

## Nota técnica:

# Un nuevo método para el aislamiento de betalainas por HPTLC

M. J. Moreno-Alvarez<sup>1</sup>, A. Vilorio-Matos <sup>1</sup>, D. M. Hidalgo-Báez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Simón Rodríguez. Valencia. Republica Bolivariana de Venezuela.

<sup>2</sup>Universidad de Los Andes. Mérida. Republica Bolivariana de Venezuela.

## Resumen

Raíces de *Beta vulgaris* L., fueron procesadas para investigar la composición de betalainas. La separación y purificación se llevo a cabo mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC). Fueron eluidos en dos sistemas de solventes en una sola dimensión independientemente. El estudio químico revela una fracción roja y otra amarilla, determinándose absorbancia máxima a 537 nm (betacianina) y 465 nm (betaxantina), respectivamente. La técnica cromatográfica empleada fue de buena resolución y de menor tiempo de recorrido que las de TLC, evitando el riesgo de oxidación.

**Palabras clave:** *Beta vulgaris*, betacianinas, betaxantina, HPTLC, purificación.

## Introducción

Las betalainas se derivan del ácido betalámico. La importancia biológica de estos compuestos incluyen los antiviruses y las actividades antibacterianas y son también marcadores taxonómicos y filogenéticos. Desempeñan un papel importante en la atracción de dispersadores de la semilla y de polinizadores. Tienen un alto potencial como pigmentos naturales para los usos del alimento. Las betalainas se han utilizado como sustituto del colorante sintético en el proceso de la gelatina, del yogur de fresa, del helado, de las

ensaladas de frutas, de los caramelos y de las galletas. La Comunidad Económica Europea ha aceptado (Cod. E162), la deshidratación y pulverización de la remolacha roja *Beta vulgaris* L. (3, 4, 5).

Varios métodos para el aislamiento y la purificación de betalainas se han divulgado (1, 7, 8) incluyendo la cromatografía de intercambio de ion, la electroforesis, HPLC y TLC (2, 3, 6).

El método Bilyk (2) que usa un preparado de celulosa de TLC es la técnica más usada. Incluye tres

progresos unidimensionales en dos diversos sistemas de solventes (Mezcla I: isopropanol 55: etanol 20: agua 20: ácido acético 5, Mezcla II: isopropanol 30: etanol 35: agua 30: ácido acético 5). Los compartimientos para secar las placas se condicionan con el líquido del nitrógeno. El tiempo de enjuague total es más alto para este método, el autor no reportó estos datos pero nuestros experimentos que

usaban el método convencional del TLC mostraron un enjuague total de 5 horas. Estas características son desventajosas debido a que aumenta el riesgo de la oxidación y de costo. El actual trabajo reporta un método rápido, simple y de alta resolución para el aislamiento de betalainas los cuales son componentes importantes para el uso de los alimentos.

## Materiales y métodos

### Muestras

Las raíces de *Beta vulgaris* L. se cultivan en la región de Los Andes ( $145.0 \pm 0.1$  g) y fueron adquiridas en un local comercial en el Municipio Bejuma, Canoabo, estado Carabobo, Venezuela. La época de cosecha fue en Noviembre de 2000.

Las muestras mostraron la madurez para el consumo, el color homogéneo y la ausencia del daño físico evidente. Envases acondicionados con hielo seco ( $\text{CO}_2$ ) fueron utilizados para el transporte de las muestras (temperatura  $7.0 \pm 1.0$  °C). Las raíces fueron lavadas con agua y secadas en papel absorbente. Después de que la piel fuera removida,  $120.0 \pm 0.1$  g de raíces fue obtenido y las muestras fueron cortadas con el cuchillo de acero inoxidable y extraídas. El pH fue evaluado.

### Instrumentación

El extracto fue obtenido usando un extractor de jugo, Eastern Electric a modelo JX5000. Un pHmetro Orion fue utilizado para las medidas del pH. Las placas de HPTLC-Fertigschichten de la celulosa, 10 x 10

centímetros, Merck, Cat de N° 5632 fueron utilizadas para el aislamiento de los compuestos. Una bomba eléctrica Emerson, Modelo 5A55JXGTD-4144 fue conectada a una estufa aspiradora y fue utilizada para secar las placas. El proceso de la filtración fue realizado utilizando un embudo de porcelana Pyrex® E.E.U.U., N° 36060, 15 ml, ASTM 10-15 M.

### Aislamiento y purificación

El extracto fue aplicado con los tubos capilares como líneas continuas hasta que la saturación en las placas de la celulosa HPTLC, que fueron activadas previamente durante 30 minutos en la temperatura de  $90.0 \pm 1.0$  °C. Dos progresos unidimensionales fueron desarrollados usando dos diversos sistemas de los solventes (cuadro 1). El primer desarrollo en la mezcla II y el segundo en la mezcla I (2). El tiempo de enjuague en la mezcla II fue de 1.20h. Luego de esto, las placas fueron secadas en una estufa aspiradora conectada a una bomba eléctrica, dentro de ella  $400.0 \pm 0.1$  g

**Cuadro 1. Composición y proporción de dos sistemas de solventes usados en HPTLC**

Solventes	Sistema I	Sistema II
Isopropanol	55	30
Etanol	20	35
Agua	20	30
Ácido acético	5	5

de hielo seco fue colocado. Las condiciones de enfriado al seco fueron: temperatura de  $5.0 \pm 1.0$  °C, presión de 5 pulgadas hectogramo y el tiempo fue de 25 minutos. El mismo procedimiento fue realizado usando la mezcla I, el tiempo de enjuague con estos sistemas solventes fue de 1.0 h. El desarrollo y el proceso del secado fue realizado en sitios oscuros. Los valores del  $R_f$  (cuadro 2) para cada compuesto de detección fue determinada. Fueron removidos grandes cantidades de los componentes usando una espátula y colocados en un embudo de porcelana. El agua destilada fue utilizada para

lavarlo (10 ml). El Filtrado fue recogido directamente en una célula espectral y su espectro visible fue tomado. El pH de los componentes recolectados fue de 6.1. Los procesos de remoción y lavado fueron hechos en un lugar oscuro. Cuatro placas fueron necesarias para conseguir el espectro visible. Sin embargo, diez placas fueron usadas para estudiar la reproducibilidad de este método.

Para comparar el método usando HPTLC con la técnica convencional del TLC, todos los experimentos fueron realizados utilizando estos dos tipos de placas bajo las mismas condiciones.

## Resultados y discusión

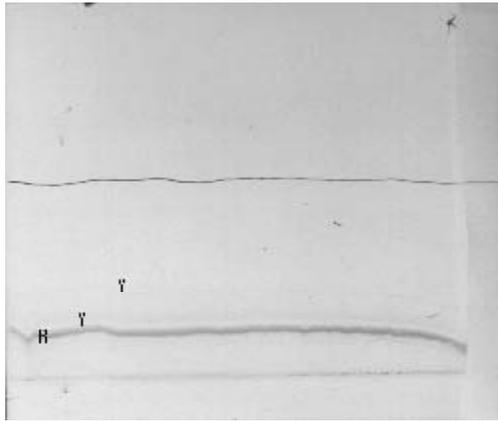
Los valores del  $R_f$  y los colores para los componentes principales se muestran en el cuadro 2. La detección

visual permitió la observación de tres fracciones delimitadas (figura 1), la fracción con el alto valor del  $R_f$  no fue

**Cuadro 2. Valores del  $R_f$  y color de los principales compuestos detectados por HPTLC**

Compuestos	$R_f$	Color
1	0,48	Amarillo
2	0,34	Amarillo <sup>1</sup>
3	0,22	Rojo <sup>1</sup>

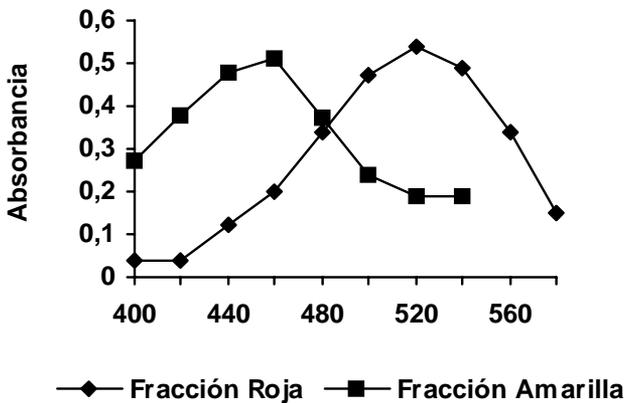
<sup>1</sup> Compuestos principalmente detectados



**Figura 1. Cromatopla de HPTLC del extracto acuoso de *Beta vulgaris* L.**

identificada. Los valores del Rf fueron 0.22 y 0.34 para el componente rojo y el amarillo, respectivamente. Ambos compuestos fueron identificados por sus espectros visibles (figura 2). El compuesto rojo demostró una absorbancia máxima de 537 nm y el

amarillo en 465 nm. Estas absorbancias han sido reportadas como betaxantina y al betacianina, respectivamente (1, 2, 3, 8). Varias ventajas fueron observadas en el método de HPTLC descrito en este trabajo. La reducción del tiempo de



**Figura 2. Espectros visibles de las betalainas de *Beta vulgaris* L.**

enjuague total fue de 5 h (técnica del TLC) a 2.20 h y el uso de dos progresos disminuyó el riesgo de la oxidación de las betalainas. El reemplazo del nitrógeno líquido (2) por hielo seco

disminuyó el costo e hizo que el método de HPTLC fuera más fácil de manejar. A causa de esto no fue necesario utilizar una cámara especial para secar las placas.

## Conclusiones

El método de HPTC para el aislamiento y la purificación de betalainas demostró altos reproducibilidad, simplicidad y celeridad. La oxidación de betalainas

fue reducida porque los tiempos de enjuague son más cortos. Los usos de hielo seco para el transporte y el proceso de secado hacen este método más versátil a bajo costo.

## Reconocimientos

Los autores agradecen al Dr. José Luis Burguera, del Universidad de Los Andes y a la Dra. Carmen Saénz, de la Universidad de Chile, por sus sugerencias y revisión crítica del manuscrito. Agradecemos a la Lic. Nancy Cordero, Sra. Marina Oliveros, Sra. María de Lourdes Figueroa y a la Sra. Yannet Silva, personal de la

Universidad Simón Rodríguez por su eficiencia en la compra de reactivos que se utilizaron en esta investigación. También agradecemos al personal de la Sala Virtual del Núcleo de Canoabo: TSU. Rafael Cabrera, TM. Francisco Fuentes y Br. Julio Ramírez por sus consejos en la búsqueda de la información.

## Literatura citada

1. Bilyk, A. 1979. Extractive Fractionation of Betalaines. *J. Food Sci.* 44: 1249-1251.
2. Bilyk, A. 1981. Thin-Layer Chromatographic Separation of Beet Pigments. *J. Food Sci.* 46: 298-299.
3. Delgado-Vargas, F., R. Jiménez, and O. Paredes-López. 2000. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 173-289.
4. Domínguez-López, A. 1995. Revisión: Empleo de los frutos y de los cladonios de la chumbera (*Opuntia* spp) en la alimentación humana. *Food Sci. Tech. Int.* 1: 65-74.
5. García Barrera, F.A., C.R. Reynoso y E. González de Mejía. 1998. Estabilidad de las betalainas extraídas del garambullo (*Myrtillocactus geometrizans*). *Food Sci. Tech. Int.* 4: 115-120.
6. Huang, A.S. and J.H. A. Von Elbe. 1985. Kinetics of the degradation and regeneration of Betanine. *J. Food Sci.* 50: 1115-1120.
7. Sapers, G. M. and J.S. Horstein. 1979. Varietal Differences in Colorant properties and stability of red Beet Pigments. *J. Food Sci.* 44: 1245-1248.

8. Vilorio-Matos, A., M.J. Moreno-Alvarez and D. Hidalgo. 2001. Isolation and identification of Betacyanin from fruits of *Opuntia boldinghii* Br. et R. by HPTLC. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3 (3): 140-143.
9. Wiley, R. and Y. Lee. 1978. Recovery of Betalaines from red beets by a diffusion-extraction procedure. *J. Food Sci.* 43: 1056-1058.