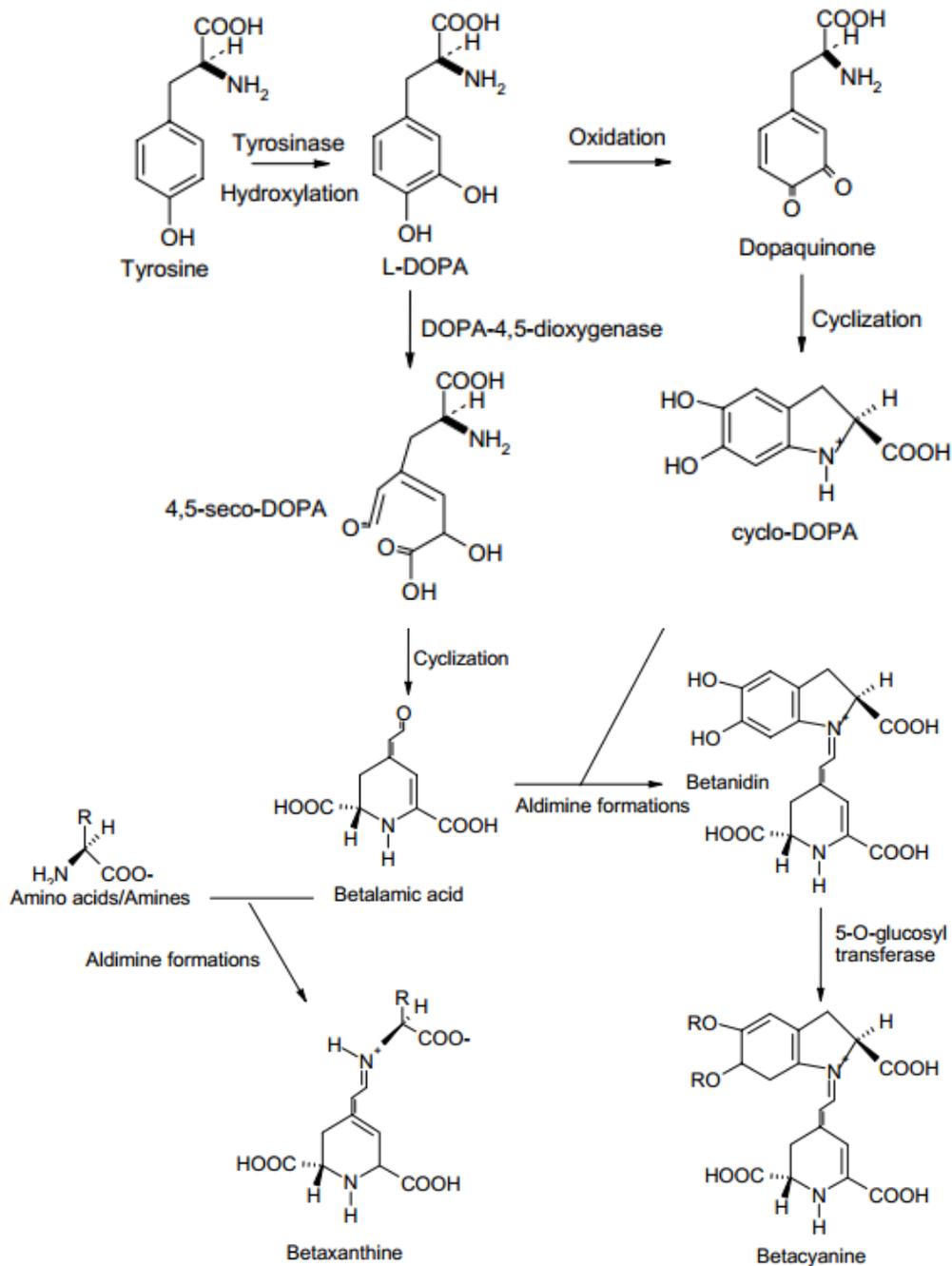
Las betacianinas pueden presentarse como glucósidos. Los glucósidos o glicósidos se forman por reacción del grupo alcohol de una molécula con otro grupo alcohol perteneciente a un azúcar (monosacárido u oligosacárido). En esta reacción se forma un enlace glicosídico con pérdida de una molécula de agua. A la parte no glucídica (no azúcar) del compuesto resultante se le llama aglicón. El aglicón se presenta en dos formas isoméricas, como betanina e isobetanina en la remolacha, y como amarantina e isoamarantina en el amaranto. Sin embargo, también existen otras formas, de acuerdo con el sustituyente unido al aglicón; por ejemplo, en la remolacha, además de betanina e isobetanina, también se encuentran prebetanina, isoprebetanina, betanidina e isobetanidina.

### 3.4.3. Biosíntesis

Comparado con un número de metabolitos secundarios, las betalainas tienen una ruta biosintética bastante simple requiriendo solo unos pocos pasos para la síntesis de betaxantina y/o betacianina. Las betalainas son derivados de tirosina; la tirosina

es hidroxilada por una tirosinasa para dar 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). El ácido betalámico, el cromóforo común de las betalinas es formado por sucesivas escisiones enzimáticas del anillo aromático de DOPA en la posición 4-, 5-, dando la molécula inestable seco-DOPA. La condensación espontánea del cromóforo con un aminoácido o una amina forma las betaxantinas, mientras que la biosíntesis de betacianina requiere la presencia de una molécula de ciclo-DOPA. La formación de ciclo-DOPA resulta de la oxidación de DOPA en un intermediario dopaquinona por una polifenol oxidasa, seguida por una espontánea ciclación de este intermediario. Los siguientes pasos enzimáticos que resultan en la formación de betacianinas siguen siendo una pregunta abierta. No está claro si la molécula del ácido betalámico se condensa con una molécula ciclo-DOPA o con su forma glucosilada, dependiendo en las especies estudiadas. Sin embargo, recientemente Kobayashi *et al.* en el 2001 concluyeron que los pasos de condensación ocurren entre una molécula no glucosilada ciclo-DOPA y un ácido betalámico, seguidamente por glucosilación y pasos de acilación (Figura 8) (Thimmaraju, 2005).

**Figura 8.** La ruta biosintética de betaxantinas y betacianinas



(Thimmaraju, 2005)

### 3.4.4. Fuentes

Las betalinas se encuentran en pocas plantas y flores, entre las que destaca el betabel o remolacha roja (*Beta vulgaris*), la pitaya (*Hylocereus undatus*), la tuna roja y otras familias del orden *Centrospermae* como el amaranto (*Amaranthus tricolor*). Es importante destacar que las betacianinas y las antocianinas no coexisten en la misma planta ni en la misma familia. Sin embargo, las betacianinas pueden coexistir con otras clases de pigmentos flavoides (Lock, 1997).

Estos pigmentos se encuentran específicamente sólo en 10 familias de vegetales, todas pertenecientes al orden *Cariophyllales*: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Basellaceae*, *Cactaceae*, *Chenopodiaceae*, *Didiereaceae*, *Holophytaceae*, *Nyctaginaceae*, *Phytolaccaceae* y *Portulacaceae*. También se han encontrado algunas betalinas de origen fúngico en el hongo venenoso *Amanita muscaria*. Las betalinas, al igual que las antocianinas, se acumulan en las vacuolas celulares de las flores, frutas y hojas que las sintetizan, principalmente en la epidermis y la subepidermis (García, 2008)

Por su alto poder tintorial (dos veces más que los colorantes artificiales) y la tonalidad del color sin cambio en un intervalo amplio de pH (de 3 a 7), las betalinas son compuestos tecnológicamente muy atractivos como colorantes naturales principalmente en la industria alimenticia (Sánchez, 2006).

Las betalinas se encuentran en vacuolas de la célula vegetal, así como las antocianinas son solubles en agua y producen coloraciones rojizas o amarillas en plantas como la remolacha. Son estructuras que poseen la estructura de indol aromático derivados de la tirosina. Cada betalaína posee una porción de azúcar unida a la estructura coloreada denominada betanidina (la betalaína sin el azúcar). Su síntesis es promovida por la luz, además, las betalaínas, así como las antocianinas son sensitivas al pH.



### **3.4.6. Estabilidad**

La estabilidad de las betalainas es influenciada por el pH, la temperatura, la luz, contacto con metal, la actividad de agua y la presencia de oxígeno. Las betalainas se pueden utilizar en alimentos con una vida corta de anaquel, procesados con un tratamiento de calor mínimo, envasados y colocados en un lugar seco, bajos niveles de luz, oxígeno y humedad.

#### **3.4.6.1. pH**

El color de las betalainas es estable a pH entre 3.0 a 7.0. La estabilidad en el intervalo de pH indicado hace que sean aplicables en alimentos. En 1987 Huan y Von Elbe mostraron que el pH óptimo para la estabilidad máxima de la betanina en presencia de oxígeno está entre 5.5 y 5.8. La máxima estabilidad de las soluciones de remolacha se obtuvo a pH 5.5 que es el pH de la remolacha fresca. La vulgaxantina I es más estable en el intervalo de pH de 5 a 6 y muestra mayor estabilidad en extractos no purificados. La estabilidad óptima del pigmento en polvo reconstituido tiene lugar a pH 5.7 (Aceituno, 2010).

El efecto del pH en la degradación de betalainas está fundamentado teóricamente en que dentro de un rango de pH de 4 a 6, la menor cantidad de oxígeno fue observado; fuera de este rango de pH, el número de moles de oxígeno excede el número de moles de betanina en solución. Esto sugiere que más de una molécula de oxígeno puede interactuar con cada molécula de betanina. Esto puede ser explicado por el hecho que fuera del rango de pH de 4 a 6, la betanina es más fácilmente degradada a ciclodopa-5-O-glucósido y ácido betalámico y ambas especies son susceptibles a degradación oxidativa. Esto también sostiene que la degradación de betanina en presencia de oxígeno es más pH dependiente que en ausencia de oxígeno. La cantidad de betanina degradada a 65°C, cuando la regeneración del pigmento es permitida, en ausencia de oxígeno a valores de pH de

3 y 5, es igual; en presencia de oxígeno la cantidad de betanina degradada fue mayor a pH 3 y menor a pH 5 (Mandujano, 2006).

#### **3.4.6.2. Efecto de antioxidante**

Varios estudios han mostrado que los iones ferroso, férrico y cúprico promueven la decoloración del pigmento en productos de betabel. La adición de iones cúpricos a betanina en solución resulta en una inmediata pérdida de color. Se sugirió que la pérdida de color fue por la posible formación de complejos de betanina con iones Cu. En una investigación de formación de complejos de betanina y betanidina, sólo los iones cúprico, cuproso y mercuríco causaron inmediato cambio de color; estos cambios de color son más notables con betanidina. Todas las reacciones de degradación se aceleran por acción catalítica de algunos metales, principalmente cobre (Mandujano, 2006).

#### **3.4.6.3. Efecto de oxígeno**

El oxígeno causa el oscurecimiento y la degradación del pigmento. La betanina se degrada en un 15 % cuando es expuesta al aire durante 6 días a 15 °C a pH 7. La degradación por causa del aire sigue una cinética de primer orden. La degradación de la betanina es parcialmente reversible (Aceituno, 2010).

En solución, conteniendo un exceso molar de oxígeno sobre betanina, la pérdida de betanina sigue aparentemente una cinética de reacción de primer orden. Esta degradación se desvía de la cinética de primer orden cuando la concentración molar de oxígeno se aproxima a la concentración de betanina. En ausencia de oxígeno la estabilidad se incrementa, ya que el oxígeno molecular está implicado como el agente activo en la degradación oxidativa de betanina. Se ha comprobado que especies de oxígeno activo como oxígeno simple y aniones superoxidados no causan oxidación, aunque bajos niveles de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo

pueden presentarse durante la degradación oxidativa, pero no es posible que estas especies activas sean requeridas por la betanina para oxidarse. La adición de estas especies, sin embargo, aumenta la degradación de betanina (Mandujano, 2006).

La inestabilidad de betalainas al oxígeno es una de las limitantes de su uso como colorante. La adición de antioxidantes debe por lo tanto resultar en mejoramiento de la estabilidad. La adición de ácido ascórbico a jugo de betabel concentrado o polvo de extracto de betabel resulta en mejoramiento de la estabilidad del color, el ácido ascórbico protege el color rojo aun cuando es expuesto a tratamientos drásticos como esterilización. El ácido ascórbico ha sido reportado como el mejor estabilizante para garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). Resultados en la literatura reportan marcadas diferencias entre ácido ascórbico e isoascórbico como estabilizadores del pigmento de betabel. El ácido isoascórbico ha sido reportado como el agente estabilizante y antioxidante más efectivo, en presencia de trazas de cationes metálicos. Los cationes de  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Fe}^{++}$  actúan como catalizadores en la oxidación de ácido ascórbico por oxígeno molecular. En presencia de un quelante metálico (EDTA o ácido cítrico) la cantidad de oxígeno se reduce. Los antioxidantes fenólicos (como BHA, BHT y  $\alpha$ -tocoferol), que inhiben la oxidación en cadena por radicales libres, el sulfito, metabisulfito y tiosulfito de sodio, el ácido tiopropiónico y la cisteína no son efectivos para mantener la estabilización de la betanina. Estos resultados confirman que la betanina no se degrada por mecanismos de oxidación por radicales libres.

#### **3.4.6.4.Efecto de secuestrantes**

La presencia de EDTA, en niveles bajos (1 ppm), en solución incrementa la estabilidad de betanina. El efecto es pH dependiente siendo más efectivo entre pH 2 y 5. El mecanismo por el cual el EDTA reduce la oxidación de betanina puede ser explicado en parte por su habilidad para quelar cationes metálicos

polivalentes. También es propuesto que protege a la betanina por directa interacción con su centro electrofílico.

#### **3.4.6.5. Efecto de actividad de agua**

La betanina se vuelve más inestable a medida que aumenta la actividad de agua y el contenido de humedad del alimento. La degradación de betaina requiere la hidrólisis de la molécula de betanina a ciclodopa-5-O-glucósido y ácido betalámico. Esta reacción es altamente dependiente de la disponibilidad de agua, por consiguiente, un decremento en la actividad de agua corresponde a una menor degradación de betanina. Fue especulado que junto con el decremento de agua disponible, se reduce la movilidad de reactantes y la solubilidad de oxígeno molecular. Las betaxantinas son más lábiles que las betacianinas (Mandujano, 2006).

La cinética de degradación de las betalainas debido a la actividad del agua es de primer orden. La mayor estabilidad se encuentra cuando el pigmento está en bajo contenido de humedad y de actividad de agua (Aceituno, 2010).

#### **3.4.6.6. Efecto de enzimas**

Los colorantes naturales pueden ser degradados por varias enzimas encontradas en los tejidos vegetales. Los pigmentos son fácilmente destruidos por enzimas durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Estas enzimas pueden ser inactivadas mediante calor; la pérdida del pigmento puede ser minimizada mediante un escaldado durante 45 a 60 segundos, antes de congelar o pasteurizar. Las betalainas se pueden decolorar por acción enzimática, el sistema enzimático betalainasa (en betabel y amaranto) muestra actividad óptima a 40°C y pH de 3.4, observándose efectos menos drásticos al aumentar el pH. Las condiciones de

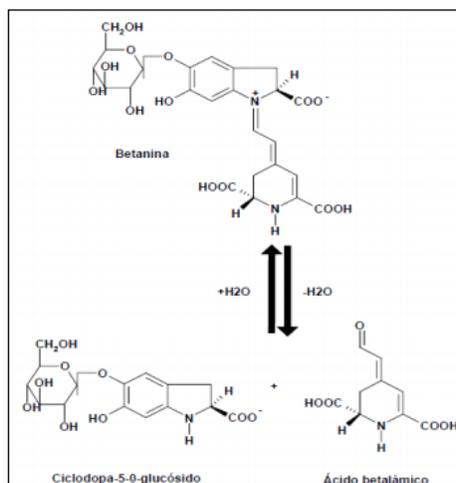
anaerobiosis reducen la actividad enzimática, lo cual hace pensar en una betalinasasa oxidasa (Mandujano, 2006).

### 3.4.6.7. Temperatura

La temperatura es determinante para la estabilidad de las betalinas. Al calentar soluciones de betanina se produce una reducción gradual del color rojo de este pigmento y aparece un color marrón. La degradación térmica de la betanina en presencia de oxígeno sigue una cinética de primer orden. En ausencia de oxígeno la cinética de degradación térmica es diferente.

Al calentar la betanina a temperaturas mayores de 60 °C durante más de una hora, se acelera la hidrólisis de la betanina para producir ácido betalámico y el ciclodopa-5-O-glucósido como productos intermedarios. La hidrólisis es parcialmente reversible con el pH. La energía de activación para la hidrólisis del pigmento por degradación térmica está entre 71 y 88 kJ/mol. La energía de activación para la reacción inversa (regeneración de la betanina) se encuentra entre 2.5 y 14.7 kJ/mol.

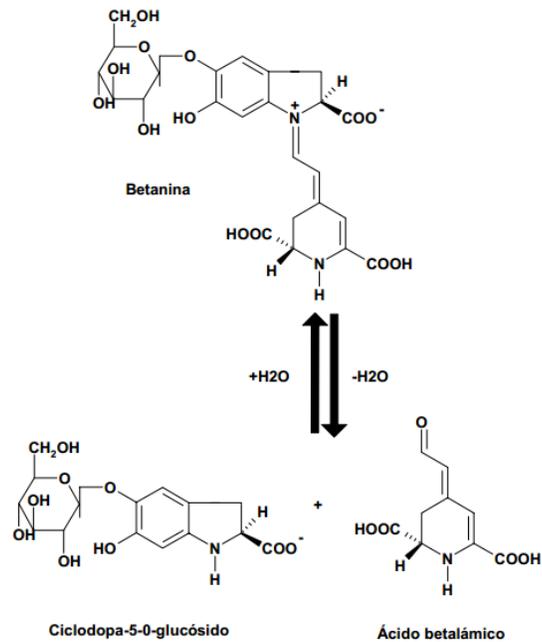
**Figura 10.** Hidrólisis reversible de la betanina



Fuente: (Sánchez, 2006)

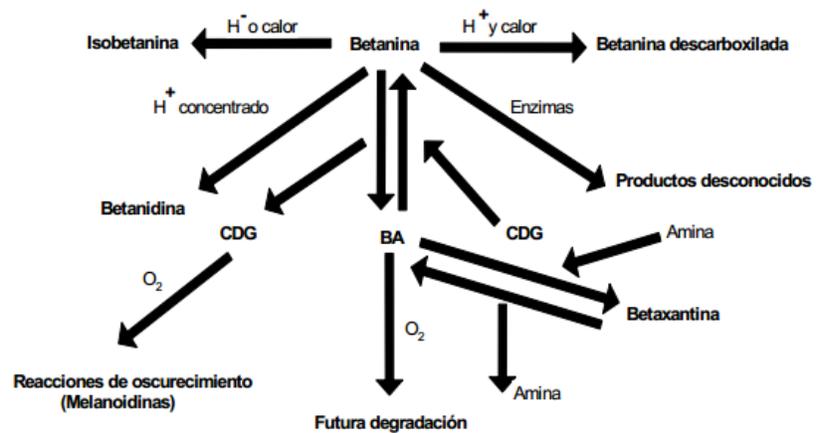
Bajo condiciones alcalinas suaves la betanina se degrada a ácido betalámico y ciclodopa-5-O-glucósido. Si se calienta fuertemente se acelera la hidrólisis de la betanina en solución y se produce ácido betalámico y ciclodopa-5-O-glucósido, pero esta reacción es parcialmente reversible de acuerdo con el pH. Ambos productos de degradación son sensibles al oxígeno y el ácido betalámico es afectado a condiciones ácidas o alcalinas fuertes. En vista de que ambas betalainas, poseen la misma estructura general, el mecanismo de degradación de betacianinas debería emplearse para las betaxantinas. La degradación de betanina a ácido betalámico y ciclodopa-5-O-glucósido muestra ser reversible y por lo tanto, la regeneración parcial del pigmento ocurre siguiendo la termodegradación del pigmento. El mecanismo propuesto para la regeneración de betanina requiere una condensación de la base de Schiff del grupo aldehído del ácido betalámico y del amino nucleofílico de ciclodopa-5-O-glucósido. Un modelo cinético de la degradación de betanina, el cual describe la reversibilidad de la reacción de degradación, predice la cantidad de betanina que puede degradarse y regenerarse bajo varias condiciones experimentales. El ácido betalámico muestra ser más estable a pH neutro y el ciclodopa-5-O-glucósido muestra serlo en condiciones ácidas; por lo tanto la regeneración de betanina es maximizada en un rango de pH entre 4 y 5. El centro quiral C-15 es responsable de la formación de los dos epímeros, isobetanina y betanina, y son formados por tratamiento ácido o calórico. Un estudio realizado por Von Elbe y colaboradores reportó que la proporción de isobetanina y betanina para betabeles frescos, escaldados y esterilizados difiere con el aumento de la severidad del tratamiento calórico. Esto es que cuando la betanina en solución es calentada, puede ocurrir descarboxilación. Esto puede ser determinado por presencia de dióxido de carbono y pérdida del centro quiral C-15. La acumulación de betanina descarboxilada se incrementa conforme la acidez aumenta. La degradación de betanina es resumida en Figura 11 y 12.

Figura 11. Degradación reversible de la betanina



Fuente: (Mandujano, 2006)

Figura 12. Diagrama de degradación de la betanina



Fuente: (Mandujano, 2006)

#### **3.4.6.8.Luz**

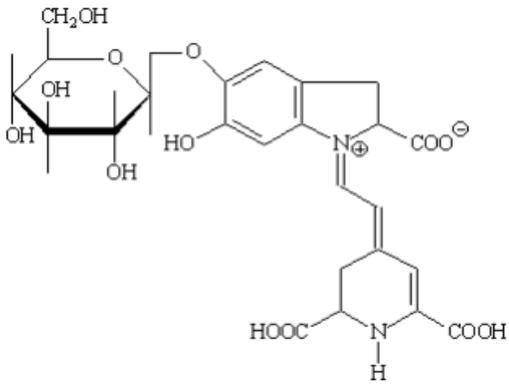
La degradación de las betalainas expuestas a la luz solar sigue una cinética de primer orden. El índice de degradación de la betanina es del 15.6 % al exponerse a la luz solar a 15 °C.

#### **3.4.6.9. Propiedades adicionales**

Debido a su alto poder antioxidante y su capacidad para absorber radicales libres, se ha reportado que las betalaínas presentes en el betabel y en frutos de cactáceas pueden beneficiar la salud del ser humano (Stintzing *et al.*, 2005).

### 3.5. Betanina

**Tabla 1.** Propiedades de la betanina

Nombre Químico	Ácido dicarboxílico [S-(R *, R *) -4 - [2 - [2-carboxi-5-(β-D-glucopiranosiloxi)-2,3-dihidro-6-hidroxi-1H-indol-1-yl)etenil]-2,3-dihidro-2,6-piridina 1-[2-(2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetrahidro-4-piridiliden) etiliden]-5- β-D-glucopiranosiloxi)-6-hidroxiindol-2- carboxilato
Número de CAS	7659-95-2
Fórmula Química	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>
Fórmula estructural	 <p>The chemical structure shows a central indole ring system. At the 3-position of the indole, there is a 2,6-dicarboxy-1,2,3,4-tetrahydropyridin-4-ylidene group. At the 5-position, there is a 2,3,4,6-tetra-O-hydroxy-D-glucopyranosyl group. The indole nitrogen is protonated (N<sup>+</sup>), and the pyridine nitrogen is neutral (N-H). The two carboxylic acid groups on the pyridine ring are shown as HOOC and COO<sup>-</sup>.</p>
Peso	550.48
Ensayo	El contenido de color rojo (expresado como betanina) en el colorante rojo remolacha es no menos de 0.4%.
Descripción	Líquido rojo o rojo oscuro, pasta, polvo o sólido.
Solubilidad	Soluble en o miscible con agua; insoluble en o inmisible con etanol
Reacción de color	La adición de una solución acuosa 10% p/v de hidróxido de sodio a una solución acuosa de la muestra cambia sucesivamente de color de rojo a rojo violeta a amarillo.
Espectrofotometría	La betanina en agua a pH 5.4 tiene una absorbancia máxima de 530 nm y a pH 8.9 exhibe una máxima absorción alrededor de 545 nm
Método de ensayo	Disolver una cantidad de la muestra a ensayar exactamente pesada en buffer TS (pH 5) y diluir a un volumen apropiado con la solución buffer (5 mL en total); La máxima absorción debe ser entre el rango de 0.2 a 0.8. Centrifugar la solución si es necesario, medir la absorción, corregir con el blanco compuesto por Buffer TS (pH 5). El contenido de color es calculado en base a a máxima absorción (alrededor de 530 nm), usando la absorbancia específica para la betanina (1%, 1 cm) = 1120 (Anexo 1)

Fuente: (FAO, 2002)

La betacianina de mayor ocurrencia es la betanina. La betanina está constituida por la aglucona betanidina a la que se enlaza una molécula de  $\beta$ -D-glucosa en el hidroxilo 5. Los únicos carbohidratos que forman glicósidos son la glucosa y el ácido glucurónico.

La coloración roja de la remolacha se debe a la betanina que representa el 75 a 90% del color total presente. La proporción en la que se encuentran las betacianinas y betaxantinas origina diferencias en la coloración de la remolacha; algunas variedades de remolacha contienen hasta 200 mg de betacianina por cada 100 g del material (Lock, 1997).

La betanina representa el 95 % del total de los pigmentos rojos del extracto y representa del 0.4 a 1.0 % en peso de la remolacha (*Beta vulgaris*). La betanina es muy soluble en agua y se extrae con este solvente. A veces se deja fermentar el zumo de la remolacha para eliminar el azúcar presente, pero también se usa sin más modificación, simplemente desecado (Aceituno, 2010).

La betanina se degrada a glucosa y betanidina  $C_{20}H_{23}O_7N_2Cl$ , material amorfo, púrpura, con brillo verde y muy sensible al oxígeno. No contiene ningún grupo metoxilo o grupos N-metilos; pero acepta por metilación 2 grupos metílicos. La fusión con álcalis da un derivado del pirrol y pequeñas cantidades de ácido butírico o valeriánico, pero no floroglucina. Se sugiere que la betanidina es un derivado del pentahidroxi flavilio, que contiene un grupo ornitínico con nitrógeno fuertemente básico adyacente al anillo bencénico (Mayer, 1950).

Los sólidos de la remolacha o la betanina en forma aislada que se usan como colorantes se conservan añadiendo antioxidantes y agentes secuestradores. Los compuestos que tienen estructuras fenólicas (butilhidroxianisol y butilhidroxitolueno) o los que contienen grupos sulfhidrilos no ejercen efectos negativos significativos. El ácido ascórbico en concentraciones adecuadas tiene una

acción protectora, al igual que el ácido isoascórbico. El etilendiamintetracetato, por ser un buen agente acomplejante, también aumenta la estabilidad del pigmento (Aceituno, 2010).

La betanina (D-glucopiranosido de la betanidina  $C_{24}H_{26}N_2O_{13}$  (Peso Molecular = 550), es el agente colorante mayoritario. Las especificaciones alimentarias precisan que una preparación comercial debe contener al menos el 1% de betanina cuando esta preparación es líquida y al menos 4% cuando está en forma de polvo (García, 2008).

Uno de los inconvenientes que presenta el colorante rojo remolacha es que tiene un aroma característico desagradable a tierra, debido a la presencia de geosmina y de 3 -sec-butilo 2-metoxipirazina, así como su elevado contenido en nitratos por tratarse de una raíz. Este hecho puede limitar sus aplicaciones en alimentos, o requerir un tratamiento adicional para eliminar este mal aroma (García, 2008)

**Tabla 2.** Diferentes tonalidades del colorante E-162

Código UE: E162	
Uso de	Colorante
Otros nombres	<i>Betanina o Rojo Remolacha</i>
Cantidad	Tonalidad
1 MOL/1L agua*	
1/2MOL/1L agua*	
1/4MOL/1L agua*	
1/8MOL/1L agua*	
(*) 1 litro de agua desmineralizada. Colores aproximados debido a que el color final no es de tonalidad transparente	

Fuente: (García, 2008)

Se ha demostrado que la velocidad de degradación de las betaninas responde a una cinética de primer orden, ya sea en los jugos, la pulpa, los polvos o en las soluciones modelos. De hecho, el color de las betaninas resulta más estable en los extractos que en las formas purificadas (Márquez y García, 2007).

El contenido de betanina en la remolacha varía de 100 mg/100 g de producto fresco a 16-38 mg/100 gramos de producto vegetal seco (Sturzoiu, 2011).

### **3.6. Métodos de extracción y purificación**

#### **3.6.1. Extracción**

Muchos ensayos para aislar betalainas se realizaron en la primera mitad de este siglo, pero recién se obtuvieron buenos resultados alrededor de los años 60 al usar electroforesis preparativa; otro método consistió en hacer separaciones preliminares del extracto acuoso por absorción sobre resina fuertemente ácida (ejemplo: Dowex 50W) y subsiguiente cromatografía en una columna de poliamida, usando concentraciones crecientes de metanol en ácido cítrico acuoso como agente de desarrollo; las fracciones son liberadas del ácido cítrico acuoso por tratamiento con resina, concentrando al vacío y dejando cristalizar.

Se reportan otros métodos para la separación de la betanina del *Beta vulgaris*: procedimiento de extracción-difusión, procedimiento de extracción fraccionada con etanol acidificado y más recientemente aplicando la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en fase reversa. Esta última ha sido aplicada también para la separación de betaxantinas, logrando mejores resultados que con los métodos de separación tradicionales.

En la separación de los pigmentos de otras plantas que contienen betalainas *Opuntia soehrensii* Britt, “ayrampu” y del *Amaranthus caudatus* var.

*Atropurpurea*, “kiwicha”, dieron buenos resultados la cromatografía sobre gel de Sephadex y elución por gradiente con soluciones de NaCl de 0.3 a 1.0 M (Lock, 1997).

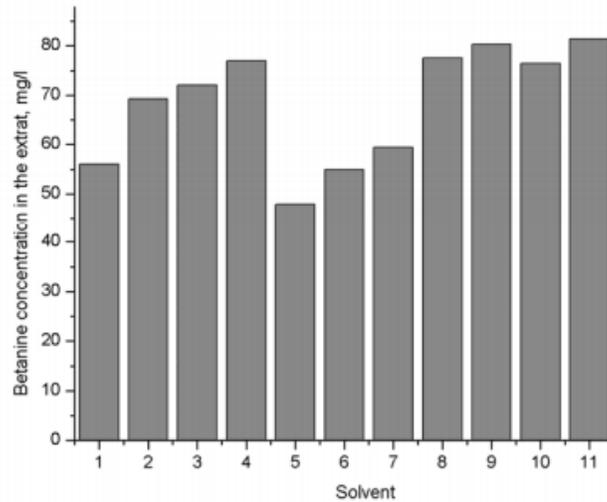
Para la extracción de estos pigmentos, la fruta o planta cruda, generalmente, se lixivia o se muele en agua fría o a temperatura ambiente. En la mayoría de los casos, es necesario el uso de soluciones acuometanólicas o acuoetanólicas (del 20 al 50 % v/v) para alcanzar la extracción completa. Algunas veces, es necesario realizar una fermentación aerobia del jugo (usando *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*) para reducir los azúcares libres y aumentar el contenido de la betacianina.

Con cualquiera de los microorganismos usados, la inactivación de las enzimas que degradan el pigmento se realiza por un tratamiento térmico a 70 °C durante 2 minutos. Sin embargo, este calentamiento destruye algunos pigmentos. Por tal razón, es necesario trabajar a bajas temperaturas y proteger el extracto de la luz.

Las betacianinas se pueden precipitar con una ligera acidificación con ácido clorhídrico o con etanol acidificado (0.4 a 1 % de HCl). Para la separación de betaxantinas se puede adicionar una solución acuosa de etanol al 95 % (Aceituno, 2010).

En un estudio para la evaluación de distintos solventes extractores de betaninas presentes en *Beta vulgaris* (Figura 13), se analizaron los siguientes solventes a 25°C, proporción 5:1 líquido/sólido y un tiempo de extracción de 3 minutos: 1) agua destilada 2) solución acuosa de ácido cítrico 1% 3) solución acuosa de ácido cítrico 0.5% 4) solución acuosa de ácido cítrico 0.2% 5) solución acuosa de ácido ascórbico 0.1% 6) solución etanólica 50% 7) solución etanólica 20% 8) solución acuosa de ácido cítrico 0.5% y ácido ascórbico 0.1% 9) solución acuosa de ácido cítrico 0.2% y ácido ascórbido 0.1% 10) solución acuosa de etanol 20% y ácido cítrico 1% 11) solución acuosa de etanol 20% y ácido cítrico 0.5% (Sturzoiu, 2011).

**Figura 13.** Concentración de betanina en distintos solventes extractores

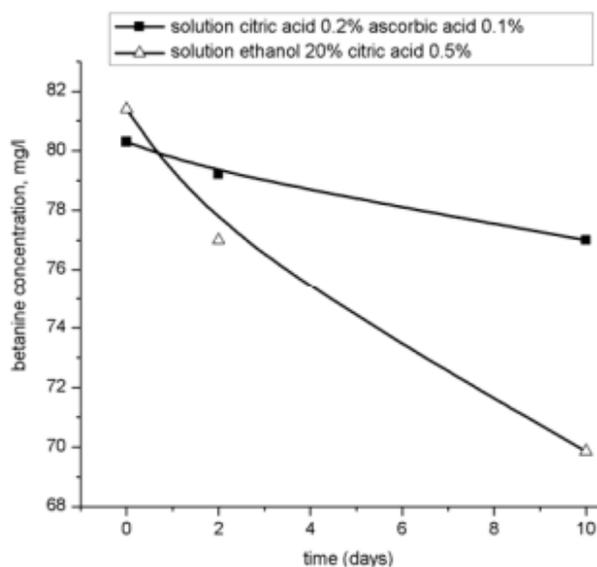


Fuente: (Sturzoiu, 2011)

Es evidente que los solventes con la capacidad extractora más alta fueron: la solución acuosa de ácido cítrico 0.2% y ácido ascórbico 0.1% (posición 9 de la Figura 13) y la solución acuosa de etanol 20% y ácido cítrico 0.5% (posición 11 de la Figura 13).

Así mismo, se evaluó la variación del contenido de betanina en dos extractos con ambos solventes extractores, durante 10 días de almacenamiento. En la Figura 14 se evidencia que los resultados del estudio demostraron mayor estabilidad en la solución acuosa de ácido cítrico 0.2% y ácido ascórbico 0.1%.

**Figura 14.** Variación de la concentración de betanina en un extracto almacenado a temperatura ambiente con etanol acidificado (0.4 a 1 % de HCl).



Fuente: (Sturzoiu, 2011)

### 3.6.2. Aislamiento

La separación de las betacianinas puede realizarse basándose en la insolubilidad del extracto colorante, para separarlas en forma sólida, puesto que éste es soluble en agua. Se puede mezclar en proporción de 10 mililitros de etanol absoluto con 1 mililitro de extracto colorante acuoso, para precipitar el colorante, separándose por centrifugación y decantación, el precipitado sólido. El sólido se expone a una evaporación de las trazas de etanol a temperatura ambiente (Calderón, 2001).

La naturaleza de las betacianinas es altamente iónica por contener tres grupos carboxilos (dos con un pKa de 3.4 y el otro con un pKa de 2), además de un grupo fenólico (PKa de 8.5), características que hacen a las betacianinas difícilmente separables de las betaxantinas (Mandujano, 2006).

La betanina es un pigmento que no se ve afectado por ácidos monocarboxílicos como el ácido láctico y el ácido acético a concentraciones de 100 ppm y 5.9%, respectivamente, pero varios cationes metálicos, principalmente el cobre, aceleran su degradación. Los antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol y el ácido ascórbico no tienen efecto protector sobre la betanina a concentraciones de 100 ppm; sin embargo, cuando las concentraciones se elevan a 1000 ppm se reduce la estabilidad del pigmento debido a que el tocoferol y la vitamina C funcionan como prooxidantes a estas concentraciones. Algunos secuestrantes de metales como los ácidos etilendiaminotetraacético (EDTA) y el cítrico aumentan 50% la estabilidad de la betanina.

Para la separación y purificación de los pigmentos pueden emplearse también las técnicas analíticas de cromatografía en capa fina y en columna (Sánchez, 2006).

Debido a que las betalainas, presentan bajos coeficientes de retención ( $R_f$ ), la cromatografía en capa fina no es la técnica preferida para su separación. Sin embargo, Bilyk *et al.*, en 1981 desarrollaron un sistema preparativo de cromatografía en capa fina en una placa revestida con celulosa (0.5 mm) usando dos fases móviles: isopropanol-etanol-agua-ácido acético en una relación de 6:7:6:1 (v/v) para la primera mezcla de disolventes y para la segunda fase se emplearon los mismos disolventes pero en proporción de 11:4:4:1 (v/v). Cuando se incorporó el ácido en este sistema de disolventes, la movilidad de la betalaína en la placa se facilitó debido a la protonación del grupo carboxílico de la betacianina. El anión carboxilato proporciona un sistema eléctricamente neutro por su interacción con el nitrógeno cuaternario. El mismo efecto se observó para las betaxantinas. En estas condiciones, se lograron separar también las betaxantinas en placas de celulosa dietilaminoetil. Como disolventes se emplearon: isopropanol-agua-ácido acético (13:4:1 v/v). No fue necesario utilizar un indicador, porque la separación de los pigmentos se observó claramente en la placa.

Las resinas de intercambio iónico son ampliamente empleadas en el fraccionamiento y separación de este tipo de pigmentos, así como la filtración en gel. Un procedimiento simple y rápido consiste en colocar el extracto de la planta en contacto con la resina de intercambio iónico que permite fijar las betalainas por adsorción (interacción no iónica). Posteriormente, la resina se lava con una solución acuosa de ácido clorhídrico (0.1% v/v) y los pigmentos se levantan con agua, proceso seguido de la separación final en una columna cromatográfica (Sephadex G -15 y G -25).

Si se desconocen las propiedades cromatográficas y de electroforesis de la planta se pueden comparar con los reportados en la literatura para los pigmentos ya conocidos (Sánchez, 2006).

### **3.6.3. Secado**

En colorantes naturales, el secado ayuda a que la velocidad de degradación por la actividad de agua disminuya (Aceituno, 2010).

El secado por aspersión, pulverización o "*spray drying*" se utiliza desde principios del siglo XX. Aunque existen patentes para el secado por adsorción de huevos y leche desde 1850, la atomización industrial de alimentos apareció en 1913 en un proceso desarrollado para leche por Grey y Jensen en 1913. El primer equipo rotativo lo desarrolló el alemán Kraus (1912) pero, comercialmente se conoció gracias al danés Nyro (1933).

El principio de este sistema es la obtención de un producto en polvo a partir de un material líquido concentrado que se pulveriza finamente formando una niebla que entra en contacto con una corriente de aire caliente (entre 200 y 300°C para alimentos) que actúa como medio calefactor y fluido de transporte.

Genéricamente se pueden atomizar soluciones y papillas alimenticias; como ejemplos concretos están el café, té, los ovoproductos, los jugos o concentrados de frutas, mezclas de helados, sueros, mantequilla, queso, proteínas comestibles y extractos de carne.

### **3.6.3.1. Componentes de un sistema de atomización**

Los elementos de un secador de este tipo son:

- Unidad de concentración
- Atomizador
- Cámara de secado
- Sistema de manejo de aire
- Sistema de separación
- Sistema de transporte y enfriamiento

La unidad de concentración es un evaporador que lleve el producto hasta concentraciones entre 30 y 55% de sólidos (Universidad Nacional de Colombia, 2004).

Las soluciones, suspensiones y pastas pueden secarse mediante su aspersion en pequeñas gotas dentro de una corriente de gas caliente en un secador por aspersion. En la Figura 15 se muestra uno de estos aparatos. El líquido que se va a secar se atomiza y se introduce en una cámara grande de secado, en donde las gotas se dispersan en una corriente de aire caliente. Las partículas de líquido se evaporan rápidamente y se secan antes que puedan llegar a las paredes del secador; el polvo seco que se obtiene cae al fondo cónico de la cámara y luego es extraído mediante una corriente de aire hasta un colector de polvos. La parte principal del gas saliente también se lleva al colector de polvos, como se muestra, antes de ser descargado. Son posibles muchos otros arreglos en que interviene tanto el flujo en paralelo como a contracorriente del gas y del atomizado. Las instalaciones pueden ser, incluso, de

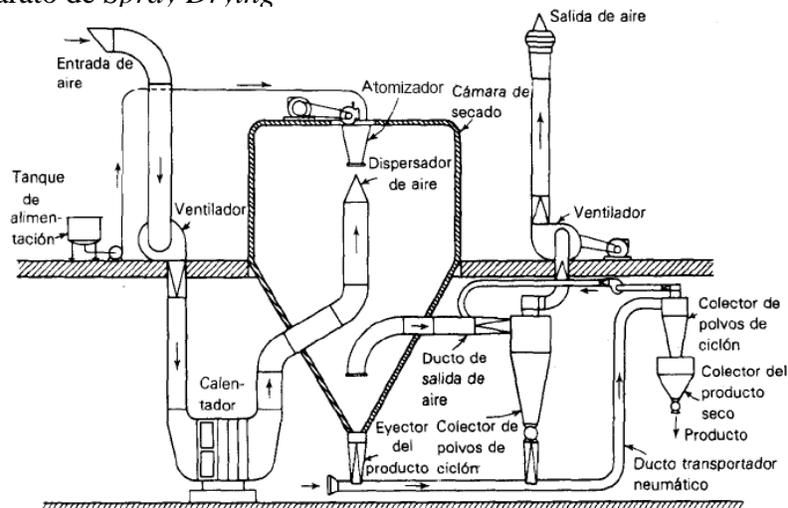
12 metros de diámetro y 30 metros de altura (40 por 100 ft). Los arreglos y diseños detallados varían considerablemente, según el fabricante. Los secadores por aspersión se utilizan para gran variedad de productos, que incluyen materiales tan diversos como sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, productos farmacéuticos, alimenticios como leche, huevos y café soluble, lo mismo que jabón y productos detergentes (ITESCAM, s.f.).

Las Figuras 16 y 17 muestran dos tipos de instalaciones de secado *spray*. Las cámaras de forma cónica como la correspondiente a la Figura 16 son las comúnmente usadas pero también se encuentran en uso cámaras de otras formas.

Se usan tres métodos distintos para atomizar la alimentación:

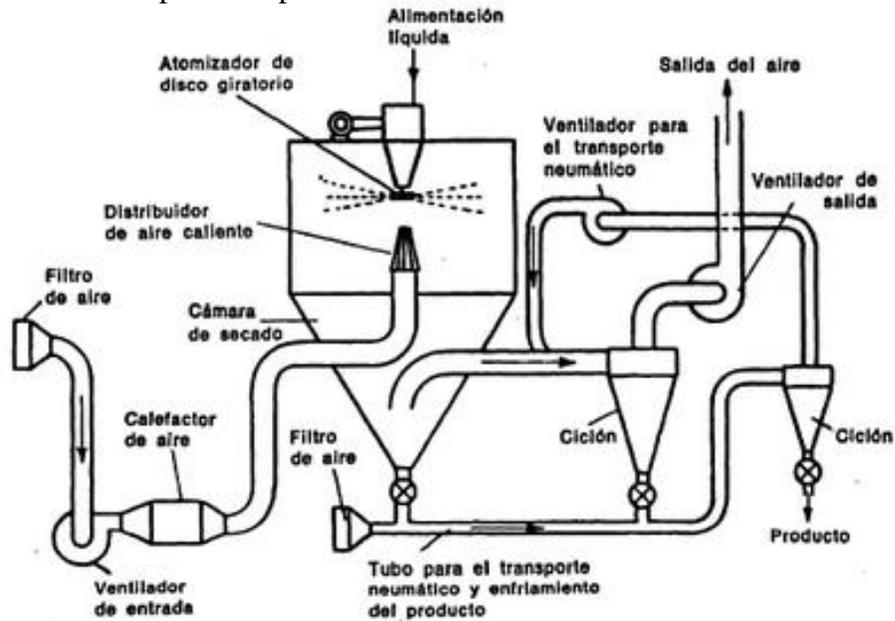
- Boquillas en las cuales la alimentación líquida es forzada a presión a través de orificios pequeños.
- Boquillas en las cuales la atomización es provocada por un fluido secundario, como puede ser aire comprimido.
- Discos giratorios (Nonhebel y Moss, 2002).

**Figura 15.** Aparato de *Spray Drying*



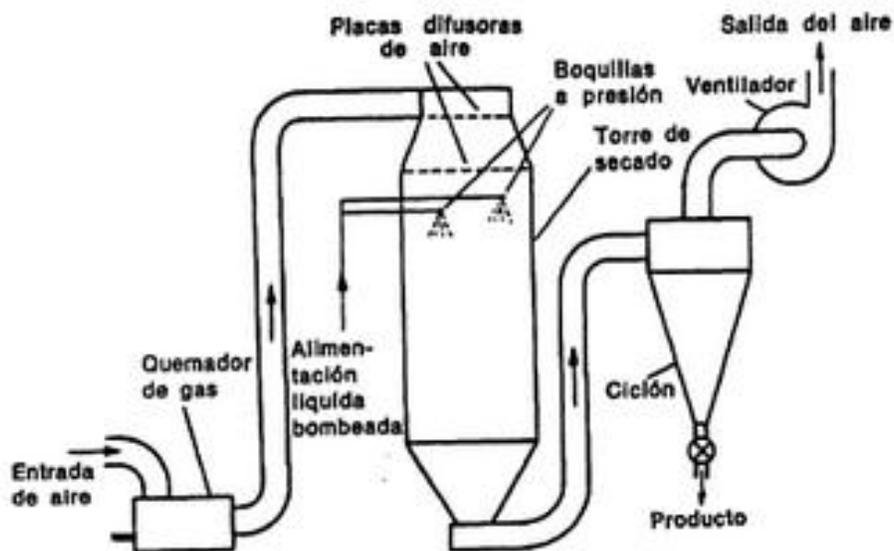
Fuente: (Nonhebel y Moss, 2002).

**Figura 16.** Secador de aspersión tipo I



Fuente: (Nonhebel y Moss, 2002)

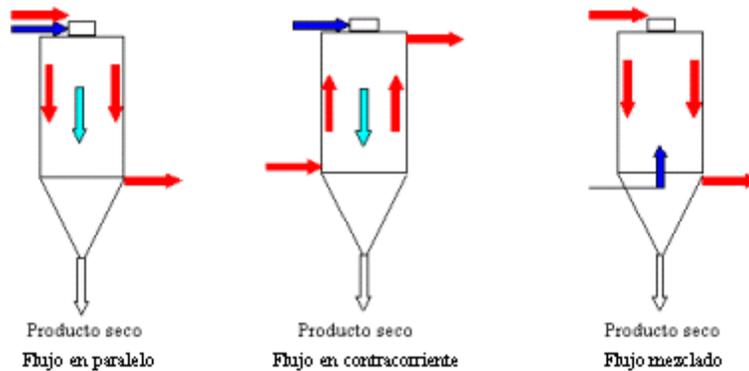
**Figura 17.** Secador de aspersión tipo II



Fuente: (Nonhebel y Moss, 2002)

El atomizador puede usar energía de presión (toberas de presión), energía cinética (toberas de dos fluidos o atomización neumática) o energía centrífuga (discos rotativos). En cualquier caso se busca crear la máxima superficie posible para la evaporación con un tamaño de gota lo más homogéneo posible.

**Figura 18.** Arreglos de corrientes en un secador de aspersión



Fuente: (Universidad Nacional de Colombia, 2004)

La cámara de secado más común es de tipo cilíndrico con un cono inferior que hace un ángulo con la vertical entre 40 y 60° para que pueda ser retirado de allí el polvo por gravedad. Esta unidad está aislada térmicamente para reducir pérdidas energéticas. Su tamaño varía desde unos metros hasta 30 metros de altura en las unidades más grandes. Típicamente, el aire utilizado en la operación tiene temperaturas de entrada entre 100 y 300°C. Para alimentos termoestables como el café pueden usarse hasta 250°C mientras que para materiales delicados como leche o huevos pueden manejarse 100°C o menos. Las temperaturas de salida del aire oscilan entre 50° y 100°C. El calentamiento del aire se hace por métodos indirectos (vapor, gas o aceite como medios calefactores) o directo (gas o electricidad) y presenta distribuciones como las que se muestran en la figura anterior (Universidad Nacional de Colombia, 2004).

### 3.6.3.2. Ventajas y desventajas del secado por aspersión

El secado por aspersión ofrece la ventaja de un secado extremadamente rápido para los productos sensibles al calor, un tamaño y densidad de la partícula de producto que son controlables dentro de ciertos límites y costos relativamente bajos de operación, en especial en el caso de secadores de capacidad grande (ITESCAM, s.f.).

Las ventajas principales del secado por *spray* son las siguientes:

- Puesto que los tiempos de secado son muy cortos, muchos materiales termosensibles pueden ser secados satisfactoriamente, mientras que otros tipos de equipos de secado resultarían inadecuados.
- En este secado el material no está en contacto con las paredes del equipo hasta que está seco y, además, las paredes se encuentran aproximadamente a la temperatura del aire de salida; por lo tanto se reducen los problemas de pegado y corrosión en el equipo.
- El producto es obtenido como un polvo fluido finamente dividido y en forma fácilmente soluble en un disolvente apropiado.
- El tamaño de partícula de algunos productos es ajustable dentro de ciertos límites, variando las condiciones de atomización.
- El proceso es adecuado para el secado continuo de cantidades relativamente grandes de material.
- En ciertos casos el proceso puede eliminar la necesidad de filtración o molturación, aunque en forma alternativa éstos pueden resultar necesarios.
- En ciertos casos, donde es conveniente obtener una baja densidad aparente del producto, es ventajoso el secado por *spray*.
- Las condiciones de limpieza y semiesterilidad son más fácilmente obtenidas que en la mayoría de los otros equipos de secado.

Algunas de las desventajas del secado por *spray* son:

- El calor requerido por unidad de peso del producto es alto, pues:
  - El contenido de humedad en la alimentación puede ser grande comparado con la mayor parte de los otros tipos de secadores.
  - El rendimiento térmico es bajo debido a las restricciones en la temperatura de entrada del aire y a la temperatura relativamente alta del aire de salida.
- En algunos casos la baja densidad aparente del producto puede ser una desventaja (sin embargo, el secado por *spray* no produce necesariamente un producto con baja densidad aparente y no se debe suponer que en todos los casos ocurre así).
- El costo del equipo es alto respecto del tonelaje anual de producto secado particularmente en el caso de equipos de pequeña capacidad.
- El equipo requiere mucho espacio.
- La recuperación en los gases de salida de producto que forma polvo puede ser problemática o puede necesitar un equipo auxiliar costoso.
- No se puede usar el secador por *spray* con productos tóxicos a menos que se tomen precauciones especiales.
- Todas las impurezas de la alimentación quedan retenidas en el producto (Nonhebel y Moss, 2002).

### **3.7. Estudios de estabilidad en cosméticos**

La estabilidad aplicada a cosméticos es la propiedad que tiene un producto cosmético de retener dentro de un período de tiempo determinado y del comienzo al final de su vida útil, y en un envase determinado, las mismas propiedades y características que éste tenía al momento en que fue fabricado.

Los factores que pueden tener influencia en la estabilidad de los productos cosméticos se dividen en variables intrínsecas a la formulación y variables extrínsecas a ésta, todas referentes a las influencias del medio ambiente a que el producto cosmético estará expuesto.

- Variables intrínsecas

Cada ingrediente, sea activo o no, puede afectar la estabilidad de un producto. El tamaño de partícula, variables en el proceso de fabricación y la naturaleza química de los componentes seleccionados en la fórmula original, así como el pH, viscosidad, microorganismos y otros contaminantes presentes en las materias primas son factores que pueden considerarse de riesgo en la estabilidad.

- Variables extrínsecas

Las condiciones de transporte y almacenamiento, la interferencia de la temperatura, humedad y radiaciones solares pueden afectar la estabilidad (Barrientos, 2005).

Una vez abiertos, los productos entran en contacto con el exterior y surge el riesgo de que se degraden, las dos causas principales para que un cosmético se estropee son la oxidación de alguno de sus componentes por contacto con el aire y el riesgo de una contaminación microbacteriana.

Sin embargo, los cosméticos están protegidos de las contaminaciones accidentales gracias a los conservantes que evitan su degradación. Pueden ser de tres tipos: antioxidantes, que retrasan o impiden la alteración de sus componentes; bactericidas, que luchan contra la proliferación de las bacterias; y fungicidas, para evitar la aparición de hongos. Su estabilidad está asegurada como mínimo durante 36 meses desde el momento de su fabricación y antes de abrirlo (Aceituno, 2006).

### **3.7.1. Estabilidad Física**

Se conoce como estabilidad física a la propiedad que presentan los productos cosméticos de mantener en forma inalterada, las características físicas que presentaban al finalizar su elaboración. Aspectos como el color, olor, la textura, la consistencia, la sensación al tacto, el comportamiento reológico, etc, se consideran propiedades físicas.

### **3.7.2. Estabilidad Química**

Se conoce como estabilidad química a la propiedad que presentan los productos cosméticos de conservar dentro de ciertos límites predeterminados (por ejemplo un 10%) la concentración de un ingrediente considerado esencial para la seguridad y eficacia de éste.

### **3.7.3. Estabilidad Microbiológica**

Se conoce como estabilidad microbiológica a la propiedad que poseen los productos cosméticos de mantener en forma inalterada sus características microbiológicas. Es importante mencionar que aquellos productos que por su seguridad deben mantener su calidad de estériles desde el principio al fin de su vida útil y durante el tiempo de uso como los medicamentos. Los cosméticos, que no tienen la calidad de 100% estériles, deben ir adecuadamente preservados y los compuestos empleados para su preservación, deben mantenerse dentro de concentraciones aceptables durante su vida útil (Barrientos, 2005).

Dentro de la metodología de los estudios de estabilidad se pueden encontrar dos tipos de estudios:

#### **3.7.4. Estabilidad a largo plazo**

Estos ensayos tienen por objetivo evaluar la vida útil real del producto, la vida útil real con el tiempo, bajo condiciones corrientes de almacenamiento y uso. Los resultados permiten confirmar o modificar los resultados que se puedan hacer con los estudios de estabilidad a corto plazo. Debido a la importancia de ésta parte en la vida real del producto, estos deben realizarse por tiempo igual al tiempo de vida del producto final.

#### **3.7.5. Estabilidad a corto plazo**

Los estudios de estabilidad de corto plazo tienen la finalidad de predecir la vida útil del producto, cuando éste se mantiene bajo condiciones ambientales y corrientes de almacenamiento y uso. Y su finalidad es adelantar en el tiempo el conocimiento del comportamiento del producto ya sea nuevo o no.

Los estudios de corto plazo también se conocen como estudios de estabilidad acelerados, esto cuando los ensayos o análisis aplicados permiten acelerar el grado de descomposición química de un componente principal de la formulación y estudiar su comportamiento. El grado de descomposición observado puede ser interpretado con base en conceptos cinéticos de comportamiento del activo en estudio y se puede estimar a partir de él la vida útil del producto (Barrientos, 2005).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La creciente tendencia con respecto a la sustitución de excipientes en productos cosméticos, requiere mayores esfuerzos en investigación y desarrollo de formulaciones que integren constituyentes de origen natural con estudios que validen su seguridad y calidad.

Así mismo, la creciente preocupación sobre efectos adversos relativos al uso de colorantes artificiales ha inclinado a la industria hacia alternativas naturales, lo cual ha originado investigación en el campo de los pigmentos naturales y su incorporación en diversos productos.

El aprovechamiento de los pigmentos presentes en la remolacha comprende un complejo proceso que implica el conocimiento de sus propiedades químicas para determinar la forma de extracción más conveniente, su aislamiento, su caracterización fisicoquímica para definir su identidad, precisar su estabilidad, seleccionar presentaciones cosméticas apropiadas con respecto a las características del extracto obtenido y crear formulaciones que permitan preservar la sustancia de forma óptima.

El colorante rojo remolacha es ampliamente comercializado y utilizado principalmente en Estados Unidos y la Unión Europea, incorporado en cosméticos y diversos productos alimenticios. Los resultados que se obtengan a partir de este estudio, aportan una propuesta para la creación de cosméticos nacionales, lo cual contribuye a la transformación de materias primas en productos terminados en contraposición a la importación éstos.

Por lo tanto, este trabajo de investigación se enfocó en determinar la calidad de una propuesta de una formulación cosmética que presentara dentro de su formulación los pigmentos naturales de la remolacha, a través de un estudio de estabilidad acelerada que mediante su evaluación fisicoquímica y microbiológica, permitió definir la aceptación y utilización de éstas sustancias naturales como alternativa a los colorantes artificiales.

## 5. OBJETIVOS

### 4.1. General:

Evaluar la capacidad colorante de los pigmentos presentes en la remolacha (*Beta vulgaris*), para su incorporación en formulaciones cosméticas y la determinación de su calidad mediante un estudio de estabilidad acelerada.

### 4.2. Específicos:

- 4.2.1. Extraer los pigmentos presentes en el tubérculo de *Beta vulgaris* a partir de material vegetal fresco y su posterior secado por *Spray Dryer*.
- 4.2.2. Identificar los pigmentos extraídos mediante la caracterización del extracto obtenido.
- 4.2.3. Realizar la propuesta de una formulación cosmética que incorpore dentro de sus componentes los pigmentos aislados.
- 4.2.4. Evaluar la estabilidad fisicoquímica y microbiológica del producto cosmético terminado.

## 6. HIPÓTESIS

Los pigmentos presentes en la remolacha (*Beta vulgaris*), pueden ser incorporados en la formulación de productos cosméticos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Universo (población) y muestra

Universo: Material vegetal fresco de remolacha (*Beta vulgaris*).

Muestra: Extracto acuoso obtenido de *Beta vulgaris*.

### 7.2. Materiales

#### 7.2.1. Para la extracción de los pigmentos

- Productos de partida y reactivos:
  - Remolachas (3000 g)
  - Agua destilada
  - Ácido cítrico
  - Ácido ascórbico
- Equipo:
  - Balanza analítica
  - Balanza semianalítica
  - Percolador
- Cristalería:
  - Mortero de porcelana
  - Pistilo de porcelana
  - Recipiente de vidrio con tapadera
  - Beakers de 250 mL
  - Probeta de 25 mL
  - Varilla de agitación
- Instrumentos:
  - Cuchillo
  - Pelador de verdura

- Papel filtro
- Algodón
- Papel aluminio
- Espátula

### **7.2.2. Para la caracterización del extracto**

- Productos de partida y reactivos:
  - Extracto acuoso de remolacha
  - Isopropanol
  - Etanol
  - Agua destilada
  - Ácido acético
- Equipo:
  - Cámara para cromatografía en capa fina
  - Potenciómetro
  - Espectrofotómetro UV-VIS
- Cristalería:
  - Beakers de 250 mL
- Instrumentos:
  - Sílica gel 60F-254
  - Tubos capilares sin heparina

### **7.2.3. Para el secado de los pigmentos extraídos**

- Productos de partida y reactivos:
  - Extracto acuoso de remolacha
- Equipo
  - Secador por aspersion (*Spray Dryer*)

#### 7.2.4. Para la producción de los cosméticos

- Rubor:
  - Extracto seco de remolacha
  - Talco
  - Dióxido de titanio
  - Estearato de zinc
  - Estearato de magnesio
  - Óxido de zinc
  - Caolín
  - Metil y propilparabenos
  
- Sombras:
  - Extracto seco de remolacha
  - Talco
  - Estearato de magnesio
  - Mica
  - Metil y propilparabenos
  
- Labial:
  - Extracto seco de remolacha
  - Cera de abeja
  - Manteca de cacao
  - Vaselina líquida
  - Span 40
  - Monoestearato de glicerilo
  - Agua
  - Butilhidroxitolueno (BHT)

- Gel para el cabello:
  - Extracto seco de remolacha
  - Carbopol
  - Agua
  - Propilenglicol
  - PVP
  - Trietanolamina
  
- Crema corporal:
  - Extracto seco de remolacha
  - Agua
  - Vaselina semisólida
  - Cera de abeja

### **7.3. Métodos y Procedimientos**

#### **7.3.1. Recolección del material vegetal**

El material vegetal se obtuvo como “remolacha criolla” en el mercado municipal “La Florida” en Zona 19, proveniente de San Juan Sacatepéquez.

#### **7.3.2. Extracción de los pigmentos de *Beta vulgaris***

La extracción se realizó por medio de percolación, utilizando una solución acuosa de ácido cítrico 0.2% y ácido ascórbico 0.1%. La relación materia/solvente fue de 1:3 (1 kg de materia vegetal/3 Litros de menstruo).

Se procedió a pelar y cortar el material vegetal utilizando un cuchillo y un pelador de verdura. Se realizó la extracción del material vegetal en un percolador y se dejó reposar por 24 horas. Al día siguiente abrió la llave inferior del percolador para dejar correr el extracto y recibirlo en un frasco de vidrio y rosca, protegido de la luz y almacenado en refrigeración.

Se agregó más menstruo al percolador y se dejó en reposo repitiendo el proceso hasta la extracción exhaustiva, realizando 3 lavadas.

### 7.3.3. Caracterización del extracto obtenido

#### 7.3.3.1. Cromatografía en capa fina

Fase móvil: isopropanol-etanol-agua-ácido acético en una relación de 20:35:40:5

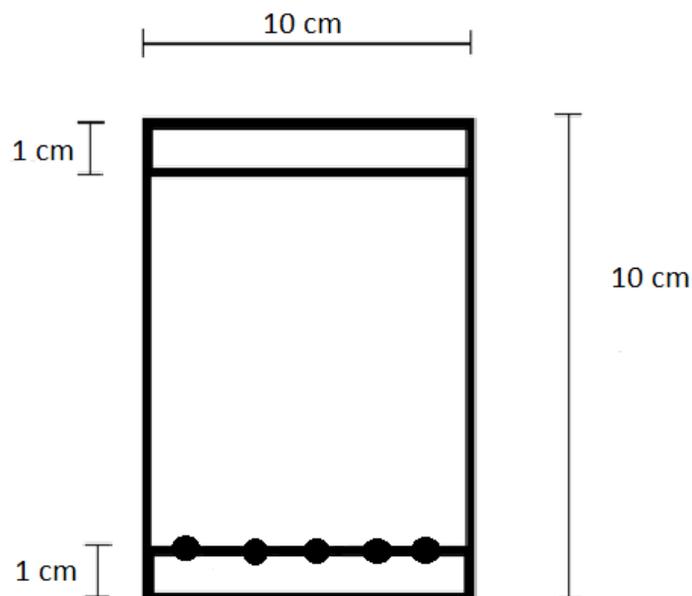
Fase estacionaria: Placa cromatográfica de sílica gel 60F-254

Detección: Sin tratamiento químico para revelar

Preparación de la muestra: Disolver 0.5 gramos en 5 mililitros de buffer de acetatos

Después de sembrar 3 veces la muestra en la línea base y por triplicado (Figura 19) se procedió a introducir la cromatoplaaca en la cámara. Posterior a la corrida, se determinó el Rf de cada banda presente.

**Figura 19.** Cromatoplaaca para caracterización de los pigmentos en el extracto acuoso



Fuente: (Sharapin, 2000)

### **7.3.3.2. Espectrofotometría UV-VIS**

Se llevó a cabo un barrido espectrofotométrico en la región visible, para la determinación de la presencia de betacianinas y betaxantinas, cuyas absorbancias máximas son 540 nm y 480 nm respectivamente. Para realizar la preparación de la muestra, se parte de una solución madre que consista en 0.5 gramos de la muestra más 5 mililitros de buffer de acetatos (Solución A), a partir de ésta se realiza una dilución 1:10, tomando 1 mililitro de la solución A más 10 mililitros de buffer de acetatos (Solución B) con ésta solución se realiza la lectura para evidenciar la presencia de betacianinas. Para analizar las betaxantinas se realiza otra dilución (Solución C), tomando 1 mililitro de la solución B más 10 mililitros de buffer de acetatos.

### **7.3.4. Aislamiento de los pigmentos extraídos**

Posterior a la extracción y seguidamente de la obtención del extracto acuoso, se procedió a secar la solución de los pigmentos mediante el equipo *spray dryer*, con apoyo de la empresa Pharmalat, utilizando 600 gramos de almidón como sustancia encapsulante. La confirmación de la presencia de pigmentos en el extracto seco se realizó por medición espectrofotométrica y por cromatografía en capa fina, como se describió anteriormente.

### **7.3.5. Propuesta de una formulación cosmética que integre el extracto obtenido**

De acuerdo a las características del extracto obtenido, se procedió a la formulación de dos cosméticos decorativos que implicaran una coloración rojiza, tales como: rubor, brillo labial, gel de cabello y crema corporal. Los distintos productos en que se integró el extracto seco permitieron observar el comportamiento del colorante en distintos medios, ya sea acuoso como un gel, tipo emulsión como una crema y un labial o totalmente anhidro como un rubor.

De acuerdo a la incorporación del producto dentro de la formulación, se escogió la forma totalmente anhidra, el rubor, ya que como se describe en el Anexo 4, fue el que mayor estabilidad y aceptación presentó. Se eligió el rubor para su posterior evaluación de estabilidad fisicoquímica y microbiológica pero debido a su tonalidad se modificó la formulación para adaptarla a una sombra en polvos sueltos. Esta parte de la investigación consistió en ensayo y error, se reportó la mejor formulación obtenida bajo el criterio de la investigadora, evaluada sobre los aspectos cualitativos siguientes, según la cantidad de pigmento:

- Homogenidad de la formulación al agregar el pigmento.
- Intensidad de color proporcionado por el pigmento a la formulación.
- Capacidad del producto terminado para brindar color a la piel o mucosa si se trata del labial.

El método de ensayo y error comprendió la incorporación de una cantidad pesada de colorante, añadiendo a otra porción de formulación cosmética una mayor o menor cantidad de extracto seco según corresponda para obtener una coloración aceptable. La base de los productos cosméticos no varió, el único ingrediente de la formulación que pudo modificarse fue el colorante. Con el avance del tiempo se determinó la estabilidad a corto plazo (5 días) para determinar cuál de los cosméticos fuera sometido al estudio de estabilidad acelerada.

#### **7.3.5.1. Fabricación de rubor**

Los componentes se pesaron con exactitud y se mezclaron mecánicamente hasta obtener una mezcla homogénea.

**Tabla 3.** Fórmula cuali-cuantitativa del rubor.

<b>Materia prima</b>	<b>Porcentaje en la formulación</b>	<b>Cantidad para 50 gramos</b>	<b>Función</b>
Extracto seco de colorante rojo remolacha	40 %	20 gramos	Colorante
Talco	28 %	14 gramos	Deslizante
Estearato de Magnesio	12 %	6 gramos	Adherente
Mica	20 %	10 gramos	Absorbente
Metilparabeno	0.1 %	0.05 gramos	Preservante
Propilparabeno	0.3 %	0.15 gramos	Preservante

Fuente: (Ash, 1977).

### 7.3.6. Evaluación de la estabilidad

El producto terminado seleccionado se sometió a un estudio de estabilidad acelerada, que comprendería 3 meses en que el cosmético sería almacenado en una cámara de estabilidad bajo 45°C de temperatura y 70% de humedad como una forma de estrés. Éste estudio de estabilidad está basado en el Reglamento Técnico Centroamericano para estabilidad de medicamentos, ya que actualmente en Guatemala, no se cuenta con una regulación que trate sobre la estabilidad de los productos cosméticos. Para la evaluación de la estabilidad tanto fisicoquímica como microbiológica, se tomaron 5 muestras para ambos análisis (10 muestras en total, en cada tiempo), 5 muestras destinadas a ser sometidas a la evaluación física y química, las otras 5 muestras destinadas para el análisis microbiológico.

En la Tabla 4 se detalla la frecuencia de análisis y condiciones de almacenamiento.

**Tabla 4.** Cronograma del estudio de estabilidad del producto cosmético seleccionado

<b>CRONOGRAMA</b>	
<b>TIEMPO 3 MESES (90 DÍAS)</b>	
<b>CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO</b>	<b>FRECUENCIA DE ANÁLISIS</b>
45°C ± 2°C con 75% de Humedad Relativa	Inicial
	45 días
	Final (90 días)

Fuente: (Reglamento Técnico Centroamericano, 2010).

### 7.3.6.1. Estabilidad Física

El producto terminado seleccionado se sometió a los análisis físicos necesarios para determinar la estabilidad del producto cosmético terminado:

**Tabla 5.** Evaluación física realizada en cosmético elegido.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CUMPLE</b>	<b>NO CUMPLE</b>
Aspecto	Empaque sin presencia de humedad en forma de gotas	Empaque con presencia de humedad en forma de gotas
	Ausencia de apelmazamiento	Apelmazamiento
Color	Color homogéneo	Color heterogéneo
	Color inalterado	Color presenta cambios
Olor	Olor inalterado	Cambios de olor

Fuente: (Reglamento Técnico Centroamericano, 2008).

### 7.3.6.2. Estabilidad Química

Para determinar la presencia o ausencia del pigmento a lo largo del tiempo se procedió a realizar una cromatografía en capa fina para cada tiempo de análisis, por medio de la cual se evidenció cualitativamente la presencia de los pigmentos dentro de la formulación cosmética.

### 7.3.6.3. Estabilidad Microbiológica

Se realizaron los análisis microbiológicos enviando muestras de los productos cosméticos al Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos, LAFYM. Con los resultados obtenidos se verificó que el límite de microorganismos no excediera a lo especificado en el Reglamento Técnico Centroamericano para Verificación de la Calidad de Productos Cosméticos (RTCA 71.03.45:07). Este reglamento determina un límite microbiano menor o igual de 100 UFC/g o UFC/cm<sup>3</sup> (Unidades Formadoras de Colonia por gramo o por centímetro cúbico) para recuento total de mohos y levaduras y 1000 UFC/g o UFC/cm<sup>3</sup> para recuento total de mesófilos aerobios, como se detalla en la tabla 6.

**Tabla 6.** Evaluación microbiológica realizada en el producto cosmético terminado

PARÁMETRO	CUMPLE	NO CUMPLE
Mohos y levaduras	$\leq 100$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>	$> 100$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>
Mesófilos aeróbios	$\leq 1000$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>	$> 1000$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>
Staphylococcus aureus	Ausente	Presente
Escherichia coli	Ausente	Presente
Pseudomonas aeruginosa	Ausente	Presente

Fuente: (Reglamento Técnico Centroamericano, 2008).

#### 7.4. Diseño de la Investigación

La primera fase de la investigación, la cual corresponde a la extracción, aislamiento, caracterización del extracto y la propuesta de la formulación cosmética consiste en un ensayo y error, comprende un análisis descriptivo de acuerdo a los hallazgos obtenidos.

La segunda fase que implica el estudio de estabilidad fisicoquímica y microbiológica requiere mínimo cinco repeticiones utilizando cinco unidades de producto (cosmético terminado) para el análisis de la aceptación o no aceptación de los aspectos fisicoquímicos a evaluar; así mismo, para el análisis microbiológico se necesitan otras cinco repeticiones utilizando cinco unidades de producto adicionales y diferentes a las utilizadas para el análisis fisicoquímico.

La evaluación de estabilidad se planteó para ser realizada en tres tiempos, tal como se detalló en la Tabla 4, pero como se describe en los resultados, el tiempo se redujo de acuerdo a los resultados observados.

Para la determinación de la estabilidad del producto sometido a estudio se realizó una prueba de hipótesis binomial para cada aspecto:

Ho:  $p = 0.5$  (No cumple)

Ha:  $p > 0.5$  (Sí cumple)

Se esperaba que las 5 repeticiones reportaran el resultado de “cumple” para rechazar Ho a un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Las muestras no cumplieron con las especificaciones antes que terminara el tiempo del estudio de estabilidad, el día en que ya no se cumplieron las características deseadas, se reportó la fecha y se dio por terminado el estudio.

## 8. RESULTADOS

**Cuadro 1.** En el siguiente cuadro se presenta el rendimiento del extracto seco de *Beta vulgaris* obtenido en el estudio.

Material vegetal utilizado	Extracto seco	Porcentaje de rendimiento del extracto seco
3000 g	210 g	7.00%

\*g=gramos

Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 2.** En el siguiente cuadro se presentan los resultados de la caracterización inicial del extracto seco para identificación de betalaínas.

Componente identificado	Cromatografía en capa fina		Barrido UV	
	Rf	Color	Pico de absorción	
			Teórico	Experimental
<b>Betacianinas</b>	0.75	Rojo	540 nm	536 nm
<b>Betaxantinas</b>	0.33	Amarillo	480 nm	486 nm

\*nm=nanómetros

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales, (Lock, 1997).

**Cuadro 3.** A continuación se detallan los resultados del análisis inicial de los parámetros para evaluación física del cosmético.

Parámetro a evaluar	Descripción inicial
Aspecto	Polvo fino
Color	Lila
Olor	Característico a cosmético

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 4.** En el presente cuadro se describe el análisis de estabilidad física realizado en el tiempo cero describiendo el promedio de los resultados de cinco muestras de producto evaluadas.

Parámetro a evaluar	Especificación	Dictamen
Aspecto	Integridad de contenido	CUMPLE
	Ausencia de grumos	CUMPLE
Color	Homogenidad	CUMPLE
	Color inalterado	CUMPLE
Olor	Olor inalterado	CUMPLE

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 5.** En este cuadro se describe el análisis de estabilidad química realizado en el tiempo cero describiendo el promedio de los resultados de cinco muestras de producto evaluadas.

Componente identificado	Parámetro a evaluar/especificación				Dictamen
	Cromatografía en capa fina		Barrido UV		
	Rf	Color	Pico de absorción		
			Teórico	Experimental	
Betacianinas	0.80	Rojo	540 nm	538 nm	CUMPLE
Betaxantinas	0.47	Amarillo	480 nm	486 nm	CUMPLE

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales, (Lock, 1997).

**Cuadro 6.** En el presente cuadro se describe el análisis de estabilidad microbiológica realizado en el tiempo cero describiendo el promedio de los resultados de cinco muestras de producto evaluadas.

Parámetro a evaluar	Especificación	Dictamen para 5 muestras
Mohos y levaduras	$\leq 100$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>	CUMPLE
Mesófilos aeróbios	$\leq 1000$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>	NO CUMPLE
Staphylococcus aureus	Ausente	CUMPLE
Escherichia coli	Ausente	CUMPLE
Pseudomonas aeruginosa	Ausente	CUMPLE

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 7.** El siguiente cuadro describe el análisis de estabilidad física realizado a 30 días de iniciado el estudio, bajo condiciones de estabilidad acelerada, describiendo el promedio de los resultados de cinco muestras de producto evaluadas.

Parámetro a evaluar	Especificación	Dictamen
Aspecto	Integridad de contenido	NO CUMPLE
	Ausencia de grumos	NO CUMPLE
Color	Homogenidad	NO CUMPLE
	Color inalterado	NO CUMPLE
Olor	Olor inalterado	CUMPLE

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 8.** En este cuadro se detalla el análisis de estabilidad química realizado a 30 días de iniciado el estudio, bajo condiciones de estabilidad acelerada, describiendo el promedio de los resultados de cinco muestras de producto evaluadas.

Componente identificado	Parámetro a evaluar/especificación				Dictamen
	Cromatografía en capa fina		Barrido UV		
	Rf	Color	Pico de absorción		
			Teórico	Experimental	
Betacianinas	--	--	540 nm	--	NO CUMPLE
Betaxantinas	--	--	480 nm	--	NO CUMPLE

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales, (Lock, 1997).

**Cuadro 9.** A continuación se describe el análisis de estabilidad microbiológica realizado a 30 días de iniciado el estudio, bajo condiciones de estabilidad acelerada, describiendo el promedio de los resultados de cinco muestras de producto evaluadas.

Parámetro a evaluar	Especificación	Dictamen para 5 muestras
Mohos y levaduras	$\leq 100$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>	NO CUMPLE
Mesófilos aeróbios	$\leq 1000$ UFC/g ó UFC/cm <sup>3</sup>	NO CUMPLE
Staphylococcus aureus	Ausente	CUMPLE
Escherichia coli	Ausente	CUMPLE
Pseudomonas aeruginosa	Ausente	CUMPLE

\*Resultados promediados para las 5 muestras  
Fuente: Datos experimentales.

**Cuadro 10.** El cuadro siguiente presenta, de manera general y resumida, el análisis estadístico del estudio de estabilidad acelerada de la presente investigación.

Parámetro a evaluar	Resultados		Dictamen	Análisis estadístico
	Tiempo cero	30 días		
Estabilidad Física	CUMPLE	NO CUMPLE	NO CUMPLE	No se rechaza Ho
Estabilidad Química	CUMPLE	NO CUMPLE	NO CUMPLE	No se rechaza Ho
Estabilidad Microbiológica	NO CUMPLE	NO CUMPLE	NO CUMPLE	No se rechaza Ho

\*Resultados promediados para la totalidad de muestras ensayadas

Fuente: Datos experimentales.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los pigmentos presentes en el tubérculo de la remolacha tienen una capacidad colorante evidente, lo cual supondría que la utilización de éstos sea aprovechada ampliamente; no obstante, aunque en la actualidad el colorante rojo de la remolacha, registrado bajo el código E162 y autorizado para su amplia utilización en la formulación de cosméticos (Unión Europea, 2009), no es aprovechado ni comercializado como tal en Guatemala. El presente estudio logró la extracción y secado de los pigmentos de *Beta vulgaris* a partir de material vegetal fresco y preservado en forma de polvo. Tal como se describe en el Cuadro 1, se reporta un porcentaje de rendimiento considerable (7.00%) lo cual al compararlo con datos reportados en la literatura se evidencia que es un rendimiento comparable, ya que en un estudio en el cual se evaluaron varios encapsulantes en la extracción del pigmento rojo de la remolacha a partir de extracto acuoso, se obtuvo un 12.00% de rendimiento del total de sólidos, del cual se describe una composición que comprendió de 1.00 a 2.00% de betalaínas, de 7.00 a 8.00% de azúcares, 0.006% de proteínas, 1.00 a 2.00% de almidón y de 1.00 a 2.00% de pectina (Koul *et al*, 2002). Por lo que del porcentaje de rendimiento obtenido en este estudio, se debe considerar que para la obtención del polvo por secado en aspersion (también conocido como *spray dryer*) se requiere la utilización de un encapsulante, en este caso se utilizó almidón en una cantidad de 600 gramos. El porcentaje de encapsulante presente en el extracto obtenido no puede ser medido con exactitud debido a las pérdidas inevitables de sólidos al momento de recuperar el polvo del equipo, ya que no es posible la limpieza de las paredes del mismo para la recolección de las partículas sólidas en su totalidad, pero según en la literatura, el colorante rojo remolacha se encuentra constituido en un 75.00 a 90.00% de betanina y ésta representa de un 0.40 a 1.00% en peso de la remolacha (Aceituno, 2010), por lo que si se realiza un cálculo teórico en base a esta información (Anexo 3), se puede confirmar alrededor de 12 a 30 gramos de betanina y de 198 a 180 gramos de almidón en los 210 gramos de extracto seco obtenido, a partir de los 3000 gramos de material vegetal fresco que se utilizaron. Por lo tanto, el rendimiento de la extracción no es medible en base a la cantidad de pigmento neto pero se alcanzó un porcentaje de rendimiento significativo en comparación a otros estudios realizados, tal como se explicó anteriormente; sin embargo, si se compara el

porcentaje de rendimiento obtenido con el de otros colorantes naturales como la bixina (colorante rojo del achiote) que presenta rendimientos de hasta 24% en su extracción (Cevallos y Lucio, 2014) el aprovechamiento es menor. La utilización del equipo de *spray dryer* permitió obtener un extracto de mayor volumen, fácil de manejar, óptimo almacenamiento y de mayor estabilidad como se discutirá más adelante. El término *spray dryer* se refiere a un equipo que permite obtener un producto en polvo a partir de un material líquido que se pulveriza al entrar en contacto con una corriente de aire caliente (Universidad Nacional de Colombia, 2004). La obtención de extractos vegetales por medio de la utilización de este equipo presenta distintas ventajas, una de las principales es el tiempo de secado que es sumamente corto y lo cual es ventajoso para trabajar con materiales termosensibles, en este caso es ideal por trabajar con colorantes naturales que generalmente son muy inestables al ser sometidos al calor.

Posterior a la obtención del extracto seco, se procedió a determinar la presencia de los pigmentos presentes mediante su identificación cromatográfica y espectrofotométrica. En el cuadro 2, se observan los resultados de la cromatografía en capa fina como análisis preliminar para la identificación de betacianinas y betaxantinas, lo cual se evidenció al observar dos bandas, una de color rojo denotando la presencia de betacianinas y otra de color amarillo, resaltando la presencia de betaxantinas. Las betacianinas presentaron mayor coeficiente de retención ( $R_f$ ) que las betaxantinas, esto es debido a que las betacianinas poseen mayor polaridad que las betaxantinas debido a sus estructuras químicas, presentadas en la Figura 4, las primeras poseen mayor polaridad por contener dos grupos OH que proveen dos momentos dipolo a la molécula, en cambio las betaxantinas carecen de grupos OH y debido a esto, las betacianinas se unen con mayor fuerza al solvente (que es polar) y recorren más distancia sobre la cromatoplaca. La evaluación espectrofotométrica confirmó la presencia de los pigmentos presentes al realizar un barrido espectrofotométrico e identificar dos picos de absorción a 538 nm y 480 nm, lo cual contrasta satisfactoriamente con datos teóricos confirmados en otros estudios, en donde se describe un pico máximo de absorción de 540 nm para betacianinas y 480 nm para betaxantinas (Sánchez, 2006). Es importante mencionar que de acuerdo a los resultados obtenidos, la autora determinó que para evidenciar ambos picos de absorción se deben realizar dos diluciones (Como se detalla

en el apartado de metodología), ya que las absorbancias máximas de ambos colorantes no son observables bajo la misma dilución, debido a que las betaxantinas al encontrarse en menor proporción únicamente son identificadas en una dilución mayor, en donde ya no se aprecia la absorbancia de las betacianinas. La razón de los picos de absorción se explica nuevamente en base a la variación en las estructuras de ambos colorantes, como se describe en la Figura 6, las betacianinas presentan una conjugación más amplia con relación a sus dobles enlaces, en comparación con las betaxantinas que contienen menos enlaces conjugados y que debido a esto, el máximo de absorción de luz se identifica a una menor longitud de onda.

Después de confirmar la presencia de los pigmentos en el extracto obtenido, se realizó su incorporación en la formulación de un producto cosmético. Para escoger el cosmético que fuera sometido al estudio de estabilidad acelerada, se probó la incorporación del extracto seco en cuatro productos: gel para el cabello, brillo labial, crema de manos y rubor en polvo suelto. Como puede observarse en el Anexo 4, el gel para el cabello, brillo labial y crema de manos presentaron alta inestabilidad, observándose decoloración total a cinco días de fabricado el producto. Así mismo, fue necesario el cambio de formulación del rubor en polvo por sombras en polvo suelto, debido a que en la incorporación del extracto seco junto con los demás ingredientes del rubor se obtuvo una tonalidad lila (Cuadro 3) lo cual limitó su utilización en las mejillas. El colorante E162 está autorizado para ser incorporado en cualquier tipo de cosméticos como colorante, antiestático o viscosizante (Carrasco, 2005) pero no se hace referencia a en qué tipo de cosméticos es incorporado, de acuerdo a los resultados observados en base al comportamiento del colorante en distintos medios, se puede confirmar que la incorporación del mismo debe hacerse a productos que carezcan o que posean una mínima cantidad de agua. Además se debe recordar que este colorante está designado bajo la letra E en el código alimenticio, lo cual significa que es usado estrictamente en alimentos y para productos que tengan corto tiempo de almacenamiento, que no sean sometidos a largos tratamientos térmicos, que sean vendidos en estado seco y empacados para una exposición reducida de la luz, oxígeno y humedad debido a su baja estabilidad (Franco, 2004). Apoyándose en lo anterior y con los resultados obtenidos en esta investigación, se entiende la razón por la que el cosmético que presentó mayor estabilidad haya sido la sombra en polvos sueltos, cabe resaltar que la cinética de

degradación de las betacianinas se acelera debido a la hidrólisis de éstas en presencia de agua, por lo que un decremento en la actividad de agua resulta en una menor degradación de las betacianinas (Mandujano, 2006).

Se realizó un lote inicial de 40 unidades de sombras con dos gramos de producto cada una, colocando 30 unidades en una cámara de estabilidad bajo las condiciones descritas en la Tabla 4. Cinco unidades, enumeradas como 2, 17, 24, 31 y 40 fueron utilizadas para la evaluación fisicoquímica en tiempo cero y tal como se evidencia en los Cuadros 4 y 5, todas las muestras cumplieron la evaluación física y química. Sin embargo, la investigación concluyó 60 días antes de finalizado el tiempo previsto, ya que a los 30 días de iniciado el estudio de estabilidad se observó la decoloración completa de las sombras, para lo cual se tomaron las muestras enumeradas como 6, 10, 19, 26 y 34, para realizar un segundo análisis físico y químico. El análisis físico fue insatisfactorio, ya que se observó un producto, que a pesar de no presentar un cambio de olor o aroma desagradable ni apelmazamiento o formación de grumos, se apreció un polvo fino de color blanco. La decoloración de las betacianinas se produce debido a la hidrólisis generada por las condiciones de humedad y temperatura de la cámara de estabilidad. La degradación de las betacianinas se ha descrito por varios autores especialmente para betanina, esta puede sufrir distintos tipos de degradación por diferentes vías: Isomerización, descarboxilación, desglicosilación, deshidrogenación e hidrólisis. La hidrólisis de la betanina genera ácido betalámico (de color amarillo brillante) y ciclo-Dopa-5-O- $\beta$ -glucósido, un compuesto incoloro (Vergara, 2013), esto explica el cambio de coloración observado. El análisis químico mostró evidencia de la degradación de los colorantes, en donde se observó ausencia de los picos representativos para el totalidad de las muestras pero es importante mencionar que sí se observaron picos en algunas muestras (Anexo 8) lo cual sugeriría que la degradación de los colorantes no fue completa a nivel molecular, además se describe mayor presencia de betaxantinas por la identificación de la máxima absorbancia representativa en más muestras, debido posiblemente a la facilidad de las betacianinas en convertirse a betaxantinas, aunque estas últimas son más lábiles (Mandujano, 2006).

Las otras cinco unidades, enumeradas como 3, 11, 28, 36 y 39 fueron enviadas a LAFYM y utilizadas para la evaluación microbiológica, cuyos resultados resumidos en el Cuadro 6, reportan incumplimiento con los requerimientos del Reglamento Técnico Centroamericano para cosméticos. El parámetro de mesófilos aerobios determina menos de 1000 unidades formadoras de colonia por gramo de muestra y los resultados de las muestras analizadas superan excesivamente el valor permitido. La presencia de mesófilos aerobios refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado (Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, 1995). Es importante hacer notar que las condiciones de un laboratorio de producción de cosméticos está bajo regulación estricta y las condiciones en que se elaboró el lote experimental no satisface los requerimientos mínimos para un laboratorio de elaboración de productos cosméticos, para demostrar que los resultados insatisfactorios se debieron a estos factores, se procedió a fabricar un segundo lote de sombras (Anexo 6) realizando un conteo aeróbico con la consiguiente elaboración de los medios de cultivo, preparación de muestras e incubación de placas de petri por la autora, reforzando las buenas prácticas de manufactura y tomando especial cuidado al momento de envasar el producto; por lo que se demostró, de acuerdo al Cuadro 14 en el Anexo 6, que al tomar dichas medidas correctivas se logró obtener un producto que cumplió con la especificación requerida, expresando un resultado de menos de 10 unidades formadoras de colonias (UFC) para la totalidad de las muestras analizadas. Aunque se obtuvo resultados negativos en torno al tema microbiológico al iniciar el estudio de estabilidad, éste se continuó y se realizó un segundo análisis con las muestras enumeradas como 8, 16, 22, 30 y 38, y enviadas nuevamente a LAFYM. Demostrando que la contaminación por mesófilos aerobios no aumentó pero se encontró que dos muestras presentaron mohos y levaduras, que pudo deberse por las mismas condiciones de producción que no fueron las ideales y que llevaron a contaminar el producto con esporas, sumado a que las condiciones de la cámara de estabilidad propiciaron su desarrollo. De acuerdo a los resultados obtenidos sobre el estudio de estabilidad acelerada, se concluye que estadísticamente no se rechaza  $H_0$  a un nivel de significancia de 0.05, ya que para lograr aceptar  $H_a$  los análisis tuvieron que haber arrojado resultados satisfactorios en todas las muestras evaluadas y por ende el producto no satisface los requerimientos para determinar una fecha de vencimiento probable para el mismo.

Al concluir el presente estudio, se pudo confirmar el cumplimiento de los objetivos planteados aunque no se consiguieran resultados positivos en la estabilidad acelerada; sin embargo, seis meses después de fabricado el primer lote de producto, se observó que bajo condiciones de anaquel el cosmético mantuvo la coloración homogénea e inalterada como se evidencia en el apartado en el Anexo 4, lo cual sugiere la necesidad de evaluar la estabilidad real del producto mediante un estudio de estabilidad a largo plazo. Por lo tanto, se respalda el cumplimiento del objetivo general de la investigación, permitiendo la propuesta de unas sombras en polvo suelto como una formulación cosmética con la confirmación de la posibilidad de utilización de los pigmentos presentes en la remolacha, *Beta vulgaris* en la industria cosmética.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1.** El porcentaje de rendimiento de la extracción no es medible en base a la cantidad de pigmento neto pero se alcanzó un porcentaje de rendimiento significativo en base a la totalidad de sólidos obtenidos (7.00%) en comparación a otros estudios realizados, en donde se reporta un rendimiento de 12.00%.
- 10.2.** Se identificó la presencia de betacianinas y betaxantinas en el extracto obtenido mediante su caracterización cromatográfica y espectrofotométrica, observando bandas con coloraciones representativas y picos máximos de absorción característicos respectivamente, comparables con los valores teóricos reportados en la literatura.
- 10.3.** Se incorporó el extracto obtenido en una sombra en polvos sueltos como una propuesta de formulación cosmética por obtener una estabilidad superior en contraste a otras formulaciones de productos cosméticos fabricadas.
- 10.4.** El estudio de estabilidad acelerada del lote de producto evaluado no culminó en el tiempo previsto por no cumplir con los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos establecidos a los 30 días de iniciado el estudio en base a la determinación estadística en la cual no se rechaza  $H_0$  a un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 por no obtener “cumple” en las 5 repeticiones de cada análisis.
- 10.5.** De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone la integración de los pigmentos presentes en la remolacha para ser empleados en sombras de ojos en polvos sueltos con una estabilidad máxima de 6 meses. Por lo que se confirma que los pigmentos pueden ser utilizados en la elaboración de cosméticos secos.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Determinar la fecha de vencimiento real del producto propuesto a través de un estudio de estabilidad a largo plazo bajo condiciones de anaquel.
- 11.2. Evaluar la estabilidad de los pigmentos presentes en *Beta vulgaris* al ser incorporado en distintas formulaciones cosméticas diferentes a las evaluadas en el presente estudio para determinar específicamente en qué formas cosméticas pueden ser utilizados además de sombras en polvo suelto.
- 11.3. Realizar un estudio de aceptación del producto propuesto, midiendo el grado de aceptación y/o rechazo del mismo para determinar si es factible la elaboración a gran escala dirigido a un mercado potencial.
- 11.4. Evaluar la incorporación de los pigmentos presentes en la remolacha, *Beta vulgaris*, en productos alimenticios, textiles y farmacéuticos para así determinar su potencial aplicación en dichos campos para el aprovechamiento agroindustrial y su desarrollo comercial en Guatemala.
- 11.5. Evaluar las propiedades y actividades biológicas que se le atribuyen a la remolacha, tales como su actividad antioxidante y potencial uso como indicador ácido-base para su aprovechamiento y creación de productos novedosos, útiles y principalmente nacionales.

## 12. REFERENCIAS

- Aceituno, M. L. (2006). *Evaluación de la calidad microbiológica en sombra de ojos, tipo polvo compacto de un laboratorio de producción nacional, según método de referencia USP 2005*. Tesis Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Pp. 01-40.
- Aceituno, V. M. (2010). *Propiedades de colorantes naturales secados con técnicas alternativas a nivel laboratorio como alternativa al FD&C rojo No 40 en alimentos*. Tesis Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Pp. 01-341.
- Alonso, J. (1998). *Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis Ediciones. Pp. 998-1002.
- Ash, M., Ash, I. (1977). *A formulary of cosmetic preparations*. Estados Unidos: Chemical Publishing Co., Inc. Pp. 122-140.
- Barrientos, N. E. (2005). *Propuesta para la creación y lanzamiento de productos nuevos en la industria cosmética guatemalteca*. Tesis Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Pp. 01-210.
- Calderón, E. (2001). *Obtención del extracto colorante acuoso, a partir de los rechazos de exportación de la producción nacional de dos variedades de pitahaya, a nivel planta piloto*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYT. Guatemala. Pp. 01-72.
- Calvo, M. (s. f.). *Bioquímica de los alimentos*. Universidad de Zaragoza. España. Recuperado de: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/aditivos/colorartif.html>.
- Carrasco, F. (2005). *Diccionario de ingredientes cosméticos*. 3ª Ed. Imagen Personal. España. Pp. 23, 75-486.

- Cevallos, O., Lucio, J. (2014). *Aplicación de solvente alcalino y tiempo de extracción para la producción de bixina en la semilla de achiote (Bixa Orellana)*. Tesis Ingeniero Agroindustrial. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manab, MFL. Ecuador. Pp. 28-41.
- Cohen, R. (2007). *Safety of cosmetics is a gray area*. New Jersey. Campaign for Safe Cosmetics. Recuperado de: <http://safecosmetics.org/article.php?id=97>.
- Cruz, S. M. (2008). *Identificación y cuantificación de colorantes naturales en cinco especies vegetales nativas*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYT. Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, SENACYT. Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, FONACYT. Universidad de San Carlos de Guatemala, USAC. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. Pp. 01-70.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (2002). *Beet red*. Recuperado de: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-052.pdf>.
- Food and Drug Administration, FDA. (2010). *Color additives permitted for use in cosmetics*. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Estados Unidos. Recuperado de: <http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/VoluntaryCosmeticsRegistrationProgramVCRP/OnlineRegistration/ucm109084.htm>.
- Food and Drug Administration, FDA. (2013). *Summary of color additives for use in the United States in foods, drugs, cosmetics and medical devices*. Departamento de Salud y Servicios Humanos. Estados Unidos. Recuperado de: <http://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditiveinventories/ucm115641.htm#table3B>  
<http://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/coloradditiveinventories/ucm115641.htm#table3B>
- Franco, M. E. (2004). *Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (Escontria chiotilla); una cactácea subexplotada*. Tesis Maestra en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp. 06-70.

- Fuentes, W. V. (2005). *Extracción, cuantificación y estabilidad de colorantes naturales presentes en los frutos de Prunus copuli Cav (cereza), Rubus urticaefolius Poir (mora) y Sambucus canadensis L (saúco) como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales rojo No 40, rojo No 3 y Rojo No 2, en bebidas en el rango de pH: 3, 4 y 5*. Tesis Químico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Pp. 01-71.
- García, F., Gandía, F., Escribano, J. (2011). Flores fluorescentes. La combinación de ciertos pigmentos vegetales genera en las flores patrones de fluorescencia que podrían operar a modo de señal para los polinizadores. *Investigación y Ciencia*. España. Recuperado de: <http://www.investigacionyciencia.es/files/2981.pdf>
- García, V. R. (2008). *Evolución de compuestos funcionales durante la maduración de frutos de Opuntia stricta*. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Politécnica de Cartagena. Colombia. Pp. 09-31.
- González, R. (2004). *Estudio nacional del mercado de tintes, colorantes y pigmentos naturales, parte 2: aspectos técnicos*. Instituto Von Humboldt de Colombia. Santiago de Cali.
- Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el Estado de Campeche, ITESCAM. (s.f.). *Secadores por aspersión*. México. Recuperado de: [www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r14214.DOC](http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r14214.DOC)
- International Programme on Chemical Safety, IPCS. (s.f.). *Allura red AC*. Recuperado de: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v15je02.htm>.
- Koul, V. K, Jain, M. P., Koul, S., Sharma, V. K., Tikoo, C. L., Jain, S. M. (2002). Spray drying of beet root juice using different carriers. *Indian Journal of Chemical Technology*, 09(09). Pp. 442-445.
- Lock, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial. Perú. Pp. 119-133.

- Mandujano, R. R. (2006). *Estudio preliminar de los pigmentos presentes en cáscara de pitaya (Stenocereus stellatus) de la región mixteca*. Tesis Ingeniero en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. México. Pp. 07-29.
- Márquez, E., García, Y. (2007). Colorantes naturales de origen vegetal. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. 17(1). Pp. 68-74.
- Mayer, F. (1950). *La química de las materias colorantes naturales. Constitución, propiedades y correlaciones biológicas de los pigmentos naturales importantes*. Madrid: Aguilar. Pp. 30-100.
- Nonhebel, G., Moss, A. (2002). *El secado de sólidos en la industria química*. España: Reverté. Pp. 295-308.
- Reglamento Técnico Centroamericano. (2008). *Productos cosméticos: verificación de la calidad*. RTCA 71.03.45:07.
- Reglamento Técnico Centroamericano. (2010). *Productos farmacéuticos: Estudios de estabilidad de medicamentos para uso humano*. RTCA 11.01.04:10.
- Sánchez, N. (2006). *Extracción y caracterización de los principales pigmentos del Opuntia joconoste c.v. (xoconostle)*. Trabajo de graduación. Maestro en tecnología avanzada. México. Pp. 14-21.
- Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. (1995). *Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. México. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Convenio Andrés Bello. Pp. 152.
- Soriano, J., Franco, M. E., Pelayo, C., Armella, M. A., Yáñez, M. L., Guerrero, I. (2007). Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (*Escontria chiotilla*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(1). Pp. 19-25.

- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Stoica, A., Dobre, T. (2011). Betanine extraction from *Beta vulgaris* – experimental research and statistical modeling. *Scientific Bulletin*. 73(1). Pp. 145-156.
- Thimmaraju, R. (2005). *Genetically transformed root cultures of red beet (Beta vulgaris L.) for the production of food, colour and peroxidase*. Tesis Doctoral de Filosofía en Biotecnología. Universidad de Mysore. India. Pp. 11-28.
- Tintizing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Selleppan, S., Akoh, C. C., Bunch, R., Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 53. Pp. 442-451.
- Tórtora, I. A. (2007). *Caracterización, extracción y estabilidad de los colorantes naturales presentes en el cáliz de Hibiscus sabdariffa L. (rosa de Jamaica) como alternativa de consumo del colorante artificial rojo No 40*. Tesis Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. Pp. 01-43.
- Unión Europea. (2009). Regulación (EC) No 1223/2009 del Parlamento y Consejo Europeo. *Official Journal of the European Union*. Recuperado de: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:en:PDF>
- Universidad Nacional de Colombia. (2004). *Secado por aspersión*. Colombia. Recuperado de: [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/manizales/4070035/lecciones/cap7/leccion7\\_7.htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/manizales/4070035/lecciones/cap7/leccion7_7.htm)
- Vergara, C. (2013). *Extracción y estabilización de betalaínas de tuna púrpura (Opuntia ficus-indica) mediante tecnología de membranas y microencapsulación, como colorante alimentario*. Tesis Doctor en Nutrición y Alimentos. Universidad de Chile. Chile. Pp. 01-66.

- Vorhees, C., Butcher, R., Brunner, R., Wootten, V., Sobotka, T. (1983). Developmental toxicity and psychotoxicity of FD and C red dye no. 40 (Allura red AC) in rats. *Toxicology*, 53(4). Pp. 253-264.
- Wilson, E. (s.f.). *Betalaínas: colorantes naturales con actividad antioxidante*. Proyecto de Fitoterapéuticos de Cooperala, PROFITOCOOP. Argentina. Recuperado de: <http://www.profitocoop.com.ar/articulos/Betala%EDnas.pdf>
- Yanchapanta, D. C. (2011). *Obtención de un colorante natural la betalaina a partir de la remolacha (Beta vulgaris) para su aplicación en alimentos y bebidas, sin que sus propiedades organolépticas (sabor y olor) afecten su utilidad*. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador. Pp. 15-37.

### 13. ANEXOS

#### ANEXO 1: Método de ensayo para determinación cuantitativa de betanina

$$\% \text{ Color rojo} = \frac{A * V}{1120 * L * W}$$

Donde:

A = máxima absorbancia

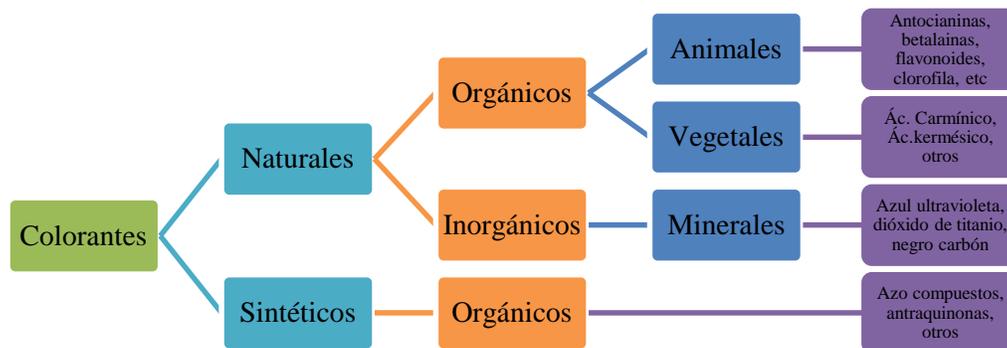
V = Volumen de solución a ensayar medida en mililitros

L= Longitud de la celda medida en centímetros

W= Peso de la muestra en gramos

Fuente: (FAO, 2002)

#### ANEXO 2: Clasificación de los colorantes



Fuente: (Fuentes, 2005).

**ANEXO 3:** Determinación cuantitativa de betanina en extracto seco (obtenido en la presente investigación) en base a datos teóricos

**Cuadro 11.** Datos teóricos sobre el contenido de betanina en extracto seco de remolacha

Peso de material vegetal utilizado	Peso de extracto seco	Contenido teórico de betanina en peso de remolacha	Contenido teórico de betanina en extracto seco	Contenido teórico de almidón como encapsulante
3000 gramos	210 gramos	0.4 – 10 %	12 – 30 gramos	198 - 180 gramos

Fuente: (Aceituno, 2010), (Datos experimentales).

Cálculos:

$$\frac{210 \text{ g} * 0.4 \%}{100 \%} = 12 \text{ g}$$

$$\frac{210 \text{ g} * 10 \%}{100 \%} = 30 \text{ g}$$

$$210 \text{ g} - 12 \text{ g} = 198 \text{ g}$$

$$210 \text{ g} - 30 \text{ g} = 180 \text{ g}$$

**Figura 20 y 21.** Extracto seco de remolacha, *Beta vulgaris*, obtenido en esta investigación.



Fuente: (Datos experimentales).

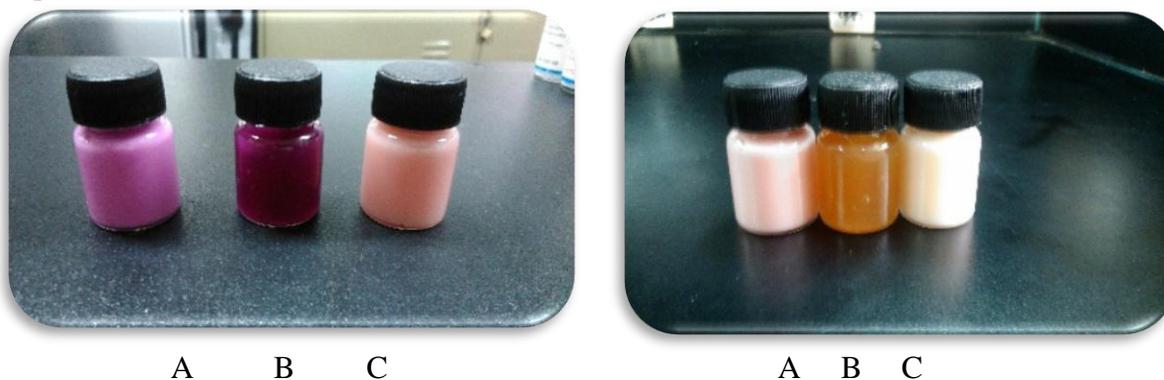
**ANEXO 4:** Selección del cosmético escogido para realización de estudio de estabilidad acelerada

**Cuadro 12.** Observación de la coloración de los cosméticos evaluados con relación al tiempo.

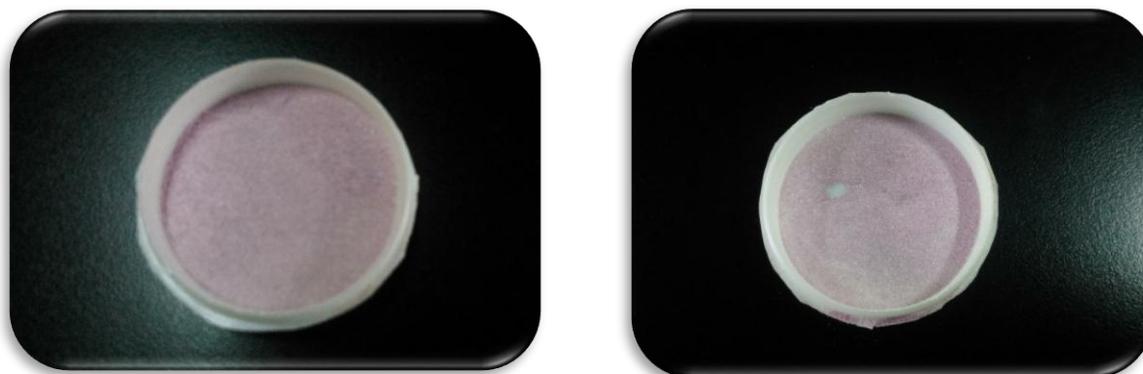
Cosmético	Coloración Inicial*	Coloración a 5 días de fabricado*	Coloración a 6 meses de fabricado*
Crema de manos	Coloración homogénea	Decoloración completa	Decoloración completa
Gel para el cabello	Coloración homogénea	Decoloración completa	Decoloración completa
Brillo labial	Coloración homogénea	Decoloración completa	Decoloración completa
Rubor	Coloración homogénea	Coloración homogénea	Coloración homogénea

\*Bajo condiciones de anaquel  
Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 22 y 23.** Crema de manos (A), gel para el cabello (B) y brillo labial (C). Figura 21: En el día de fabricación. Figura 22: 5 días después de su fabricación. Fuente: (Datos experimentales).



**Figura 24 y 25.** Sombra en polvos sueltos. Figura 23: En el día de fabricación. Figura 24: 6 meses después de su fabricación. Fuente: (Datos experimentales).



**ANEXO 5:** Resultados del estudio de estabilidad física, química y microbiológica para primer lote de producto fabricado

**Cuadro 13.** Resultados de la evaluación de las muestras sometidas a estabilidad acelerada

Muestra No.	Utilizada en			Utilizada en			Otros
	Estabilidad acelerada, tiempo cero			Estabilidad acelerada, a 30 días			
	Física	Química	Microbiológica	Física	Química	Microbiológica	
1							N.U
2	C	C					
3			N.C				
4							N.U
5							N.U
6				N.C	N.C		
7							N.U
8						N.C	
9							N.U
10				N.C	N.C		
11			N.C				
12							N.U
13							N.U
14							N.U
15							N.U
16						N.C	
17	C	C					
18							N.U
19				N.C	N.C		
20							N.U
21							N.U
22						N.C	
23							N.U
24	C	C					
25							N.U
26				N.C	N.C		
27							N.U

28			N.C				
29							N.U
30						N.C	
31	C	C					
32							N.U
33							N.U
34				N.C	N.C		
35							N.U
36			N.C				
37							N.U
38						N.C	
39			N.C				
40	C	C					

\*C=Cumple  
 N.C=No Cumple  
 N.U=No Utilizado

Fuente: (Datos experimentales).

**Cuadro 14.** Muestras utilizadas para análisis físico y químico después de 30 días bajo condiciones de estabilidad acelerada



Fuente: (Datos experimentales).

**ANEXO 6:** Resultados de análisis microbiológico para comprobación de ausencia de contaminación por mesófilos aerobios en segundo lote de producto, mediante reforzamiento de buenas prácticas de manufactura.

**Cuadro 15.** Resultados resumidos de análisis microbiológico en segundo lote de producto

Análisis	Resultado	Especificación RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	< 10 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g

Fuente: (Datos experimentales).

**Cuadro 16.** Resultados de la evaluación de las muestras sometidas a análisis microbiológico en segundo lote de producto

Muestra analizada	Resultado	Especificación RTCA 71.03.45:07
Muestra 1	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Duplicado muestra 1	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Muestra 2	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Duplicado muestra 2	2 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Muestra 3	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Duplicado muestra 3	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Muestra 4	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Duplicado muestra 4	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Muestra 5	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Duplicado muestra 5	0 UFC/g	<10 <sup>3</sup> UFC/g

Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 27 y 28.** Muestras utilizadas para análisis físico y químico después de 30 días bajo condiciones de estabilidad acelerada



Fuente: (Datos experimentales).

**ANEXO 7:** Producto cosmético propuesto

**Figura 29.** Sombras en polvo suelto con integración de extracto seco de remolacha, *Beta vulgaris*, como producto cosmético propuesto en la presente investigación



Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 30 y 31.** Aplicación corporal de las sombras en polvo suelto propuesto en la presente investigación. Figura 29: Párpados sin maquillaje. Figura 30: Párpados con aplicación de las sombras propuestas.



Fuente: (Datos experimentales).

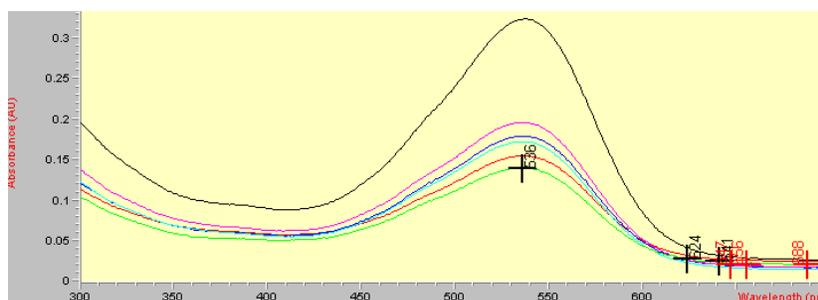
**ANEXO 8:** Resultados de análisis físico

**Cuadro 17.** Resultados de la evaluación espectrofotométrica en tiempo cero y a 30 días en análisis de betacianinas.

No. Muestra	Repetición	TIEMPO CERO		No. Muestra	Repetición	30 DÍAS DESPUÉS	
		Picos (nm)	Absorbancia			Picos (nm)	Absorbancia
2	1	<b>538.0</b>	<b>0.12111</b>	6	1	660.0	1.06E-02
	2	659.0	1.94E-02		2	***	***
	3	660.0	1.83E-02		3	***	***
17	1	<b>538.0</b>	<b>0.17221</b>	10	1	622.0	1.23E-02
	2	658.0	1.96E-02		2	647.0	1.11E-02
	3	650.0	1.89E-02		3	656.0	1.10E-02
24	1	<b>535.0</b>	<b>0.17201</b>	19	1	627.0	1.47E-02
	2	660.0	1.55E-02		2	645.0	1.37E-02
	3	***	***		3	660.0	1.26E-02
31	1	<b>536.0</b>	<b>0.19570</b>	26	1	615.0	6.21E-02
	2	660.0	1.85E-02		2	656.0	6.17E-02
	3	***	***		3	624.0	6.04E-02
40	1	<b>536.0</b>	<b>0.13952</b>	34	1	<b>538.0</b>	<b>1.36E-01</b>
	2	624.0	2.69E-02		2	625.0	8.41E-03
	3	641.0	2.42E-02		3	641.0	8.18E-03

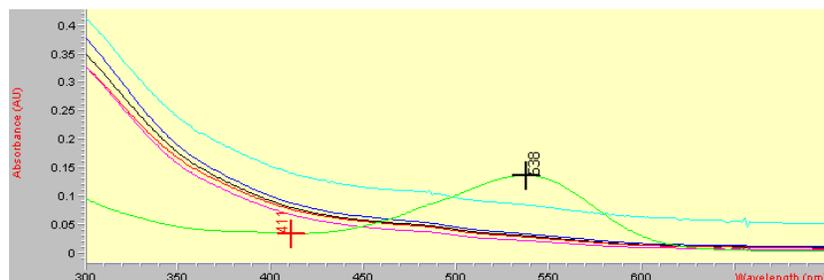
Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 32.** Espectrofotograma tiempo cero en análisis de betacianinas.



Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 33.** Espectrofotograma a 30 días de iniciado el estudio de estabilidad acelerada en análisis de betacianinas.



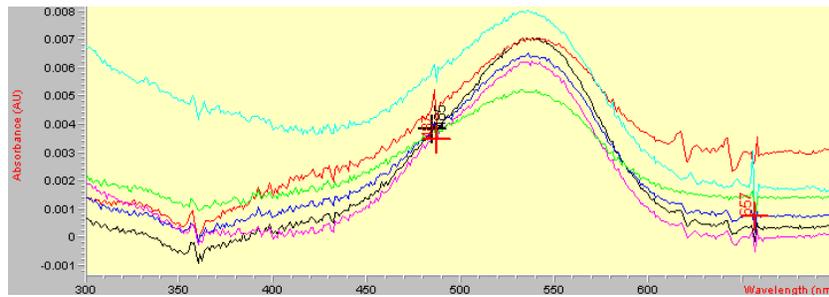
Fuente: (Datos experimentales).

**Cuadro 18.** Resultados de la evaluación espectrofotométrica en tiempo cero y a 30 días en análisis de betaxantinas.

No. Muestra	Repetición	TIEMPO CERO		No. Muestra	Repetición	30 DÍAS DESPUÉS	
		Picos (nm)	Absorbancia			Picos (nm)	Absorbancia
2	1	<b>485.0</b>	<b>3.82E-03</b>	6	1	392.0	3.79E-03
	2	340.0	4.29E-02		2	398.0	3.33E-03
	3	642.0	3.51E-03		3	<b>486.0</b>	<b>1.70E-03</b>
17	1	536.0	0.00651	10	1	433.0	4.39E-03
	2	<b>486.0</b>	<b>4.07E-03</b>		2	477.0	2.77E-03
	3	***	***		3	584.0	4.76E-04
24	1	<b>486.0</b>	<b>6.12E-03</b>	19	1	441.0	2.89E-03
	2	363.0	4.81E-03		2	<b>485.0</b>	<b>2.64E-03</b>
	3	656.0	3.07E-03		3	592.0	-7.39E-04
31	1	<b>486.0</b>	<b>3.90E-03</b>	26	1	357.0	2.53E-02
	2	300.0	1.97E-03		2	392.0	2.29E-02
	3	642.0	2.14E-04		3	398.0	2.29E-02
40	1	<b>485.0</b>	<b>3.85E-03</b>	34	1	538.0	2.06E-02
	2	***	***		2	<b>486.0</b>	<b>1.76E-02</b>
	3	***	***		3	421.0	1.33E-02

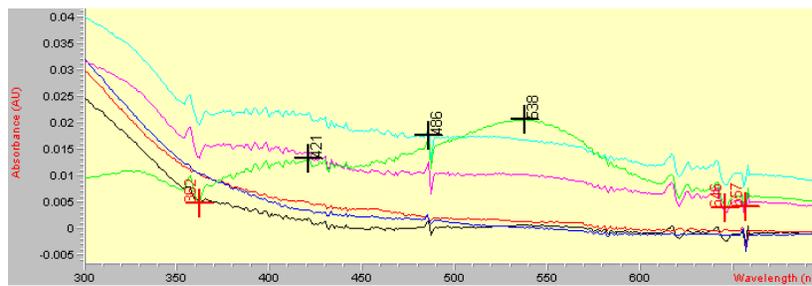
Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 34.** Espectrofotograma tiempo cero en análisis de betaxantinas.



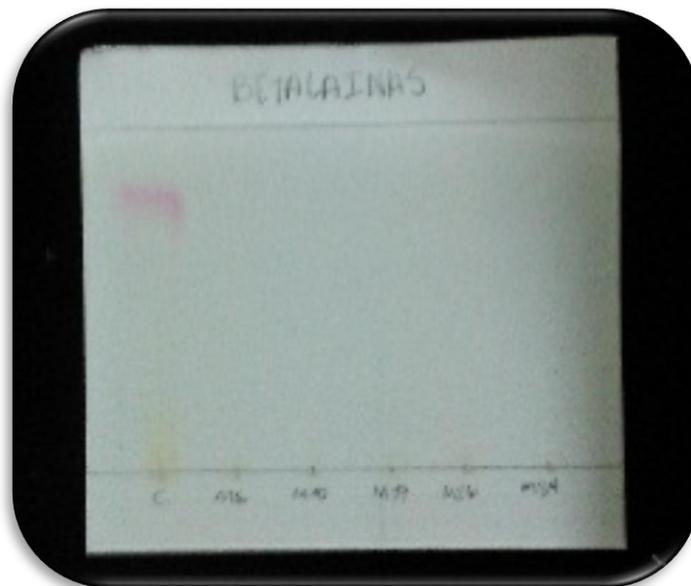
Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 35.** Espectrofotograma a 30 días de iniciado el estudio de estabilidad acelerada en análisis de betaxantinas.



Fuente: (Datos experimentales).

**Figura 36.** Cromatoplaaca revelada a 30 días de iniciado el estudio de estabilidad acelerada.



Fuente: (Datos experimentales).

**ANEXO 9:** Resultados de análisis microbiológico enviados a LAFYM.

- Análisis de estabilidad microbiológica tiempo cero. Muestras analizadas: 3, 11, 28, 36 y 39.
- Análisis de estabilidad microbiológica a 30 días de iniciado el estudio. Muestras analizadas: 8, 16, 22, 30 y 38.



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1328 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: *Lucía Orellana* Ingreso: 02/09/14  
Nombre del producto: SOMBRAS PARA OJOS Inicio de análisis: 02/09/14  
Reporte final: 13/09/14  
Presentación: Polvo  
Lote: 3

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	6.0 x 10 <sup>9</sup> UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	< 10 UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM  
Licda. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnet.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1329 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: Lucía Orellana Ingreso: 02/09/14  
Nombre del producto: SOMBRAS PARA OJOS Inicio de análisis: 02/09/14  
Reporte final: 13/09/14  
Presentación: Polvo  
Lote: 11

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	6.0 x 10 <sup>9</sup> UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	< 10 UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM

Licda. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1330 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: *Lucía Orellana* Ingreso: 02/09/14  
Nombre del producto: SOMBRAS PARA OJOS Inicio de análisis: 02/09/14  
Reporte final: 13/09/14  
Presentación: Polvo  
Lote: 28

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	6.0 x 10 <sup>9</sup> UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	< 10 UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM

*Licda. Ana E. Rodas García*  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1331 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: *Lucía Orellana* Ingreso: 02/09/14  
Nombre del producto: SOMBRAS PARA OJOS Inicio de análisis: 02/09/14  
Reporte final: 13/09/14  
Presentación: Polvo  
Lote: 36

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	6.0 x 10 <sup>9</sup> UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	< 10 UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM  
Lic. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1332 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: Lucía Orellana Ingreso: 02/09/14  
Nombre del producto: SOMBRAS PARA OJOS Inicio de análisis: 02/09/14  
Reporte final: 13/09/14  
Presentación: Polvo  
Lote: 39

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	6.0 x 10 <sup>9</sup> UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	< 10 UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1592 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: *Lucía Orellana* Ingreso: 02/10/14  
Nombre del producto: SOMBRA PARA OJOS Inicio de análisis: 02/10/14  
Presentación: Polvo Reporte final: 12/10/14  
Lote: 8

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	$6.0 \times 10^9$ UFC/g	UFC/g	$\leq 10^3$
Recuento de Mohos y Levaduras	$2.0 \times 10^6$ UFC/g	UFC/g	$\leq 10^2$
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g

Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM  
Licda. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1590 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: *Lucía Orellana* Ingreso: 02/10/14  
Nombre del producto: SOMBRA PARA OJOS Inicio de análisis: 02/10/14  
Presentación: Polvo Reporte final: 12/10/14  
Lote: Segunda muestra de estabilidad  
16

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	<b>6.0 x 10<sup>9</sup> UFC/g</b>	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	<b>6.0 x 10<sup>9</sup> UFC/g</b>	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM  
Lic. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1593 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: Lucía Orellana Ingreso: 02/10/14  
Nombre del producto: SOMBRA PARA OJOS Inicio de análisis: 02/10/14  
Presentación: Polvo Reporte final: 12/10/14  
Lote: 22

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	6.0 x 10 <sup>9</sup> UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	9.0 x 10 <sup>7</sup> UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM

Licda. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3<sup>a</sup> Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1591 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: *Lucía Orellana* Ingreso: 02/10/14  
Nombre del producto: SOMBRA PARA OJOS Inicio de análisis: 02/10/14  
Reporte final: 12/10/14  
Presentación: Polvo  
Lote: Segunda muestra de estabilidad  
30

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	$6.0 \times 10^9$ UFC/g	UFC/g	$\leq 10^3$
Recuento de Mohos y Levaduras	$1.0 \times 10^7$ UFC/g	UFC/g	$\leq 10^2$
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio LAFYM

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM  
Licda. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnett.com



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Laboratorio de Análisis Físicoquímicos  
y Microbiológicos LAFYM

### Informe de Resultados de Análisis Microbiológico en Cosméticos

No. de ingreso: 1594 No. de muestra: 1 (una)  
Dirigido a: *Lucía Orellana* Ingreso: 02/10/14  
Nombre del producto: SOMBRA PARA OJOS Inicio de análisis: 02/10/14  
Presentación: Polvo Reporte final: 12/10/14  
Lote: 38

Análisis	Resultado	Dimensional	RTCA 71.03.45:07
Recuento total de Mesófilos aerobios	<b>6.0 x 10<sup>9</sup> UFC/g</b>	UFC/g	≤ 10 <sup>3</sup>
Recuento de Mohos y Levaduras	< 10 UFC/g	UFC/g	≤ 10 <sup>2</sup>
Recuento Coliformes Totales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
Recuento de Coliformes Fecales	< 10 UFC/g	UFC/g	NPL
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Sin dimensionales	Ausencia

#### CONCLUSIÓN:

La muestra recibida y analizada en el laboratorio, no satisface los criterios microbiológicos.

\*Métodos de Referencia: Pharmacopea USP 36

Límites microbiológicos: RTCA/Reglamento técnico centroamericano

\*Prohibida la parcial o total reproducción por el cliente u otra persona, sin la debida autorización escrita por parte del laboratorio **LAFYM**

\*Estos informe pertenecen única y exclusivamente a la muestra descrita, tal y como fue recibida en el laboratorio.

#### 1. Nomenclatura utilizada:

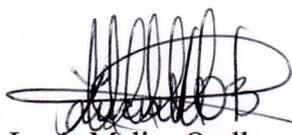
UFC/g Unidades Formadoras de Colonia por gramo

Jorge R. Valverth, QB  
Analista



Lic. Ana Rodas de García, QB  
Jefe LAFYM  
Licda. Ana E. Rodas García  
QUÍMICA BIÓLOGA  
COL. 2323

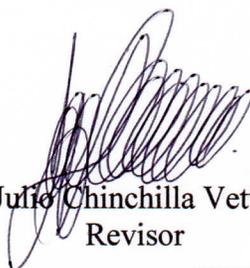
3ª. Calle 6-47 zona 1  
TeleFax: 22531319  
lafymusac@intelnett.com



Lucía Melisa Orellana Barahona  
Autora



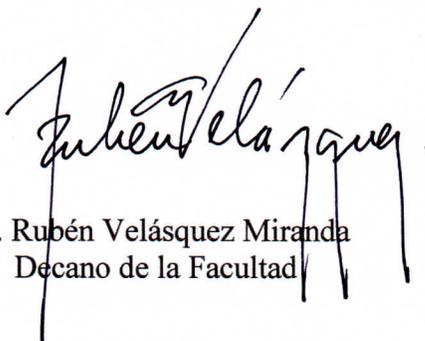
Dra. Sully Margot Cruz Velásquez  
Asesora



Lic. Julio Chinchilla Vettorazzi  
Revisor



Msc. Hada Marieta Alvarado Beteta  
Directora de Escuela



Dr. Rubén Velásquez Miranda  
Decano de la Facultad