UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
DE CARTAGENA

Departamento de Ingeniería
Química y Ambiental

BETAXANTINAS DE OPUNTIA COMO COLORANTE ALIMENTARIO NATURAL: CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y PROYECCIÓN TECNOLÓGICA

TESIS DOCTORAL

Pedro José Giménez Fernández

Cartagena, 2015

BETAXANTINAS DE *OPUNTIA* COMO
COLORANTE ALIMENTARIO NATURAL:
CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y
PROYECCIÓN TECNOLÓGICA

Memoria presentada en la Universidad Politécnica
de Cartagena (UPCT) como Tesis Doctoral

Fdo. Pedro José Giménez Fernández

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. JOSÉ ANTONIO FERNÁNDEZ LÓPEZ y D. JUAN IGNACIO MORENO SÁNCHEZ
Directores de la Tesis doctoral *Betaxantinas de Opuntia como Colorante Alimentario Natural: Caracterización, Purificación y Proyección Tecnológica*.

INFORMAN:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D. Pedro José Giménez Fernández, dentro del programa de doctorado *Ingeniería Ambiental y de Procesos Químicos y Biotecnológicos*, dando nuestra conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- ☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 10 de septiembre de 2015

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo.: José Antonio Fernández López

Fdo. Juan Ignacio Moreno Sánchez

COMISIÓN DE DOCTORADO

**CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA**

D. José María Obón de Castro, Presidente de la Comisión Académica del Programa de Ingeniería Ambiental y de Procesos Químicos y Biotecnológicos.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, "BETAXANTINAS DE OPUNTIA COMO COLORANTE ALIMENTARIO NATURAL: CARACTERIZACIÓN, PURIFICACIÓN Y PROYECCIÓN TECNOLÓGICA", ha sido realizada, dentro del mencionado programa de doctorado, por D. Pedro José Giménez Fernández, bajo la dirección y supervisión del Dr. José Antonio Fernández López, siendo codirector el Dr. Juan Ignacio Moreno Sánchez.

En reunión de la Comisión Académica de fecha 28 de septiembre de 2015, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por la Comisión de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- ☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 28 de septiembre de 2015

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

Fdo: José María Obón de Castro

COMISIÓN DE DOCTORADO

ARTÍCULOS PUBLICADOS RESULTADO DE ESTA INVESTIGACIÓN

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; GIMÉNEZ, P.J.; ANGOSTO, J.M.; MORENO, J.I.
“A process of recovery of a natural yellow colourant from *Opuntia* fruits”.
Food Technology and Biotechnology 50, 246-251 (2012).

GIMÉNEZ, P.J.; MORENO, J.I.; ANGOSTO, J.M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.
“Cactus pear fruits as source of a bioactive food colorant”.
4th EMUNI RESEARCH SOUK (2012), ISBN: 978-961-6805-05-06
Ljubljana, Eslovenia.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; GIMÉNEZ, P.J.
“Betalaínas: colorantes naturales bioactivos”.
Investigación y Ciencia 445, 10-12 (2013).

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; ANGOSTO, J.M.; GIMÉNEZ, P.J.; LEÓN, G.
“Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants”.
Plant Foods for Human Nutrition 68, 11-17 (2013).

GIMÉNEZ, P.J.; ANGOSTO, J.M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.
“Bioactividad de colorantes rojos naturales”.
Jornadas de Introducción a la Investigación de la UPCT 6, 91-93 (2013).

GIMÉNEZ, P.J.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; ANGOSTO, J.M.; OBÓN, J.M.
“Comparative thermal degradation patterns of natural yellow colorants used in foods”.
Plant Foods for Human Nutrition (2015).
Publicado *on line*. DOI: 10.1007/s11130-015-0499-0

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A.; GIMÉNEZ, P.J.; ANGOSTO, J.M.
“Betaxanthins from *Opuntia* spp.: Natural yellow colorant with potential applications in foods”.
Food Chemistry (2016), (enviado).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
<u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</u>	1
1.1. EL COLOR DE LOS ALIMENTOS	3
1.1.1. Antecedentes	3
1.1.2. Clasificación de los colorantes alimentarios.....	6
1.1.2.1. Derivados isoprenoides.....	8
1.1.2.2. Derivados benzopiranos	11
1.1.2.3. Derivados tetrapirroles	13
1.1.2.4. Melaninas, melanoidinas y caramelos	16
1.1.2.5. Otros colorantes.....	17
1.1.3. Estructura química y absorción de luz.....	18
1.1.4. Legislación	21
1.1.5. Colorantes alimentarios naturales.....	27
1.1.6. Estabilidad del color en los alimentos	44
1.1.6.1. Estabilidad oxidativa	45
1.1.6.2. Efecto del pH	46
1.1.6.3. Estabilidad térmica.....	47
1.1.6.4. Fotoestabilidad.....	49
1.1.6.5. Efecto de la alta presión	50
1.2. LOS FRUTOS DE <i>OPUNTIA</i> COMO FUENTE DE PIGMENTOS.....	51
1.2.1. Características del género <i>Opuntia</i>	52
1.2.2. Principales especies de <i>Opuntia</i>	58
1.2.2.1. <i>Opuntia ficus-indica</i>	58
1.2.2.2. <i>Opuntia engelmannii</i>	59
1.2.2.3. <i>Opuntia inermis</i>	60
1.2.2.4. <i>Opuntia dillenii</i>	61
1.2.2.5. <i>Opuntia linguiformis</i>	62
1.2.2.6. <i>Opuntia stricta</i>	62
1.3. BETALAÍNAS.....	65
1.3.1. Distribución.....	66
1.3.2. Estructura y color	71
1.3.3. Ruta biosintética	76
1.3.3.1. Biosíntesis basada en la tirosina	77
1.3.3.2. Biosíntesis basada en la tiramina.....	80
1.3.4. Bioactividad.....	81
<u>CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</u>	87
2.1. JUSTIFICACIÓN	89
2.2. OBJETIVOS	91
<u>CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL .....</u>	93
3.1. MATERIALES	95
3.2. MÉTODOS.....	97

3.2.1. Extracción de pigmentos y obtención de extractos colorantes	97
3.2.2. Caracterización físico-química de los extractos.....	99
3.2.2.1. Determinación de sólidos solubles totales	100
3.2.2.2. pH.....	100
3.2.2.3. Densidad.....	100
3.2.2.4. Viscosidad.....	101
3.2.2.5. Acidez	102
3.2.2.6. Análisis por espectrofotometría y determinación del contenido en betaxantinas	103
3.2.2.7. Determinación de las coordenadas de color	103
3.2.3. Obtención de un extracto colorante concentrado	106
3.2.3.1. Caracterización físico-química	107
3.2.3.2. Análisis cromatográfico.....	108
3.2.4. Análisis de compuestos bioactivos	113
3.2.4.1. Determinación de fenoles totales.....	113
3.2.4.2. Análisis y cuantificación de flavonoides	115
3.2.4.3. Determinación de carotenoides.....	117
3.2.5. Estudio de estabilidad al almacenamiento del extracto colorante concentrado	118
3.2.6. Microencapsulación y atomización del extracto colorante.....	119
3.2.6.1. Obtención del extracto en polvo	120
3.2.6.2. Análisis del extracto en polvo por microscopía electrónica de barrido (SEM)	123
3.2.7. Ensayos de termosensibilidad del extracto. Comparación con otros colorantes amarillos naturales de uso alimentario	124
3.2.7.1. Extractos colorantes	124
3.2.7.2. Tratamiento térmico	125
3.2.7.3. Cinética de degradación del color	125
3.2.7.4. Determinaciones colorimétricas	127
3.2.8. Incorporación del extracto colorante en alimentos modelo	127
3.2.8.1. Formulación de los alimentos modelo.....	127
3.2.8.2. Evolución objetiva del color	128
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
4.1. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE PIGMENTOS	133
4.2. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC.....	140
4.3. OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO CONCENTRADO DE PIGMENTOS. CARACTERIZACIÓN.....	149
4.4. ANÁLISIS DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS	160
4.4.1. Determinación de carotenoides	160
4.4.2. Determinación de fenoles totales	162
4.4.3. Determinación de flavonoides	164
4.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD AL ALMACENAMIENTO DEL EXTRACTO COLORANTE CONCENTRADO	168
4.6. MICROENCAPSULACIÓN Y ATOMIZACIÓN DEL EXTRACTO COLORANTE.....	172
4.7. ENSAYOS DE TERMOSENSIBILIDAD DEL EXTRACTO. COMPARACIÓN CON OTROS COLORANTES AMARILLOS DE USO ALIMENTARIO	182
4.7.1. Ensayo de termodegradación a 30 °C	184
4.7.2. Ensayo de termodegradación a 50 °C	190

4.7.3. Ensayo de termodegradación a 70 °C	195
4.7.4. Ensayo de termodegradación a 90 °C	200
4.7.5. Modelo cinético.....	207
4.8. INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO COLORANTE EN ALIMENTOS	
MODELO.....	213
<u>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES</u>	221
<u>CAPÍTULO 6: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	227
<u>CAPÍTULO 7: ANEXOS</u>	241
7.1. ARTÍCULO 1	243
7.2. ARTÍCULO 2	251
7.3. ARTÍCULO 3	255
7.4. ARTÍCULO 4	263

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría cerrar esta etapa de mi vida agradeciendo a todas aquellas personas que han contribuido a que este trabajo haya podido salir a la luz.

De manera muy especial a mis Directores D. José Antonio Fernández López y D. Juan Ignacio Moreno Sánchez. Sin su ayuda, esfuerzo y dedicación no hubiera sido posible llegar hasta el final. Siempre os estaré eternamente agradecido por contribuir de manera tan importante a mi formación personal y profesional.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental por el apoyo que me han ofrecido durante estos años y por su excelente labor docente.

A todos aquellos profesores que he tenido desde que comencé en la escuela. Todos ellos han puesto su grano de arena para mi formación educativa y personal.

Finalmente, agradecer a mis padres por ser un modelo para mí, y por los valores de sacrificio y respeto que han sabido inculcarme a lo largo de mi vida. Sin su trabajo no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

RESUMEN

Debido a las crecientes restricciones en el uso de los colorantes alimentarios, la presente Tesis Doctoral se plantea respondiendo a la necesidad de las empresas de formular y diseñar colorantes alimentarios amarillos naturales de naturaleza hidrosoluble, y que además de aportar color, también posean demostradas propiedades como sustancias bioactivas beneficiosas para la salud. Como alternativa a los colorantes amarillos sintéticos se propone el empleo de un extracto colorante procedente de frutos de *Opuntia ficus-indica*. Definir el proceso de extracción de los pigmentos, caracterizar el extracto colorante, determinar la presencia de compuestos bioactivos, y conocer su comportamiento ante la acción de factores externos que pueden alterar su actividad deben ser las bases para un correcto diseño de este aditivo alimentario.

El análisis de los resultados nos va a permitir conocer las características y propiedades del extracto colorante, y en base a esto vamos a elegir las matrices alimentarias más adecuadas sobre las que ser evaluado su comportamiento. Finalmente, los estudios de estabilidad en alimentos nos van a revelar la proyección tecnológica y viabilidad de este nuevo extracto colorante natural.

Se selecciona una mezcla hidroalcohólica para la extracción de las betaxantinas presentes en los frutos de *Opuntia*. Tras un proceso de concentración a presión reducida se identifican ocho betaxantinas individuales y betanina entre las betacianinas presentes en el extracto. De todas, destaca como mayoritaria indicaxanteno (prolina-betaxantina). El análisis de carotenoides, flavonoides y fenoles totales confirma el potencial bioactivo del extracto colorante obtenido. El estudio de estabilidad al almacenamiento del extracto revela que tanto a 4 °C como a 25 °C presenta tiempos de vida media similares a los de otros colorantes naturales comerciales. Con el fin de obtener el extracto en polvo se somete a un proceso de atomización y microencapsulación con maltodextrinas con objeto de incrementar su vida útil, facilitar su comercialización y diversificar sus formatos disponibles. Se estudia su termosensibilidad a 30, 50, 70, y 90 °C y se compara con la de otros colorantes amarillos naturales presentes en el mercado, como curcumina, β -caroteno, luteína, amarillo gardenia y riboflavina. Los resultados obtenidos confirman que la temperatura es uno de los factores que más afectan su estabilidad, pero a 30 °C su comportamiento resulta óptimo, por lo que su campo de aplicación está en alimentos que no precisen elevadas temperaturas durante su preparación como es el caso de yogures, helados, zumos o bebidas refrescantes. Por último el extracto obtenido se incorpora en dos alimentos modelo (yogur y bebida refrescante) y se comprueba su excelente comportamiento durante un periodo prolongado de tiempo sin experimentar degradaciones en su color.

ABSTRACT

Due to increasing restrictions on the use of food colorants this Doctoral Thesis arises in response to the needs of the food industries to formulate and design water-soluble natural yellow food colorants. It is also important the bioactive and health-promoting properties of these substances. A new water-soluble colorant extract from *Opuntia ficus-indica* fruits is proposed as an alternative to synthetic yellow colorants. To establish the extraction process, to characterize the new colorant and to analyse its health-promoting characteristics are some objectives of this work. It is also important to know the effects of external factors in the potential of this colorant.

The analysis of the results will allow us to know the main characteristics of this colorant, and then, the most appropriate foods will be chosen to assess its possibilities as new food colorant. Finally, the degradation studies in food model systems will reveal its technological approach and commercial viability.

An water/EtOH (60:40, v/v) mixture was selected as extraction solvent to recover the betaxanthins from *Opuntia* fruits in a sequential extraction procedure. Pigment extract was chemically characterized and individual pigments were identified by HPLC, UV/VIS spectrometry and ESI mass spectroscopy. Proline-betaxanthin (indicaxanthin) was the predominant pigment, while all other betalains were present in comparatively low quantities. A concentrated pigment extract was obtained under rotary evaporation at low pressure. The *Opuntia* fruit extract was analyzed for determined bioactive constituents: flavonoids, total carotenoids and total phenolics. Pigment stability was checked at 4 °C and 25 °C. A powder extract was obtained by co-current spray drying. Maltodextrin was used as drying aid in order to increase its useful life, facilitate the commercialization and diversify its available formats. The thermosensibility of the *Opuntia* fruit extract was compared with the thermal stabilities of five natural yellow colorants used in foods —lutein, riboflavin, curcumin, β -carotene and gardenia yellow—over a temperature range 30-90 °C. Spectral properties and visual color were investigated during 6 hours of heat treatment. The results confirm that the temperature is one of the most important factors affecting its stability, but at 30 °C their behavior is optimal, so the *Opuntia* fruit colorant would be applicate in food that do not require high temperatures during its preparation as is the case of yogurt, ice creams, juices or soft drinks. This colorant was successfully applied in two food model systems: a yogurt and a soft-drink.

1. Introducción

1.1. EL COLOR DE LOS ALIMENTOS

1.1.1. Antecedentes

Está aceptado que el empleo de colorantes por el hombre data de bastante antes que las referencias documentales encontradas al respecto. El ser humano ha estado coloreando su alrededor desde la Prehistoria. Desde las paredes de las cavernas donde moraban, hasta los ropajes que vestían se han servido de los colorantes. Algunos papiros egipcios fechados en el año 1500 a.C. indican que por entonces ya se añadía cúrcuma, azafrán y paprika a algunos alimentos para aromatizarlos y también para hacerlos más atractivos visualmente (*Hutchings, 2006*).

Durante la Edad Media, la economía en Europa se basó en la agricultura bajo las condiciones de feudalismo. En este momento histórico los alimentos se consideraban únicamente como medio de supervivencia. Los aspectos estéticos no eran tenidos en cuenta, al menos por la amplia mayoría de la sociedad, que era muy pobre.

La situación cambió con la urbanización y el comienzo de la Edad Moderna cuando la comercialización, principalmente de especias, alimentos y colorantes procedentes de zonas climáticas más suaves emergió. El comercio de nuevos productos conllevó un cambio en la demanda de los consumidores. Ya no era suficiente consumir un alimento sólo para sobrevivir, sino que el mercado comienza a demandar alimentos con buen sabor y estéticamente apetecibles (*Downham y Collins, 2000*).

A medida que la sociedad evoluciona, se incrementa la importancia del color en el quehacer cotidiano. Muestra de ello es la relevancia del color de la ropa, de objetos ornamentales y también en las paredes de las casas. Como ha ocurrido siempre, y hoy día sigue sucediendo, la industria ha debido adaptarse a los cambios y demandas de la sociedad. La industria de los colorantes en particular ha experimentado un cambio muy importante a lo largo de la Historia, adaptando sus productos a las aplicaciones y requerimientos que el entorno exigía.

Desde los tiempos prehistóricos hasta la primera mitad del siglo XIX, el empleo de colorantes para fines alimentarios, textiles u ornamentales, se basó exclusivamente en la utilización de colorantes naturales obtenidos a partir de materia vegetal y animal. La importancia de estos colorantes naturales disminuyó cuando en 1856 el inglés Sir William Henry Perkin, en su intento por sintetizar quinina, oxidó sulfato de anilina con dicromato potásico y obtuvo el primer colorante sintético: la mauveína, de color púrpura (Figura 1.1). Posteriormente, los químicos alemanes perfeccionaron los colorantes derivados del alquitrán de hulla, hasta tal punto que la mayoría de empresas de colorantes vegetales se arruinaron totalmente antes de que finalizara el siglo XIX. Las ventajas de estos colorantes sintéticos eran su mayor intensidad colorante, su mejor estabilidad y su menor

coste. Datos estimativos revelan que en 1865 las empresas alemanas BASF y Hoechst agrupaban cerca del 50 % del total de la producción mundial de colorantes (Baptista, 2012).

Figura 1.1. Estructura química de la mauveína

Figura 1.2. Placa homenaje a Perkin

A finales del siglo XIX, la expansión industrial ocurrida en Alemania, a consecuencia del auge de la industria farmacéutica, conllevó un incremento en la demanda de colorantes y a raíz de esta situación muchas empresas americanas del sector ganaron gran importancia a nivel global, perdiendo el continente europeo parte de su potencial en este ámbito de los colorantes.

Los últimos datos publicados por la consultora “*Mintel & Leatherhead Food Research*” revelan que en 2011, en cifras globales, el mercado mundial de los colorantes naturales superó por primera vez al de los colorantes sintéticos. Se estima que las ventas globales de colorantes naturales en el año 2011 estuvieron en 475 millones de €, lo que representa un incremento del 29 % sobre las ventas del año 2007, con alzas anuales por encima del 7 %. En este mismo periodo, las ventas de colorantes artificiales vieron ralentizado su crecimiento, que apenas fue del 1 % anual, cerrando 2011 con un valor de 450 millones de €. En conjunto, en el año 2011 el volumen de mercado de los colorantes alimentarios estuvo en los 925 millones de € (Figura 1.3).

Figura 1.3. El mercado global de los colorantes alimentarios

En los últimos años, el cambio más significativo que ha tenido lugar en este sector ha sido el crecimiento en la producción de colorantes naturales, debido a modificaciones llevadas en el proceso productivo para conseguir mejoras en su estabilidad, y también a consecuencia de la presión ejercida por parte de los consumidores demandando productos más naturales. Las últimas estimaciones pronostican que este aumento en la demanda de colorantes alimentarios naturales se mantenga durante los próximos años, con crecimientos anuales en la producción entre el 5-10 %.

1.1.2. Clasificación de los colorantes alimentarios

La clasificación de los colorantes alimentarios se puede realizar atendiendo fundamentalmente a dos criterios: su origen, y su composición química y método de aplicación.

En relación a su origen, los colorantes alimentarios se clasifican en colorantes naturales, colorantes natural-idénticos, y colorantes sintéticos (*Dalzell, 1997*). Probablemente la mejor definición de colorante natural es “aquel que es sintetizado y acumulado o extraído de células vivas” (*Dalzell, 1997*). Los colorantes natural-idénticos son aquellos que son producidos mediante síntesis química, pero su estructura molecular resultante es igual a la de los colorantes naturales. Los colorantes sintéticos son aquellos que se generan químicamente y su estructura no aparece en los colorantes naturales.

Referente a la clasificación de los colorantes se puede decir que no hay unanimidad por parte de los investigadores. *Proudlove (1994)* considera que los colorantes se dividen en dos grupos: aquellos presentes en un alimento por naturaleza, y aquellos que se añaden a un alimento para modificar o reforzar su color. Tampoco se puede decir que haya unanimidad de criterios entre los países a la hora de clasificar los colorantes alimentarios. Por ejemplo, en muchos países el caramelo es reconocido como un colorante natural (*Henry, 1996*), pero esto va en contra de la definición de “colorante natural” dada por *Dalzell (1997)*.

De acuerdo a la clasificación llevada a cabo por *Dalzell (1997)*, que es la más extendida entre los investigadores, basándose en su estructura química se pueden distinguir 5 grupos de colorantes alimentarios naturales: isoprenoides, tetrapirroles, benzopiranos, un cuarto grupo formado por melaninas, melanoidinas y caramelos, y un quinto grupo constituido por otros colorantes que por su estructura química no pueden encuadrarse en ninguno de los grupos anteriores.

Tabla.1.1. Clasificación de los colorantes naturales según Dalzell (1997)

Grupo principal	Subgrupo o clasificación
Isoprenoides	Carotenoides Xantofilas
Tetrapirroles	Clorofilas Porfirinas Pigmentos hemo Bilinas
Benzopiranos	Antocianinas Flavonas Flavonoides Taninos
Melaninas y Caramelos	Melaninas Melanoidinas Caramelos
Otros colorantes	Fenalconas Betalaínas Antraquinonas Carbón Inorgánicos

1.1.2.1. Derivados isoprenoides

Los derivados isoprenoides, como su nombre indica, están basados en múltiples unidades de isopreno (C_5H_8). Su estructura se puede considerar como una cadena de dos terpenoides, donde cada terpenoide está formado por dos unidades de isopreno unidas entre sí, dando como resultado dos unidades formadas por 20 átomos de carbono cada una de ellas. Estas dos unidades se condensan para dar una cadena formada por 40 unidades de carbono. De esta manera se puede decir que estructuralmente los carotenoides son tetraterpenoides.

Según su estructura los carotenoides se pueden clasificar en dos grupos:

1) El primer grupo está formado por aquellos que están formados por enlaces C—H, su naturaleza es exclusivamente hidrocarbonada, se conocen como carotenos.

2) El segundo grupo está constituido por carotenoides que además de C e H, también contienen átomos de oxígeno en la molécula, son las xantofilas.

Figura 1.4. Formación de un terpeno a partir de dos unidades de isopreno

Figura 1.5. Estructura del licopeno (caroteno acíclico)

Figura 1.6. Estructura del γ -caroteno (caroteno monocíclico)

Figura 1.7. Estructura del β -caroteno (caroteno bicíclico)

Figura 1.8. Estructura de la luteína (xantofila bicíclica)

A partir de la estructura química hidrocarbonada de los carotenoides, es evidente intuir que una de sus propiedades es su naturaleza liposoluble. La presencia de grupos hidroxilo en las xantofilas hace que se incremente su polaridad, y por tanto sean más solubles en etanol que los carotenos. Esta propiedad va a influir de un modo determinante en la mayor o menor afinidad de estos pigmentos en según qué matrices alimentarias.

Los carotenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en todo el reino vegetal, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (siendo responsables del color amarillo, naranja y rojo de la mayoría de frutos), en bacterias, algas, hongos y animales. Estos últimos no son capaces de sintetizarlos y los incorporan a través de la dieta. Se estima que la producción anual en la naturaleza ronda las 10^8 toneladas (*Mínguez-Mosquera et al., 2005*).

1.1.2.2. Derivados benzopiranos

El benzopirano es un compuesto orgánico policíclico que resulta de la fusión de un anillo de benceno a un anillo heterocíclico pirano (Fig. 1.9). La estructura básica de antocianidinas, flavinas y taninos, es de tipo C6-C3-C6 (Fig. 1.10) y se considera que deriva del benzopirano. En este grupo, los pigmentos mayoritarios son las antocianidinas, que se forman por incorporación de grupos hidroxilo a la estructura base.

Figura 1.9. Estructura del benzopirano

Figura 1.10. Estructura básica de antocianidinas, flavinas y taninos

La estructura genérica de una antocianidina es la mostrada en la Fig. 1.11, donde R_1 y R_2 pueden ser $-H$, $-OH$ o $-OCH_3$, formando así las diferentes antocianidinas (malvidina, peonidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, etc.).

Figura 1.11. Estructura genérica de las antocianidinas

La estructura de los flavonoides difiere de las antocianidinas en que contienen un grupo cetona o hidroxilo en la posición 4 (Fig. 1.12). Se consideran responsables de algunas tonalidades amarillas que se presentan en las plantas, su nombre deriva del término latino *flavus*, que significa amarillo. Entre los más ampliamente distribuidos están quercitina, kaempferol, luteolina o isorhamnetina.

La estructura química detallada de los flavonoides fue analizada en detalle por *DeMann* (1980).

Los taninos son un grupo de moléculas polifenólicas complejas, solubles en agua, que pueden encontrarse en la corteza de los árboles y en las hojas de muchas plantas. En la formación del té negro a través del pardeamiento enzimático, los substratos son esencialmente flavonoides como la catequina, los cuales son convertidos a sus correspondientes σ -quinonas. Estas quinonas forman dímeros y se complejan formando teorubiginas, que son los principales componentes del té negro. También, los tonos amarronados de los vinos envejecidos en barricas son debidos a la formación de taninos mediante la polimerización de antocianinas y flavonoides.

Figura 1.12. Estructura genérica de los flavonoides

1.1.2.3. Derivados tetrapirroles

Los tetrapirroles son moléculas muy importantes en los organismos vivos. El elemento estructural común en estas moléculas es un átomo central metálico al que van unidos 4 anillos de pirrol, también conocidos como porfirina y que pueden tener una distribución lineal o cíclica.

Dentro de los tetrapirroles se encuentran dos grupos importantes: las clorofilas, donde el átomo metálico central es magnesio; y los hemicromos (hemoglobina y mioglobina), donde el átomo metálico central es hierro. El hierro aparece en la molécula en una coordinación octaédrica. La unión de diferentes moléculas en la posición 6 de coordinación, como oxígeno o monóxido de carbono, influye en el espectro de la molécula, y por tanto en su color.

Figura 1.13. Estructura del pirrol y de la porfirina (tetrapirrol)

Las clorofilas se encuentran principalmente presentes en los cloroplastos de las plantas y la mayoría de las algas. Son varios los tipos de clorofilas presentes en la naturaleza, aunque en la mayoría de las plantas sólo están presentes dos tipos de clorofila (la clorofila “a” y la clorofila “b”), y el resto han sido encontradas en microalgas y las bacterias (*Counsell et al., 1979*).

Figura 1.14. Estructura de la clorofila a

Las clorofilas son los pigmentos mayoritarios de la naturaleza, responsables de la fotosíntesis y de los tonos verdosos que exhiben plantas, algas y bacterias. Son de naturaleza liposoluble y bastantes inestables desde el punto de vista químico.

Figura 1.15. Estructura del grupo hemo

1.1.2.4. Melaninas, melanoidinas y caramelos

Las melaninas, melanoidinas y caramelos suelen agruparse juntos debido a que son moléculas poliméricas complejas y con numerosas unidades estructurales similares. La distinción entre melaninas, melanoidinas y caramelos está en que las melaninas se forman de manera natural y son las responsables del color negro, gris y marrón de muchas plantas y animales (*Delgado-Vargas et al., 2000*). Las melanoidinas y caramelos se forman mediante reacciones de pardeamiento no enzimático, ocurridas habitualmente durante el calentamiento en el procesado de alimentos. Las melanoidinas se producen como resultado de las reacciones de Maillard, que esencialmente es una reacción iniciada entre un azúcar reductor y una amina primaria o secundaria (un grupo amino o un aminoácido). Por el contrario, las reacciones de caramelización se producen por el efecto del calentamiento de los azúcares. Las reacciones químicas y las condiciones para las reacciones de pardeamiento no enzimático han sido descritas por varios autores (*Coultate, 1988; Wong, 1989; DeMann, 1980*). Aunque las etapas iniciales de varias reacciones de Maillard y caramelización difieren, un esquema global de estas reacciones fue propuesto por *Hodge (1953)*.

La estructura base de melaninas y melanoidinas se da en la Figura 1.16. Las melanoidinas son estructuras poliméricas heterogéneas de elevado peso molecular que en su estructura, a diferencia de los polisacáridos, están también participadas por nitrógeno y tienen un color pardo característico. Se forman en las etapas finales de la denominada reacción de Maillard (reacción amino-carbonilo entre amino ácidos o proteínas y azúcares reductores) que tiene lugar durante el horneado, asado o fritura de los alimentos. Las melanoidinas presentan diversas propiedades que inciden en las características organolépticas, funcionales, tecnológicas y nutricionales de los alimentos. Muchas de las estructuras de las melanoidinas no han sido descritas por completo aunque sí se conoce la de algunas de bajo peso molecular. También debido a la complejidad de las reacciones de pardeamiento no enzimático, donde el grupo amino presente puede ser parte de un péptido o de una

proteína, la mayoría de los estudios sobre las reacciones de Maillard se han llevado a cabo usando modelos simples. Estos modelos simples se basan en la reacción de un azúcar reductor y un aminoácido, por ejemplo xilosa y lisina (Arnoldi *et al.*, 1997); glucosa y lisina (Ames *et al.*, 1997); o glucosa y glicina (Yaylayan y Kaminsky, 1997). Los productos poliméricos de las reacciones de Maillard, como las melanoidinas son a menudo caracterizados mediante estructuras que contienen 2 o 3 anillos, donde los anillos pueden contener oxígeno o nitrógeno unido a un grupo CH= .

Figura 1.16. Estructura básica de melaninas y melanoidinas

1.1.2.5. Otros colorantes

Existen otros tipos de colorantes que por su estructura molecular no es posible encuadrarlos en ninguno de los grupos anteriores. Eso no significa que su importancia pueda verse disminuida.

Un grupo de pigmentos naturales, no muy extendidos pero si de gran importancia es el de las betalainas, que inicialmente se describieron como antocianinas nitrogenadas, debido a la presencia de nitrógeno en los anillos que formaban su estructura. Hoy día se les considera un grupo diferenciado de las

antocianinas, y subdividido a su vez, en betacianinas (de color rojo-violáceo) y betaxantinas (de color amarillo).

Dentro de este grupo de “otros colorantes naturales” también se incluyen pigmentos como las fenalonas, la curcumina, la antraquinona y la riboflavina.

1.1.3. Estructura química y absorción de luz

Conocer la estructura química de los colorantes alimentarios ayuda a comprender su comportamiento y a responder preguntas del tipo “¿por qué son coloreados?”, “¿por qué hay colorantes con diferentes colores?”, “¿cómo se ven afectados por el pH, la presencia de oxidantes, la luz o la presencia de determinadas sustancias?”

El color se debe a la absorción de radiación luminosa de manera selectiva según su longitud de onda dentro de la región visible del espectro. Esta absorción de luz está asociada con cambios de energía dentro de la molécula, de acuerdo a la ecuación de Einstein-Böhr:

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

donde ΔE es el incremento de energía (J) por fotón que tiene lugar en la molécula, h es la constante de Planck ($6.626 \cdot 10^{-34}$ J·s), ν es la frecuencia en Hertzios (s^{-1}), c es la velocidad de la luz en el vacío ($2.99 \cdot 10^8$ m·s $^{-1}$), y λ es la longitud de onda (m).

Los átomos, iones o moléculas disponen de un número limitado de niveles energéticos, los cuales están cuantizados. Para que ocurra la absorción de un cierto tipo de radiación, cada fotón incidente deberá ser de una energía exactamente igual a la diferencia energética entre el estado basal y alguno de los estados excitados de la especie absorbente. Dado que esas diferencias en energía son únicas para cada

especie, un estudio de las frecuencias de radiación que son absorbidas por un átomo, ión o molécula, proporcionará las características específicas de la entidad química en estudio. Para esto lo que generalmente se hace es representar la absorbancia frente a la longitud de onda. Al gráfico obtenido de esta manera se le llama espectro de absorción. Este espectro es único para cada elemento o entidad química y se puede decir que dicha gráfica es la huella dactilar de la especie considerada. La apariencia de un espectro determinado depende de la complejidad, estado físico y matriz en que se encuentra la especie absorbente.

Figura 1.17. Espectros de absorción de algunos pigmentos naturales

Por otro lado, la distribución electrónica de las moléculas, así como la naturaleza de sus grupos constituyentes, está estrechamente relacionada con la absorción de luz. Cuando una molécula se encuentra en la configuración electrónica

normal, los electrones ocupan los orbitales más estables (con menor contenido en energía), lo que se conoce como estado fundamental. Si la molécula absorbe luz de una determinada longitud de onda se puede producir la transición de los electrones en los orbitales ocupados, con menor contenido en energía, a los orbitales más externos libres, con mayor contenido en energía. De esta manera se dice que la molécula pasa a un estado excitado.

Figura 1.18. Estructura química y niveles de energía

Combinar la teoría de los orbitales moleculares, y un buen conocimiento de la estructura molecular de los colorantes alimentarios permite por ejemplo saber por qué la clorofila es verde, mientras que la hemoglobina es rojo/violeta, siendo ambos tetrapirroles. La respuesta es que la presencia de un mayor o menor número de dobles enlaces, determinados grupos moleculares, o el hecho de poseer una estructura resonante, hace que la molécula sea más o menos estable, con lo cual la molécula absorberá luz de una longitud de onda distinta, ya que será necesaria una energía determinada para pasar de su estado fundamental a otro excitado.

1.1.4. Legislación

El aumento de la población, el cambio del modelo económico de desarrollo, y la mayor concienciación ciudadana por los hábitos de vida saludables, ha conllevado que se modifiquen también sus hábitos alimenticios. Ya no sólo se busca comer para satisfacer las necesidades nutritivas, sino que se buscan alimentos atractivos visualmente, ricos en nutrientes y sanos. Esto ha llevado a las empresas a adaptar sus productos a la demanda de los consumidores, y a su vez a las autoridades legislativas a crear un marco legal lo más global posible que permita el libre comercio de productos entre países, y garantizando la seguridad de los productos.

Referente a los alimentos, es indudable que el color es una característica de importancia relevante. Basándose en el color, el consumidor recibe numerosa información de los productos: sobre su estado de madurez, sobre su nivel de elaboración, o también sobre su grado de frescura. Considerando estas impresiones visuales, el consumidor es capaz de juzgar si el alimento es seguro de comer, e incluso es capaz de relacionar el color de un alimento con un determinado sabor (*Francis y Clydesdale, 1975*).

Diversos estudios han demostrado que la aceptación de un producto por parte del consumidor depende en buena medida de su apariencia, y por tanto, también de su color (*Cardello, 1994*). De nada sirve que un alimento tenga un nivel óptimo de nutrientes si no apetece ser consumido. Entre las características de un alimento debe sobresalir el hacer atractivo su consumo (*Henry, 1996*).

Los alimentos naturales tienen su propio color y lo ideal sería que se mantuviera a lo largo del proceso de elaboración o transformación industrial, pero la mayoría de las veces no es así. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe en los diferentes lotes de fabricación de un producto, y esto sólo puede lograrse si hay una homogeneización añadida del mismo (*Cubero et al., 2002*).

Se acepta que las razones para la utilización de colorantes alimentarios deben estar sobradamente justificadas. Este sería el caso de conseguir uniformidad en los lotes de fabricación o restaurar el aspecto original del alimento cuyo color se ha visto afectado por el tratamiento térmico, el almacenamiento o la utilización de conservantes. Es decir, que el color que presenta no sea el esperado por los consumidores o que carezca de él por causas naturales o debido al proceso de producción. En estos casos se justifica la incorporación de colorantes porque, según se ha demostrado en múltiples estudios, el color va a influenciar de manera decisiva en la aceptación del producto por parte del consumidor (*Frick, 2003*).

Los colorantes tienen un uso limitado, no deben emplearse de una manera arbitraria, sino que la cantidad aplicada a cada alimento debe atender a la corrección de la pérdida de color que se puede producir en alguno de los siguientes procesos:

- Pérdida de color por tratamientos tecnológicos del proceso: tratamientos térmicos, pelado químico, desecaciones, etc.
- Variaciones físico-químicas, como cambios de luz, pH, potencial redox, etc.
- Efectos bioquímicos: actividad de determinados microorganismos y sus metabolitos, pardeamiento enzimático y no enzimático, etc.

Todos estos factores, junto a las diferencias de tonalidad entre alimentos de diferente variedad, hacen que el producto sea menos atractivo para el consumidor. Esto justifica el empleo de los colorantes como aditivos con el fin de conseguir alguno de los siguientes efectos (*Griffiths, 2005*):

- Reforzar el color ya presente en el alimento, pero menos intenso de lo que el consumidor espera a causa de los procesos anteriormente enumerados.
- Conseguir uniformidad de color en el alimento, para lograr una mayor homogeneidad entre lotes.
- Hacer más apetecibles los alimentos y asociar sabores y colores.

- Facilitar la formación de un efecto pantalla para ayudar a la protección del aroma y de las vitaminas sensibles a la luz.

No obstante, los colorantes son uno de los aditivos alimentarios que más desconfianza crean entre los consumidores, ya que su uso no regulado puede ser peligroso para la salud, e incluso puede ser motivo de fraude al intentar enmascarar defectos presentes en el producto. Deben cumplir con unos requisitos básicos con el fin de prevenir riesgos para la salud de los consumidores: deben ser inocuos, constituir una especie química definida y pura, ser fácilmente incorporables al producto, ser lo más estable posible a la luz, el calor, cambios de pH y a los agentes oxidantes y reductores; poseer compatibilidad con los productos de la matriz donde van a ser incorporados, no tener olor ni sabor desagradables ni cambiar el sabor característico del producto que se colorea, y ser lo más económicos posible (*Burrows, 2009*).

Los requisitos nombrados anteriormente no siempre se cumplen, especialmente cuando hablamos de colorantes naturales, ya que la mayoría de ellos ven modificadas sus propiedades cuando se alteran las condiciones en las que se encuentran en la naturaleza. Los cambios de temperatura y/o de pH así como la exposición a la luz o a la acción de agentes oxidantes, van a provocar variaciones de su color que podrán ser más o menos importantes según la intensidad del efecto que la ocasione y la estabilidad del pigmento implicado. No suele suceder lo mismo con los colorantes artificiales, especialmente con los denominados poliméricos, que en general son sustancias muy estables en cualquier situación.

A raíz de una investigación (*McCann et al., 2007*) sobre los efectos de algunos colorantes alimentarios artificiales que les vincula a la manifestación del desorden por déficit de atención (ADD) en niños, la Unión Europea exige que los alimentos que los contengan adviertan sobre el riesgo de trastornos de atención vinculados a su ingesta. Se trata de los colorantes azoicos: tartrazina (E102), amarillo de quinoleína (E104), amarillo ocazo (E110), azorrubina (E122), rojo ponceau 4R (E124) y rojo allura (E129).

Debido a los efectos secundarios que puedan ocasionar los colorantes en la salud de los consumidores, la FAO/OMS, a través de su Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios, estudia de forma continuada los efectos toxicológicos de éstos en los consumidores. En función de los resultados obtenidos de dichos estudios, se ha elaborado la siguiente clasificación:

- CATEGORÍA A: Colorantes admitidos para uso alimentario.
- CATEGORÍA B: Colorantes que no están suficientemente estudiados para ser incluidos en la categoría A.
- CATEGORÍA C-1: Colorantes no estudiados de forma exhaustiva, pero de los cuales ya se tienen bastantes datos obtenidos de los ensayos de larga duración.
- CATEGORÍA C-2: Colorantes con datos inadecuados para su evaluación, pero de los que no se conocen resultados de los ensayos de toxicidad de larga duración.
- CATEGORÍA C-3: Colorantes de los cuales se tienen pocos datos para evaluarlos, pero que son suficientes como para relacionarlos con efectos perjudiciales para la salud.
- CATEGORÍA D: Colorantes de los cuales se desconocen casi por completo datos referentes a su posible toxicidad.

La Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de fecha 30 de junio, establece la regulación de los colorantes autorizados en la elaboración de productos alimenticios, en la que se restringe de un modo severo el empleo de los colorantes de síntesis. Esta directiva se incorpora al ordenamiento jurídico español mediante el Real Decreto 2001/1995 de fecha 7 de diciembre (BOE de 22 de enero de 1996), por el que se fija la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

Actualmente son 43 los colorantes autorizados como aditivos alimentarios por el Consejo de la Unión Europea (Tabla 1.2), todos ellos con código E (Consejo de

la Unión Europea, 1994). Dieciséis de éstos son de origen vegetal, aunque también se emplean con el propósito de adicionar color algunos jugos o extractos vegetales (extracto de hollejos de uva, extractos verdes de espinaca, ortigas o de alfalfa) (*Henry, 1996*).

Consideraciones legislativas aparte es creciente el interés que en los últimos años ha despertado el desarrollo de nuevos colorantes naturales, corriente que se enmarca dentro de los hábitos de la sociedad actual, ávida por consumir productos naturales de todo tipo. Esta preferencia por los colorantes naturales se asocia a su imagen saludable y de buena calidad frente a los de origen sintético, considerados como indeseables y nocivos.

A pesar de que el interés por los pigmentos naturales viene de siglos, el conocimiento sobre su distribución, disponibilidad y propiedades es bastante limitado. Se estima que un 70 % de las plantas restan por investigar en este campo, y que únicamente se posee un conocimiento exhaustivo del 0.5 % de ellas (*Hendry, 1996; Wissgott y Bortlik, 1996*).

Tabla 1.2. Colorantes alimentarios aprobados por el Real Decreto 2001/1995

Código	Nombre	Tipo
E 100	Curcumina	Colorante amarillo-naranja
E 100 (II)	Cúrcuma	Colorante amarillo-naranja
E 101	Riboflavina	Colorante amarillo, vitamina B2
E 101 (II)	Roboflavina-5'-fosfato	Colorante amarillo, vitamina B2
E 102	Tartracina	Colorante amarillo, azoico
E 104	Amarillo de quinoleína	Colorante amarillo-verdoso, sintético
E 106	Riboflavina-5-fosfato sódico	Colorante amarillo, vitamina B2
E 107	Amarillo 2G	Colorante amarillo, azoico
E 110	Amarillo ocaso FCF	Colorante amarillo, azoico
E 120	Carmín, Cochinilla	Colorante rojo, natural
E 122	Azorrubina	Colorante rojo, azoico
E 123	Amaranto	Colorante rojo, azoico
E 124	Ponceau 4R	Colorante rojo, azoico
E 127	Eritrosina	Colorante rojo, sintético
E 128	Rojo 2G	Colorante rojo, sintético
E 129	Rojo Allura AC	Colorante rojo, azoico
E 131	Azul Patentado V	Colorante azul, sintético
E 132	Indigotina	Colorante azul, sintético
E 133	Azul brillante FCF	Colorante azul, sintético
E 140	Clorofilas	Colorante verde, natural
E 141	Complejos cúpricos de clorofila	Colorante verde, sintético
E 142	Verde S	Colorante verde, sintético
E 150 a-d	Caramelo	Colorante marrón
E 151	Negro brillante BN	Colorante negro, azoico
E 153	Carbón vegetal	Colorante negro, natural
E 154	Marrón FK	Colorante marrón, azoico
E 155	Marrón HT	Colorante marrón, azoico
E 160a	α -, β - y γ - caroteno	Colorante natural amarillo-anaranjado
E 160b	Annatto, Bixina, Norbixina	Colorante amarillo, natural
E 160c	Extracto de pimiento (paprika)	Colorante anaranjado, natural
E 160d	Licopeno	Colorante rojo, natural
E 160e	β -apo-8'-carotenal	Colorante natural amarillo-anaranjado
E 160f	Éster etílico del ác. β -apo-8'-carotenoico	Colorante natural amarillo-anaranjado
E 161a	Flavoxantina	Colorante amarillo, natural
E 161b	Luteína	Colorante amarillo, natural
E 161c	Cryptoxantina	Colorante amarillo, natural
E 161d	Rubixantina	Colorante amarillo, natural
E 161e	Violaxantina	Colorante amarillo, natural
E 161f	Rodoxantina	Colorante amarillo, natural
E 161g	Cantaxantina	Colorante anaranjado, natural
E 161h	Citranaxantina	Colorante amarillo, natural
E 162	Extracto de remolacha	Colorante rojo, natural
E 163	Antocianinas	Colorante rojo-púrpura, natural
E 170	Carbonato cálcico	Colorante blanco
E 171	Dióxido de titanio	Colorante blanco
E 172	Óxidos de hierro	Colorante rojo-marrón, natural
E 173	Aluminio	Metal (colorante)
E 174	Plata	Metal (colorante)
E 175	Oro	Metal (colorante)
E 180	Litol-rubina BK	Colorante rojo, azoico
E 181	Taninos	Colorante blanco-amarillo

1.1.5. Colorantes alimentarios naturales

La creciente preocupación por la seguridad de los alimentos, y la presión de la opinión pública, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir, cuando es tecnológicamente factible, los colorantes sintéticos por otros de origen natural. En general, para la producción industrial, los colorantes sintéticos son más baratos, más estables y poseen mayor poder colorante. Aun así, éstos también pueden presentar algunos problemas en su uso. Por ejemplo, en muchos casos se decoloran por acción del ácido ascórbico, efecto importante en el caso de las bebidas refrescantes, en que esta sustancia se utiliza como antioxidante. Los colorantes sintéticos pueden utilizarse en forma soluble, como sales de sodio y potasio, y a veces amonio, en forma insoluble como sales de calcio o aluminio, o bien adsorbidos sobre hidróxido de aluminio formando lo que se conoce como una laca. La utilización de la forma soluble o insoluble de un colorante dependerá del modo en que se efectúe la dispersión en el alimento.

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes sintéticos. En cualquier caso, la OMS obliga a seguir una investigación toxicológica cuando el colorante es empleado en concentraciones más elevadas de las presentes en el producto natural, o cuando se modifica su estructura durante el proceso de extracción. Por tanto, los colorantes de origen natural han de cumplir también unas exigencias y pautas antes de ser aprobado su uso.

La Tabla 1.3 presenta los colorantes alimentarios naturales aprobados en la actualidad por la UE, agrupados por familias.

Tabla 1.3. Lista de colorantes naturales aprobados por la UE

CÓDIGO	NOMBRE
E 100	Curcumina
E 101	Riboflavina o vitamina B2
E 120	Rojo cochinilla o ácido carmínico
E 140	Clorofilas
E 150	Caramelo
E 153	Carbón vegetal
E 160	Carotenoides
E 161	Xantofilas
E 162	Rojo remolacha o betanina
E 163	Antocianinas

— Curcumina (E 100)

Este colorante se obtiene del rizoma de la cúrcuma o azafrán indio (*Curcuma longa*), un miembro de la familia del jengibre. Es de color amarillo-anaranjado, dependiendo del pH. Es bastante inestable a la luz y sobre todo a las condiciones alcalinas.

Figura 1.19. Cúrcuma y raíces de cúrcuma

La curcumina posee propiedades aromáticas cuando se utiliza la especie completa o la oleoresina. La forma comercial más utilizada es la oleoresina con una pureza del 40-55 % en curcumina, y la curcumina pura al 90-95 %. Es muy consumida en la dieta europea, pero sobre todo en la India y Oriente Medio (Francis, 1996). Debido a este uso tan extendido de la curcumina, han sido numerosos los estudios realizados para valorar su toxicidad y posibles efectos

adversos sobre la salud. De hecho, existe una dosis máxima para la aplicación de este colorante en determinados alimentos, como por ejemplo conservas de pescado (200 mg/kg), conservas vegetales y yogur (100 mg/kg), queso fresco (27 mg/kg). Aunque la toxicidad de la curcumina es muy baja, la dosis diaria admisible para la OMS es, provisionalmente, 0.1 mg/kg para el colorante puro, y 0.3 mg/kg para la oleorresina (Buescher y Yang, 2000). Sin embargo, también se ha demostrado, que bajo un consumo responsable posee efectos beneficiosos para la salud. Diversos experimentos han concluido que la curcumina tiene efectos antioxidantes disminuyendo la hemólisis y la peroxidación de las grasas (Francis, 1996).

Aprovechando la aportación de aroma y color, sus aplicaciones son: mezclas de polvo de curry, escabeches, sopas, adobos, salsas y productos cárnicos. Sin aportación de aroma, su aplicación se reduce a lácteos, margarinas, quesos, mermeladas, helados y bollería.

Figura 1.20. Estructura de la curcumina

— Riboflavina (E 101)

Es un colorante amarillo-anaranjado, que además de como colorante alimentario se emplea para fortificar algunos alimentos debido a su acción vitamínica. Se emplea en alimentos infantiles, cereales de desayuno, salsas, quesos, bebidas de frutas, productos lácteos enriquecidos y suplementos alimenticios ricos en vitaminas (Dufossé, 2006). Es la vitamina B2, también conocida como

lactoflavina, ya que se encuentra en la leche. Se trata de una vitamina hidrosoluble esencial para el aprovechamiento energético de los alimentos, participando en reacciones de fosforilación oxidativa. No actúa como tal vitamina hasta que en el intestino se fosforila y se une a proteínas en un 60 %, formándose

Figura 1.21. Colorante riboflavina

flavina mononucleótido (FMN) y posteriormente flavina adenina dinucleótido (FAD), que participan como coenzimas en las reacciones metabólicas de oxidación-reducción (Massey, 2000).

Industrialmente se obtiene por biosíntesis, mediante fermentación por acción de diversos microorganismos, como *Clostridium acetobutylicum*, *Candida flareri*, *Debaromyces subglobosus*, *Eremothecium ashbyii*, *Ashbya gossypi*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Bacillus subtilis* (Stahmann et al., 2000) Posee un color amarillo-anaranjado. Además de en la leche se encuentra en huevos, espinacas, leguminosas y algunas carnes.

Figura 1.22. Fórmula de la riboflavina

— Rojo Cochinilla (E 120)

El rojo cochinilla es un colorante que se ha venido utilizando desde la antigüedad. Existen referencias que hablan de que sobre el año 5000 a.C. las

mujeres egipcias lo usaban para pintarse los labios. Fue introducido en Europa por Hernán Cortés, descubridor de México (Schul, 2000).

Se extrae del caparazón de las hembras del insecto *Dactylopius coccus*, donde se encuentra en una concentración del 10 % en las partes grasas. Para hacer una aproximación, se necesitan alrededor de 100000 insectos para obtener 1 kg de producto colorante. Su color es rojo o violáceo, dependiendo del pH; a pH básico ofrece tonos rojo-azulados, y a pH ácido predomina la tonalidad roja. Cuando el ácido carmínico se compleja con aluminio, se pueden obtener una amplia gama de tonalidades rojas, desde el “rojo fresa”, al rojo-violáceo del arándano.

Figura 1.23. Cladodios de *Opuntia* con cochinilla y muestra de rojo cochinilla

Este producto colorante aparece en diferentes formas comerciales (lacas, polvos hidrosolubles, disoluciones, etc.). Sus aplicaciones son muy diversas en productos cárnicos, caramelos, chicles, galletas, pastelería, confitería, conservas vegetales, bebidas y productos lácteos. La estructura química del pigmento es la del ácido carmínico, el cual consta de una estructura base de antroquinona unida a una molécula de glucosa. A pesar de ser un colorante natural, en los últimos años su uso se está viendo reducido debido a su procedencia animal y a la aparición de algunos casos de personas alérgicas al carmín (Ferrer *et al.*, 2005). Es un colorante muy empleado por la industria farmacéutica. Su seguridad como colorante alimentario está siendo re-evaluada por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que debe emitir su informe antes de que finalice el año 2015.

Figura 1.24. Fórmula del ácido carmínico

— Clorofilas (E 140)

Las clorofilas son los pigmentos verdes presentes en las plantas fotosintéticas, incluidas algunas algas y bacterias fotosintetizadoras. Se obtiene por extracción con diversos disolventes a partir de plantas como alfalfa, ortigas y otras especies vegetales comestibles. El color verde, en las frutas y hortalizas, se usa como un indicador de su frescura y estado de madurez. En la industria alimentaria, el interés por la clorofila radica no en su uso como aditivo sino como preservador de la que está presente en forma natural en los alimentos de origen vegetal. Tanto la clorofila como la clorofilina utilizadas como colorante alimentario, son sustancias sin límite de ingestión pues se absorben muy poco en el tubo digestivo (*Schwartz y Lorenzo, 1990*).

Las clorofilas naturales son sustancias muy inestables. Les afecta tanto el calor como los ácidos, la luz o el oxígeno y su degradación se asocia, como es lógico, al envejecimiento. Durante los procesos tecnológicos, especialmente durante el escaldado o el enlatado de las verduras, el calentamiento

Figura 1.25. Extracto de clorofila

hace que las clorofilas pierdan el magnesio, transformándose en feofitinas y cambiando su color verde característico por un color pardo oliváceo poco atractivo.

El almacenamiento prolongado provoca su destrucción. Como colorante alimentario se utiliza en conservas vegetales, aceites, gominolas, chicles, helados, bebidas refrescantes, licores, sopas preparadas, pastelería y productos lácteos (queso y yogures) (Wissgott y Bortlik, 1996).

También se pueden encontrar los complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas, que se obtienen por la sustitución del magnesio de la molécula de clorofila por el cobre, lo que le confiere a la molécula un color más brillante y estable. Su uso está permitido en la Unión Europea, pero en Estados Unidos sólo está autorizado como colorante para pastas dentífricas.

En la naturaleza se pueden encontrar varios tipos de clorofila, pero la más ampliamente distribuida en las plantas es la clorofila a.

Figura 1.26. Estructura de la clorofila a

— Caramelo (E 150)

Es un material colorante de composición compleja y químicamente no bien definido. Se obtiene por calentamiento de un azúcar comestible (sacarosa y otros) bien solo, o bien mezclado con determinadas sustancias químicas (Delgado-Vargas

y Paredes-López, 2003). Según las sustancias de que se trate, se distinguen cuatro tipos:

- I. Obtenido calentando el azúcar solo, o bien añadiendo ácido acético, cítrico, fosfórico o sulfúrico, o hidróxido o carbonato sódico o potásico. A este producto se le conoce como caramelo vulgar o caustico.
- II. Obtenido calentando el azúcar con anhídrido sulfuroso o sulfito sódico o potásico.
- III. Obtenido calentando el azúcar con amoníaco o con una de sus sales (sulfato, carbonato o fosfato amónico).
- IV. Obtenido calentando el azúcar con sulfito amónico o con una mezcla de anhídrido sulfuroso y amoníaco.

Figura 1.27. Tonalidades del colorante caramelo

El tipo I es el más utilizado en alimentación, representando más del 90 % del total de todos los añadidos. Los tipo I y II son considerados perfectamente seguros, y la OMS no ha especificado una ingestión diaria máxima admisible. Sin embargo, en el caso de los tipos III y IV la situación es distinta, ya que la presencia de amoníaco en el proceso de elaboración hace que se produzca una sustancia, el 2-acetil-4-(5)-tetrahidroxi-butilimidazol, que puede afectar al sistema inmune. Por esta razón la FAO/OMS establece una ingestión diaria admisible de 200 mg/kg de peso para estos

dos tipos. Dosis de hasta 18 g/día en voluntarios humanos no producen más problemas que un ligero efecto laxante (*Kamuf et al., 2000*).

Da colores marrones y pardos e industrialmente puede presentarse como un líquido o un polvo amorfo oscuro. Tiene aplicaciones muy diversas, ya que es el colorante típico de muchas bebidas de cola y bebidas alcohólicas, como el ron (*Wrolstad y Culver, 2011*). También se utiliza para la fabricación de productos de repostería, elaboración de pan, fabricación de caramelos, cerveza, helados, postres, yogures, sopas preparadas, conservas y diversos productos cárnicos (*Downham y Collins, 2000*).

— Carotenoides (E 160)

Los carotenoides son un extenso grupo de más de 450 pigmentos diferentes, liposolubles, y de colores que van desde el amarillo al rojo. Por ejemplo, la bixina y la norbixina son de color amarillo y se obtienen de una planta llamada Bixa Orellana. El capsanteno es el colorante rojo del pimiento rojo y el pimentón. El licopeno es el colorante rojo del tomate. Los carotenos, sobre todo el β -caroteno, están muy distribuidos entre los vegetales como la zanahoria y también está presente en la mantequilla (*Gordon y Bauerfeind, 1982*).

Alrededor del 10 % de los diferentes carotenoides tienen actividad como vitamina A (por ejemplo el β -caroteno, el β -apo-8-carotenal y el éster etílico del ácido β -apo-8-carotenoico).

Los carotenoides que se emplean en la industria alimentaria como colorantes pueden obtenerse mediante dos vías: bien por extracción directa de los vegetales que los contienen, o bien por síntesis química. Están formados generalmente por ocho unidades de isopreno, es decir, constituyen una estructura de 40 átomos de carbono. Los carotenoides son cada vez más usados en tecnología alimentaria (*Ribeiro et al., 2011*) debido a las presiones ciudadanas contra los colorantes artificiales. Esto es especialmente notable en el caso de las bebidas

refrescantes. También se está extendiendo en otros países la utilización del colorante del pimentón y de la propia especia. Desde hace algunos años se ha planteado la hipótesis de que el β -caroteno, o mejor, los alimentos que lo contienen, pueden tener un efecto protector frente a ciertos tipos de cáncer. Los datos epidemiológicos parecen apoyarla, pero la complejidad del problema hace que aún no se puedan indicar unas conclusiones claras, ni mucho menos recomendar la ingestión de dosis farmacológicas de esta sustancia (Britton, 1996).

Se dividen en dos grandes grupos: los carotenos, de naturaleza estrictamente hidrocarbonada, solubles en éter de petróleo y poco solubles en etanol; y las xantofilas, derivados oxigenados de los carotenos con funciones alcohol, aldehído o ácido, solubles en etanol y en éter de petróleo. Por su insaturación son sensibles al oxígeno, a la luz, a los metales y a las lipoxigenasas.

Como colorantes naturales se encuentran los siguientes:

Figura 1.28. β -caroteno como colorante

- **β -Caroteno (E 160a):** tiene estructura de hidrocarburo, formado por ocho unidades de isopreno. Abunda en productos de origen vegetal y animal y es de color amarillo-anaranjado. Cuando su obtención es natural se extrae de los

vegetales, como zanahoria, o de las algas. Se encuentra en el mercado como líquido o en forma de polvo anaranjado. Se aplica en productos lácteos, margarinas, bebidas, aperitivos, etc.

Figura 1.29. Estructura del β -caroteno

Figura 1.30. Semillas de annato

- **Bixina/Norbixina/Annatto (E 160b):** bixina es un carotenoide ácido, lineal, que se extrae de las semillas de achiote (*Bixa orellana*). Su color va desde el naranja-amarillo claro hasta el naranja-rojo intenso. Por saponificación se elimina el grupo éster metilo y se transforma en norbixina, que es soluble en agua. Ambos se suelen utilizar como

sustitutos del β -caroteno (Bouvier et al., 2003). En América del Sur, el achiote se utiliza como especia para dar sabor y color a las carnes y comidas picantes. Se comercializa como un polvo anaranjado. Es muy utilizado para colorear productos lácteos y cárnicos aprovechando su afinidad a las proteínas. Aprovechando y teniendo en cuenta que el color amarillo que proporcionan tiende a aclararse con la temperatura, se pueden conseguir tonos adecuados al producto. La ingestión máxima admisible es de 0.065 mg/kg, ya que se han descrito algunos casos raros de alergia.

Figura 1.31. Estructura de la bixina

- **Extracto de pimiento (E 160c):** colorante natural aislado del pimiento rojo (*Capsicum annuum*). Contiene principalmente capsorubeno y capsanteno. Se encuentra en el mercado en forma de polvo o como una oleorresina concentrada de color rojo intenso. La aplicación más importante está en la fabricación de embutidos, pero su uso se puede extender hasta el coloreado de bebidas, sopas en polvo, aperitivos y salsas. También tiene acción saborizante. No tiene límite de ingesta diaria.

- **Licopeno (E 160d):** Es el pigmento mayoritario responsable del color rojo de los tomates, donde se encuentra en una concentración de aproximadamente 0.02 g/kg. También, aunque en menor cantidad, está presente en otros frutos como sandía, papaya y pomelo rosa. Aparte de acción colorante también se ha

comprobado que posee efectos antioxidante y fotoprotector. El licopeno también ayuda a mantener bajos los niveles de colesterol de baja densidad (LDL) reduciendo con ello el riesgo de arteriosclerosis (Clinton, 1998). Como colorante se comercializa en forma de polvo. Sus aplicaciones son en salsas, sopas y aperitivos. Debido a sus múltiples efectos beneficiosos para la salud también se comercializa en forma de píldoras.

Figura 1.33. Estructura del licopeno

— Xantófilas (E 161)

Se pueden encontrar tanto en el reino animal como en el vegetal.

E 161a Flavoxantina (hojas verdes).

E 161b Luteína (yema de huevo y vegetales).

E 161c β -Criptoxantina (tomate, naranja).

E 161d Rubixantina (flores).

E 161e Violaxantina (violetas).

E 161f Rodoxantina (tejo).

E 161g Cantaxantina (crustáceos).

El origen para su aplicación como colorantes alimentarios puede ser por extracción directa de una especie vegetal o por síntesis química como es el caso de la cantaxantina. En cuanto al color abarca la gama de amarillo a rojo.

A pesar de ser derivados de los carotenoides, no tienen ninguna actividad provitamina A, a excepción de la β -criptoxantina.

Figura 1.34. Estructura de la luteína (superior) y de la β -criptoxantina (inferior)

En el mercado se pueden encontrar en forma oleosa, emulsionada o como polvo hidrodispersable (Wrolstad y Culver, 2011). Se aplican en la fabricación de helados, margarinas, mayonesas y otras salsas, confitería y bebidas refrescantes.

También se emplean como aditivo colorante en el alimento suministrado a peces de piscifactoría de musculatura rosada (trucha asalmonada, salmón) y en el pienso que alimenta a las gallinas para lograr coloración más intensa en la yema de huevo (Britton, 1996). El tipo de xantofila utilizada en cada caso concreto depende

de la especie animal que se trate, y suele aportarse en forma de levaduras o algas que presenten estos pigmentos más que como sustancia química aislada.

— Rojo remolacha o betanina (E 162)

Bajo esta denominación se comercializa el extracto acuoso de la raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris*). Se obtiene tras la extracción y pasteurización del zumo de remolacha.

Figura 1.35. Colorante comercial rojo remolacha

El uso de betanina está autorizado por la Comisión del *Codex Alimentarius* (2004) y se permite su empleo tanto en EEUU como en la Unión Europea. Se consigue como concentrado (producido por evaporación a alto vacío de jugo de remolacha hasta concentración con el 60-65 % de sólidos totales) o como polvo producido por liofilización o atomización con un 0.3 a 1 % de pigmento (Castellar *et al.*, 2003). Es un colorante relativamente potente, alcanzándose el color deseado con dosis que no exceden los 50 mg de betanina por kg de producto. Muestra un típico color rojo-violáceo que se degrada con facilidad por acción de la temperatura. Se emplea como colorante de postres, gelatinas o yogur, y también se usa en helados y gominolas (Sobkowska *et al.*, 1991).

Figura 1.36. Estructura de la betanina

— Antocianinas (E 163)

Las antocianinas son uno de los más extendidos e importantes grupos de pigmentos hidrosolubles en el reino vegetal. Se acumulan en las vacuolas de las células y son responsables de colores desde el rojo hasta el azul y violeta en hojas, tallos, flores y frutos como moras, frambuesas, arándanos, uvas, cerezas, ciruelas, bayas de saúco, cebolla, rábano, col lombarda, lechuga roja y berenjena (*Castañeda-Ovando et al., 2009*). Las más comunes son cianidina, malvidina, pelargonidina, delphinidina y petunidina. El interés por estos pigmentos se ha incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que los contienen, sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejora de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son sustancias bioactivas con valor añadido para el consumo humano (*Garzón, 2008*).

A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su limitada estabilidad frente al pH y la temperatura hace que su empleo sólo sea posible en determinados alimentos (Wrolstad, 2004).

Figura 1.37. Frutos coloreados por antocianinas

Químicamente, las antocianinas son flavonoides, que derivan del catión flavilio (Fig. 1.38) y su color se ve influenciado tanto por los sustituyentes presentes (grupos hidroxilo y metoxilo), como por el pH de la disolución.

Figura 1.38. Catión flavilio

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules, mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes

se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: *p*-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o *p*-hidroxibenzóico. Está comprobado que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5, al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento del color hacia tonalidades púrpura (Stintzing et al., 2002).

Figura 1.39. Transformaciones moleculares de la cianidina en función del pH

Estos pigmentos tienen su principal aplicación en alimentos ácidos como mermeladas, bebidas refrescantes, zumos de frutas, yogures, batidos y confitería (Cubero et al., 2002), y en la actualidad están muy demandados sus extractos dadas las propiedades bioactivas de los mismos.

1.1.6. Estabilidad del color en los alimentos

Los colorantes alimentarios deben cumplir una serie de requisitos básicos con el fin de prevenir riesgos para la salud de los consumidores. En esencia, deben ser inocuos; tener gran poder colorante con objeto de ser utilizados dosis mínimas; ser fácilmente incorporables al producto; no poseer aroma ni sabor desagradables, con el fin de no variar las características del alimento al que se incorporan; ser económicos, y ser lo más estable posible frente a factores externos como la luz, calor y cambios de pH.

Tabla 1.4. Propiedades a exigir a los colorantes de alimentos

CARACTERÍSTICAS DE UN COLORANTE ALIMENTARIO
Inocuidad
Gran poder colorante
Facilidad de incorporación
Sin aroma ni sabor desagradable
Estabilidad oxidativa
Termoestabilidad
Fotoestabilidad
Color independiente del pH

Los pigmentos son estables en su ambiente natural, pero al ser extraídos e incorporados a los alimentos se vuelven mucho más lábiles. Los procesos degradativos son más acusados cuando se rompe la integridad celular, debido a la pérdida de compartimentación entran en contacto sustancias que pueden modificar los pigmentos estructuralmente, e incluso llegar a destruirlos. La degradación de los pigmentos reduce el valor nutritivo de los alimentos e induce una decoloración y una pérdida de sus características organolépticas. El grado de decoloración va a

depender fundamentalmente de la presencia de agentes oxidantes en el medio (sobre todo oxígeno molecular) y de que se comunique energía suficiente para que la reacción de degradación tenga lugar. La energía se aporta en forma de luz o calor. La reacción de decoloración supone la pérdida de conjugación de la molécula por lo que cualquier factor capaz de interrumpir la deslocalización electrónica existente provocará la pérdida de color. Si las condiciones oxidantes son débiles y la energía suministrada no es suficiente la degradación puede ser reversible, si las condiciones son muy severas el proceso será irreversible y la pérdida de color definitiva (*Chen et al., 2010*).

1.1.6.1. Estabilidad oxidativa

Está demostrado que la exposición de los colorantes a ambientes aerobios provoca el rápido deterioro de los mismos. Los carotenoides pueden experimentar reacciones de oxidación vía radicales libres, lo que explica que puedan actuar como antioxidantes en los alimentos. Esta capacidad antioxidante se debe a la resonancia generada a través del radical libre. En ciertas condiciones controladas, la oxidación de los carotenoides puede inducir la formación de epóxidos e isomerizaciones, lo que conlleva una considerable pérdida de color (*Rao y Rao, 2007*). Por el contrario, los derivados benzopiranos no son oxidados tan fácilmente como los carotenoides.

Los pigmentos de naturaleza polifenólica (antocianos y betalainas) ven alterada su estructura en presencia de oxígeno, generando bases quinoidales con la consiguiente pérdida de color. Esta oxidación de las betalainas puede ser evitada en presencia de ácido ascórbico (*Delgado-Vargas et al., 2000*). En contraposición, frente a las antocianinas está descrito que el ácido ascórbico ejerce una acción sinérgica pro-oxidante, acelerando su degradación (*Worlsted, 2000; Garzón, 2008*). En los derivados tetrapirrolícos como la clorofila, la exposición a ambientes oxidantes conlleva la modificación del anillo porfirínico, bajo condiciones de oxidación media (por ejemplo en presencia de KMnO_4 y acetona), el grupo vinilo de

la clorofila *a* y *b* es oxidado hasta el anión carboxilato (Wong, 1989), con la correspondiente degradación del color original.

1.1.6.2. Efecto del pH

El efecto del pH sobre los colorantes alimentarios es especialmente notable en aquellos que contienen grupos ionizables, donde influye sobre los posibles equilibrios químicos que puedan establecerse entre las diferentes formas posibles de los mismos. Así, el pH va a determinar estructura y estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre estas moléculas. En disoluciones acuosas a valores de pH inferiores a 2, básicamente el 100 % del pigmento se encuentra en su forma más estable o de catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. A valores de pH más altos se produce una pérdida de un protón y adición de agua, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol y la forma chalcona de cadena abierta, ambas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A , A^-) de color púrpura, que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999). Como resultado, se concluye que la acidez tiene un efecto protector sobre las moléculas de antocianinas, lo que va a determinar los alimentos en los que estos pigmentos pueden ser incorporados.

Las betalaínas también ven influenciada su estabilidad por acción del pH. Presentan su máxima estabilidad a pH entre 5 y 6. A pH inferior a 3.5 se hidrolizan, experimentando modificaciones en su color característico. Por encima de pH 7 también se altera su estructura apareciendo tonalidades pardas (Cai *et al.*, 1998; Castellar *et al.*, 2003).

La clorofila también ve afectada su estructura y color por acción del pH. A pH ácido los protones pueden reemplazar el átomo central de Mg (II) en la estructura porfirínica, rindiendo la correspondiente feofitina, de coloración más parduzca. A pH ligeramente alcalino (presencia de bicarbonato) se evita la degradación y el color

verde típico se mantiene. Estos efectos del pH se pueden ver magnificados cuando al mismo tiempo se ven sometidas a la acción de altas temperaturas (Hendry, 1996).

Figura 1.40. Degradación de clorofila a pH ácido

En aquellos colorantes que no son solubles en agua, como es el caso de los carotenoides, las variaciones de pH no influyen su estabilidad, ni tampoco alteran su color.

1.1.6.3. Estabilidad térmica

En relación a la estabilidad térmica de los alimentos, se pueden considerar tres rangos: alimentos que se almacenan bajo refrigeración o a temperatura ambiente; alimentos que se procesan de 60 °C a 120 °C porque deben ser cocidos, pasteurizados o esterilizados; y alimentos que se procesan de 180 °C a 220 °C, por ser horneados, gratinados o fritos.

Una de las principales leyes de la cinética química es que el incremento de la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones químicas, incluidas las de degradación, de acuerdo a la ecuación de Arrhenius.

$$k = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

En la que k representa la constante de velocidad, A el factor de frecuencia, E_a la energía de activación de la reacción, T la temperatura absoluta y R la constante universal de los gases.

Todos los colorantes se degradan con la temperatura, pero unos van a ser más termolábiles que otros. La termorresistencia es una característica fundamental a la hora de seleccionar las aplicaciones tecnológicas de un determinado colorante y conocer en qué alimentos está aconsejado su empleo. Son numerosos los estudios de estabilidad de los diversos colorantes naturales frente a la temperatura (Gradinaru et al., 2003; Anese et al., 1999; Herbach et al., 2006).

Entre los colorantes naturales rojos, el más resistente, con gran diferencia, a las altas temperaturas es el rojo cochinilla, seguido de carotenoides y antocianos. Las betacianinas son, por el contrario, las que se degradan con mayor facilidad (Fernández-López et al., 2013).

En las antocianinas el incremento de la temperatura provoca la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y la ruptura del anillo con la consecuente generación de chalconas incoloras (Timberlake, 1980).

El calentamiento de la betanina provoca su isomerización a isobetanina. Durante el procesado térmico de la remolacha hay una pérdida de color importante, seguido de una parcial regeneración. La pérdida de color se explica por la pérdida de la estructura de resonancia del catión conjugado, mientras que la regeneración parcial del color se explica por la condensación de los productos de hidrólisis. Estas reacciones de condensación son similares a las reacciones de pardeamiento de Maillard, que incluyen reacciones de condensación de polifenoles mediante reacciones no enzimáticas (Schwartz y von Elbe, 1983).

Figura 1.41. Degradación de betanina por acción de la temperatura

Otro grupo de colorantes que también se ven afectados por la acción de la temperatura son las clorofilas. En este caso un aumento de la temperatura provoca la retirada del Mg (II) de la posición central de la molécula, formando la correspondiente feofitina. Esta retirada del átomo central provoca que el máximo de absorción a 428 nm se retraiga hasta los 408 nm con un ligero aumento en el coeficiente de extinción, y que el máximo a 661 nm se desplace a los 667 nm con un marcado descenso del coeficiente de extinción (*Schoefs, 2002*).

1.1.6.4. Fotoestabilidad

En los tejidos vegetales los pigmentos actúan como fotoprotectores, absorbiendo la radiación visible y haciendo de pantalla frente a la radiación UV. Esta acción da como resultado que todos los pigmentos se degraden cuando están expuestos a radiación luminosa, especialmente si es en presencia de oxígeno y a valores de pH distintos al de su estabilidad máxima (*Stintzing y Carle, 2008*).

En todos los casos se recomienda que el procesado y almacenado de alimentos con colorantes naturales se realice protegiéndose de la exposición a la radiación lumínica. Todos los productos que se comercialicen en envoltorios transparentes deben haber sido sometidos a un testado previo bajo condiciones reales de exposición a la luz para certificar su estabilidad durante el periodo de vida útil del alimento. También debe considerarse que la exposición a la luz va a suponer un calentamiento implícito del producto, lo que va a conllevar un agravamiento de la pérdida de color. Se estima que el efecto que ejerce la luz sobre la estabilidad de

los colorantes sólo se puede cuantificar a temperaturas inferiores a 25 °C, por encima de este valor se produce una sinergia con la acción del calor que enmascara el exclusivo efecto fotodegradativo (Stewart, 2001).

1.1.6.5. Efecto de la alta presión

El principal efecto que causa la alta presión en el procesado de alimentos es la destrucción de microorganismos, desnaturalización de proteínas y alteración de las reacciones enzimáticas (Johnston, 1992). Desde el punto de vista químico, el aumento de la presión provocará que se favorezcan aquellas reacciones cuya cinética aumenta al disminuir el volumen (Hoover *et al.*, 1989). Desde la perspectiva de la estructura química de los colorantes alimentarios, el aumento de la presión provocará la ruptura de enlaces y la desestabilización de las moléculas, con un consiguiente cambio de color.

Los tratamientos a alta presión (de 50 a 400 MPa) en el procesado del puré de caqui, el cual presenta un alto contenido en β -caroteno y β -criptoxantina, fue estudiado por De Ancos *et al.* (2000). El resultado fue que la pérdida de color fue muy baja, lo que sugiere que la estructura molecular de estos colorantes es muy resistente a las fuerzas de compresión. Zabetakis *et al.* (2000) presurizaron fresas desde 200 a 800 MPa a una temperatura de 18 a 22 °C. El análisis realizado al extracto obtenido demostró que las antocianinas presentes apenas se habían alterado.

El efecto del aumento de la presión es diferente en otro tipo de pigmentos. Esta desnaturalización de las moléculas tiene un efecto en el color similar al que se produce durante el proceso de pasteurización, provocando cambios en las coordenadas L^* , a^* y b^* , principalmente en la coordenada L^* que indica la luminosidad.

1.2. LOS FRUTOS DE *OPUNTIA* COMO FUENTE DE PIGMENTOS

El género *Opuntia* comprende más de 300 especies todas originarias de la América tropical, más concretamente de México (*Scheinvar, 1995*). La taxonomía de este género es sumamente compleja debido a múltiples razones, entre otras porque sus fenotipos presentan gran variabilidad según las condiciones ambientales, se encuentran con frecuencia casos de poliploidía, se reproducen en forma sexual o asexual y existen numerosos híbridos interespecíficos. Su clasificación taxonómica más aceptada es la siguiente:

Tabla 1.5. Clasificación taxonómica del género *Opuntia*

TAXONOMÍA	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Opuntioideae
Género	<i>Opuntia</i>

Esta planta llegó a Europa gracias a los conquistadores (*Barbera, 1999*) y desde España se distribuyó por toda la cuenca mediterránea (Francia, Grecia, Italia y Turquía), llegando hasta Israel. Los árabes la llevaron desde España a África, difundiéndose en Argelia, Egipto, Etiopía, Libia, Marruecos y Túnez. Hoy en día ya está diseminada por los cinco continentes (Fig. 1.42).

Figura 1.43. Plantas y frutos de *Opuntia*

La fructificación se produce en cladodios de uno o dos años y raramente en los de tres. El tamaño de los frutos maduros puede variar de unas especies a otras, oscilando entre los 30 y los 100 gramos. La relación en peso semilla/pulpa es inversamente proporcional a la duración del periodo cálido, es decir, cuanto más largo y más intenso ha sido el verano, menor es la proporción de semillas. El color de los frutos depende de la especie y de la variedad, existiendo en el rango de colores que va del amarillo pálido hasta el morado, pasando por una amplia gama de naranjas y rojos (*Fernández-Rubio y Martínez, 1983*).

Figura 1.44. Frutos de *Opuntia*

Las plantas de *Opuntia* aunque crecen asilvestradas, también se cultivan desde años en el área mediterránea. Su adaptación a zonas marginales de escaso rendimiento agrícola y las múltiples funciones agronómicas y productivas que pueden llegar a desempeñar, las han convertido en muy interesantes para su cultivo (Flores-Hernández et al., 2004).

Son múltiples los usos potenciales que pueden tener las plantas de este género, tanto alimentarios como no alimentarios (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Usos potenciales de plantas del género *Opuntia*

USOS DE <i>OPUNTIA</i>	
Alimentario	Fruto, zumo, mermelada, repostería, bebidas alcohólicas, vinagre, miel, nopalitos
Medicinal	Diurético (flor), descongestionante, antidiabético (cladodios), cosmético (mucílago)
Colorante	Betalainas, Ácido carmínico
Agronómico	Fijación de suelos, cortavientos
Forrajero	Cladodios, pericarpio del fruto
Ornamental	Cercados y macetas
Energético	Bioalcohol
Fertilizante	Fertilizante verde, Biomasa para lombricultura

Uno de sus mayores atractivos es su anatomía y morfología adaptada a condiciones de fuerte estrés ambiental, por lo que son una alternativa de cultivo para zonas marginales, donde difícilmente crecen otras especies. Las características de las plantas que las hacen adaptables al medio árido tienen relación con la conformación de varios de sus órganos. Según *Nobel (1999)* sus raíces superficiales y extendidas captan el agua de las escasas lluvias que caen en esos ambientes. Las lluvias aisladas, por otra parte, inducen la formación de raíces secundarias que aumentan la superficie de contacto con el suelo, lo cual facilita la absorción de agua y nutrientes. Cuando se inicia la sequía, las raíces comienzan a contraerse de manera radial contribuyendo a disminuir la pérdida de agua.

Los tallos son suculentos y articulados, botánicamente llamados cladodios y vulgarmente pencas. En ellos se realiza la fotosíntesis, ya que los tallos modificados reemplazan a las hojas en esta función; se encuentran protegidos por una cutícula gruesa, que en ocasiones está cubierta de cera o pelos que disminuyen la pérdida de agua. Además estos tallos presentan gran capacidad de almacenamiento hídrico, ya que poseen abundante parénquima; en este tejido se almacenan considerables cantidades de agua lo que permite a las plantas soportar largos periodos de sequía. Cabe destacar el papel de los mucílagos (hidrocoloides presentes en este tejido) que tienen gran capacidad de retención hídrica (*Nobel et al., 1992*). Los cladodios, en la mayoría de especies cubiertos de espinas, presentan escasos estomas por unidad de superficie, con la particularidad de permanecer cerrados durante el día y abiertos en la noche; esto evita la pérdida de agua por transpiración durante el día y permite durante las horas nocturnas la entrada de anhídrido carbónico (CO_2), materia prima indispensable para la fotosíntesis.

El tipo particular de fotosíntesis que presentan las plantas de *Opuntia* corresponde al metabolismo del ácido crasuláceo (plantas CAM). La apertura nocturna de los estomas permite la toma de CO_2 , lo que conduce a una acidificación gradual del tallo. Los estomas, en condiciones de déficit hídrico extremo, permanecen cerrados durante el día y la noche, evitando la transpiración

y la entrada del CO₂. En este caso, el agua y el CO₂, producidos por la respiración son utilizados para la fotosíntesis, situación que explica la lenta deshidratación y degradación que sufren los cladodios durante un periodo prolongado de sequía extrema. La interrelación entre la anatomía y la fisiología para la conservación del agua de las plantas CAM es crucial para su éxito ecológico e incrementa su potencial agrícola en terrenos áridos y semiáridos. Estas plantas poseen también gran resistencia, sobre todo, a altas temperaturas, aunque algunas especies también soportan hasta -40 °C (Nobel, 1999).

Estas Cactáceas han jugado un papel ecológico decisivo al frenar la degradación de suelos deforestados. Otro de los cambios ambientales que afectan al planeta es el incremento global del CO₂, originado, entre otras cosas, por la creciente deforestación, lo que incide en los principales ecosistemas del mundo. Ante el alto grado de perturbación ambiental, las plantas del género *Opuntia* pueden ser una alternativa potencial para captar parte del incremento de CO₂ ya que es una de las pocas especies que pueden establecerse con éxito en superficies deterioradas (Pimienta, 1997; Nobel y Bobich, 2002).

Las flores de estas especies aparecen en las areolas, en los bordes de los cladodios, e incluso algunas veces en las areolas de los frutos. Son de gran tamaño, de aspecto satinado, bastante abiertas y de diferentes colores, variando entre amarillo, naranja, rojo y púrpura.

Figura 1.45. Flores de *Opuntia*

Los frutos de *Opuntia* se caracterizan por su importancia funcional y nutricional. Son frutos no climatéricos (no maduran una vez cosechados), por lo que es importante consumirlos en su punto óptimo de maduración. Durante el proceso de maduración aumenta considerablemente el contenido en azúcares y vitamina C, mientras que la firmeza y la acidez se reducen. Se han estudiado sus efectos como antiinflamatorio, inhibidor de úlceras estomacales, y neuroprotectores debido a su elevada actividad antioxidante. De hecho, en la actualidad existen empresas de cosméticos, productos dietéticos y nutricionales que comercializan preparados de especies de *Opuntia* para una gran variedad de usos (Castellar et al., 2008).

Figura 1.46. Preparados comerciales de *Opuntia* con efectos farmacológicos

Las características con que la naturaleza ha dotado a estas plantas y la variedad de tecnologías disponibles, tienen como resultado que de ellas se puedan obtener una amplia gama de productos: frutos frescos, zumos, concentrados, bebidas fermentadas, productos deshidratados, confituras, mermeladas, geles, cladodios, harinas, etc. Estas amplias posibilidades, junto con el interés de los organismos internacionales (FAO) por la transferencia de tecnología hacia países menos desarrollados de África y América Latina, ha hecho que en los últimos años se haya desarrollado una Red Internacional de Cooperación Técnica en Cactus (CACTUSNET), constituida en 1994 en Palermo (Italia), dedicada a promover la unión de esfuerzos para incrementar la cooperación entre científicos, técnicos y

productores y para facilitar el intercambio de información y conocimientos sobre esta planta (Sáenz, 2006).

1.2.2. Principales especies de *Opuntia*

Entre las múltiples especies del género *Opuntia*, las de mayor interés tecnológico son las que pasamos a describir a continuación.

1.2.2.1. *Opuntia ficus-indica*

Es la especie más estudiada y más cultivada del género *Opuntia*, especialmente por tener los frutos más apetecibles desde el punto organoléptico (Stintzing et al., 2001). Así, son múltiples los trabajos publicados sobre las posibilidades agronómico-tecnológicas de sus frutos (Fernández-Rubio y Martínez, 1983; Sawaya et al., 1983; Sepúlveda y Sáenz, 1990).

Es una planta rústica y espinosa. Se da en parajes áridos y secos, con abundante insolación, aunque también la podemos encontrar en climas más templados. Crece con rapidez hasta una altura de entre 4 y 5 metros. Carece de hojas monofilas, los segmentos en que se divide son tallos capaces de ramificarse, emitiendo flores y frutos. Estos tallos son planos, ovales y de color verde. Poseen dos clases de espinas, reunidas en los gloquidios de las areolas (largas y duras), y otras cortas y finas de aspecto veloso.

Las flores, en forma de corona, nacen de las areolas en los bordes de los segmentos. Florece una vez al año, y tanto el fruto como la flor pueden ser de diversos colores, desde el amarillo al rojo. El fruto posee una cáscara gruesa, espinosa, y con una pulpa con abundantes semillas (Anderson, 2001).

Figura 1.47. Planta y frutos de *Opuntia ficus-indica*

Actualmente existen múltiples estudios centrados en el empleo de su fruto como fuente de pigmentos de origen natural (Fernández-López, 2002a). En este sentido, ofrece varias posibilidades para la obtención de colorantes, debido a que los pétalos de las flores y los frutos presentan pigmentos de color amarillo y rojo, que son solubles en agua y que podrían utilizarse para colorear alimentos (Castellar et al., 2003).

1.2.2.2. *Opuntia engelmannii*

Esta especie es originaria de Norteamérica, y se puede encontrar en México, Arizona, California y Texas.

Las dimensiones del fruto son de 3x5 cm aproximadamente, y es periforme. Tiene un color púrpura muy intenso y de sabor es poco dulce. Tiene areolas poco distribuidas en torno a la corola, la cual no está hundida, y sus gloquidios son marrones, de 2 a 4 mm, y en algunos casos tienen espinas (Anderson, 2001).

Figura 1.48. Planta y frutos de *Opuntia engelmannii*

1.2.2.3. *Opuntia inermis*

Se trata de una planta rastrera, frondosa y prolífica en frutos. Puede alcanzar una altura de 1 metro, y sus palas son simétricas y de unas dimensiones aproximadas de 15x7 cm. Su principal característica es la ausencia de espinas en los cladodios, que la hace muy interesante para su empleo ornamental (Anderson, 2001).

Figura 1.49. Planta y flores de *Opuntia inermis*

1.2.2.4. *Opuntia dillenii*

Es nativa de Centroamérica, y está presente en Cuba, México, USA, Bahamas, Jamaica, Puerto Rico, Haití y República Dominicana.

Conocida como “tunera salvaje”, es una planta arbustiva que puede llegar hasta una altura de 1 metro. La pala es de color verde oscuro, asimétrica y con unas dimensiones de 13x24 cm. Sus areolas son de 5-10 mm de diámetro, con una distribución regular muy distante de 4 a 6 cm. Sus espinas son muy duras, blanco amarillentas y de hasta 3 cm de largo. También emergen de las areolas gloquidios muy finos, con una longitud de hasta 10-15 mm. Sus flores son de color naranja, rojo y amarillo, y sus frutos de color púrpura (Anderson, 2001).

Figura 1.50. Planta y frutos de *Opuntia dillenii*

1.2.2.5. *Opuntia linguiformis*

El hábitat de esta especie se localiza en San Antonio (Texas). Se trata de una planta con apariencia de matorral, con cladodios alargados muy típicos y diferenciadores. Presenta areolas distribuidas por todo el fruto, pero más abundantes hacia la corona. Los gloquidios son marrones y la piel del fruto tiene un espesor de unos 5 mm. El fruto es redondeado, con unas dimensiones de 4x5.5 cm, y con una pulpa de color púrpura muy oscura y con una gran cantidad de semillas (*Anderson, 2001*).

Figura 1.51. Planta y frutos de *Opuntia linguiformis*

1.2.2.6. *Opuntia stricta*

Especie característica del norte de África, Australia y sureste y nordeste de España. Sus plantas alcanzan los 2 metros de altura, con flores muy vistosas, de color amarillo, y con un tamaño aproximado de 7 cm. Empiezan su crecimiento en primavera y finalizan su floración a principios de verano.

Sus frutos son de pequeño tamaño, muy abundantes, carnosos, de color púrpura intenso, piriformes, ácidos y con bajo contenido en azúcares (*Anderson, 2001*).

Los frutos de *Opuntia stricta* contienen importantes concentraciones de betacianinas, lo que convierte a esta especie en una posible alternativa frente a la remolacha roja para la producción de betanina, incluso con mejores propiedades nutricionales y organolépticas.

Figura 1.51. Planta y frutos de *Opuntia stricta*

1.3. BETALAÍNAS

Las tonalidades amarillentas, anaranjadas, rojizas y violáceas que exhiben ciertas plantas se deben a la presencia de betalaínas, un grupo diferenciado de pigmentos vegetales que contienen nitrógeno y son solubles en agua. Se acumulan en flores, frutas y, de forma ocasional, en el tejido vegetativo de plantas de la mayoría de las familias del orden de las Cariofilales. También se hallan presentes en hongos como *Amanita* e *Hygrocybe*. Hasta el momento se han identificado en la naturaleza más de 70 betalaínas, cifra que va en aumento año tras año.

Figura 1.52. Betalaínas en la naturaleza

Se clasifican en dos grupos: las betacianinas, de color rojo-violeta, y las betaxantinas, de color amarillo-naranja. El ácido betalámico, la unidad estructural básica de estos pigmentos, se encuentra condensado con un aminoácido o amina,

en las betaxantinas, y conjugado con *ciclo*-dihidroxifenilalanina (*ciclo*-DOPA) en las betacianinas. Esta molécula puede incorporar azúcares y ácidos a través de uno de los dos grupos hidroxilo presentes en el anillo aromático, con lo que origina dos familias de compuestos: los derivados de la betanina (betanidina-5-*O*- β -glucósido) o de la gomfrenina I (betanidina-6-*O*- β -glucósido) (Francis y Lauro, 2000).

Figura 1.53. Estructura del ácido betalámico y de las betalaínas

1.3.1. Distribución

En el reino vegetal estos pigmentos son exclusivos del orden Cariofilales, siendo las familias Chenopodiaceae, Nyctaginaceae, Amaranthaceae y Cactaceae las que presentan las especies más conocidas (Tabla 1.7).

Es de resaltar que la presencia de betalaínas es excluyente con la de antocianinas, y no se conoce ninguna especie vegetal donde ambas familias de pigmentos coexistan. Esto demuestra una divergencia a nivel bioquímico que no se comprende todavía, pero de gran valor taxonómico. La mayoría de las betalaínas naturales deben su nombre a la planta en donde se han descrito, al cual se ha añadido el sufijo «-cianina» (de *kyanos*, «azul» en griego) para las betacianinas, o «-xantina» (de *xanthos*, «amarillo» en griego) para las betaxantinas.

Tabla 1.7. Principales familias botánicas del orden Cariofilales

FAMILIA	GÉNERO
Phytolaccaceae	
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i>
Aizoaceae	
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i>
Chenopodiaceae	<i>Beta</i>
Cactaceae	<i>Opuntia</i> <i>Hylocereus</i>
Portulacaceae	<i>Portulaca</i>

La presencia de betalaínas en flores (*Bougainvillea*, *Celosia*, *Gomphrena*, *Mirabilis*, *Portulaca*...) reviste interés sobre todo por la importancia del color en esas estructuras. Se han propuesto una gran variedad de funciones para las mismas, incluida la atracción de insectos y aves que actuarían a modo de polinizadores y dispersadores de semillas. El ejemplo más conocido de planta superior con estos pigmentos corresponde a la raíz de la remolacha roja (*Beta vulgaris*); sin embargo, en esta planta las betalaínas no desempeñan ninguna función visual, sino de regulación osmótica y de almacenaje de compuestos nitrogenados. El descubrimiento de esta actividad biológica arroja luz sobre posibles funciones no relacionadas con la coloración.

Las betalaínas se sintetizan en el citoplasma y se acumulan en las vacuolas de las células que las sintetizan, sobre todo en los tejidos epidérmico y subepidérmico. En plantas, otros pigmentos solubles en agua (flavonoides y antocianinas) también se pueden acumular en la vacuola central, que ocupa más del 90 % del total del volumen de la célula. En algunos casos, las antocianinas también se han encontrado en el citoplasma.

Son escasas las fuentes comestibles de betalaínas en la naturaleza. Entre ellas están la remolachas roja y amarilla (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), también la

acelga suiza (*Beta vulgaris* L. ssp. cicla), el amaranto (*Amaranthus* spp.) y los frutos de cactus (*Opuntia* spp. e *Hylocereus* spp.)

Del género *Amaranthus* hay especies que se usan para alimentación y otras con carácter ornamental. Los pigmentos se presentan en hojas, inflorescencias, tallos y semillas (Fig. 1.53). Se emplean como colorante alimentario en China, Japón y Corea (Cai et al., 2005).

En la familia Chenopodiaceae, la remolacha roja (*Beta vulgaris*) es la especie más característica. Acumula betaláinas en tallos y raíces (Fig. 1.54). Se emplea como fuente industrial de pigmentos, comercializándose con fines alimentarios y farmacológicos el colorante rojo remolacha (E-162), cuyo componente mayoritario es la betanina.

Figura 1.54. Betaláinas en *Amaranthus* spp.

El empleo de extracto colorante obtenido de remolacha presenta algunas desventajas debido a la posible presencia de geosmina y pirazinas, compuestos

químicos que pueden aportar aromas terrosos, particularmente cuando el colorante se agrega a alimentos lácteos (Stintzing et al., 2001).

Figura 1.55. Betalaínas en *Beta vulgaris*

En la familia Cactaceae el género *Opuntia* es el más extendido. Algunas especies de este género se cultivan con fines alimenticios y ornamentales, siendo *Opuntia ficus-indica* la más extendida. Las betalaínas son los pigmentos responsables del color de flores y frutos. En los últimos años se viene investigando sobre el empleo de frutos de *Opuntia* como fuente de betalaínas ya que desde el punto de vista organoléptico no presentan los inconvenientes de la remolacha, además de ser más variada la gama de colores que aportan, desde el amarillo hasta el rojo-púrpura. También el rendimiento en producción de pigmentos puede en algunos casos superar al de la remolacha (Castellar et al., 2006; Fernández-López et al., 2002). Resulta de especial interés el colorante amarillo (betaxantinas) que se obtiene de estos frutos, porque los colorantes amarillos naturales disponibles en el mercado son todos de carácter lipofílico, y por tanto difíciles de dispersar en matrices hidrófilas, característica que si es propia de las betaxantinas, lo que va a permitir una mejor distribución en el alimento y una coloración más uniforme del mismo.

Figura 1.56. Betalaínas en frutos de *Opuntia*

Existen también diversos estudios sobre el empleo de frutos (pitayas) de los géneros *Cereus*, *Hylocereus* y *Selenicereus*, como fuente de betalaínas (Vaillant et al., 2005).

Figura 1.57. Betalaínas en frutos de *Hylocereus*

1.3.2. Estructura y color

Químicamente, las betalaínas son alcaloides derivados del aminoácido tirosina, cuyo núcleo fundamental es el ácido betalámico, que hace de cromóforo tanto en las betaxantinas como en las betacianinas (Strack *et al.*, 2003).

Figura 1.58. Estructura de la tirosina

Las betacianinas, de color rojo-violáceo, se forman por condensación del ácido betalámico con derivados del *ciclo*-DOPA (*ciclo*-dihidroxifenilalanina). Pueden estar modificadas por la adición a alguno de los grupos hidroxilo del anillo bencénico de radicales glicosilo que a su vez puedan estar acilados. De hecho, la estabilidad de betacianinas glicosiladas es mayor que las que no presentan radicales glicosilo, debido a su mayor potencial de oxidación-reducción (Attoe y Von Elbe, 1985). Otros estudios indican también un aumento de la estabilidad de las betacianinas mediante esterificación con ácidos alifáticos (Reynoso *et al.*, 1997; García Barrera *et al.*, 1998) y ácidos aromáticos, especialmente en la posición 6-O (Heuer *et al.*, 1994; Schliemann y Strack, 1998).

Figura 1.59. Estructura del ciclo-DOPA

Las betacianinas se forman por condensación del ácido betalámico con derivados del *ciclo*-DOPA. Esta reacción provoca un aumento de la resonancia en el anillo aromático difenólico, y esta conjugación hace que el máximo de absorción pase de 480 nm (como ocurre con las betaxantinas, de color amarillo) a 535 nm. Esto explica el color rojo-violáceo de las betacianinas a diferencia del color amarillo de las betaxantinas (Jackman y Smith, 1996; Strack et al., 2003). Las betacianinas presentan 2 máximos de absorción: uno en el rango del UV (270-280 nm) debido al *ciclo*-DOPA; y otro segundo máximo en el rango del espectro visible (535-540 nm, dependiendo del disolvente empleado). La acilación con ácido hidroxicinámico provoca la aparición de un tercer máximo de absorción a 300-330 nm, mientras que la acilación con radicales acil-alifáticos no altera el espectro (Stintzing y Carle, 2004).

La más común de las betacianinas es la betanina (betanidin-5-O- β -glucósido), que es el pigmento mayoritario en remolacha roja y en los frutos de *Opuntia* de color rojo-violáceo (Stintzing y Carle, 2004). La Tabla 1.8 resume las diferentes betacianinas identificadas en el reino vegetal, presentando su nombre vulgar, el sustituyente glucosídico diferenciador y el género en el que están presentes.

Figura 1.60. Estructura de la betanidina (izda) y betanina (dcha)

Tabla 1.8. Betacianinas en plantas (*Stintzing y Carle, 2008*)

BETACIANINA	SUSTITUYENTE	GÉNERO
5-O- β -glucósidos		
Betanina	glucosa	<i>Beta</i> ; <i>Opuntia</i> ; <i>Amaranthus</i> ; <i>Phytolacca</i> ; <i>Portulaca</i>
Amarantina	Glucuronil-glucosa	<i>Amaranthus</i> ; <i>Bougainvillea</i>
Bougainvilleina I	soforosa	<i>Bougainvillea</i> ; <i>Hylocereus</i> ; <i>Mesembryanthemum</i>
Celosianina I	fumaril-glucuronil-glucosa	<i>Celosia</i>
Celosianina II	ferulil-glucuronil-glucosa	<i>Celosia</i>
Hylocerenina	3-hidroxi-3-metil-glutaril-glucosa	<i>Hylocereus</i>
Iresinina I	glucuronil-3-hidroxi-3-metil-glutaril-glucosa	<i>Iresine</i>
Lamprantina I	cumaril-glucosa	<i>Lampranthus</i>
Lamprantina II	ferulil-glucosa	<i>Beta</i> ; <i>Lampranthus</i>
Neobetanina	glucosa	<i>Beta</i> ; <i>Opuntia</i>
Phyllocactina	malonil-glucosa	<i>Beta</i> ; <i>Hylocereus</i> ; <i>Opuntia</i>
Prebetanina	6-sulfatil-glucosa	<i>Beta</i> ; <i>Phytolacca</i>
Rivianina	3-sulfatil-glucosa	<i>Rivina</i>
Phytolacca betacianina	ferulil-apiosa	<i>Phytolacca</i> ; <i>Schlumbergera</i>
Schlumbergera betac. I	malonil-apiosa	<i>Schlumbergera</i>
Schlumbergera betac. II	ferulil-malonil-apiosa	<i>Schlumbergera</i>
Mesembryanthemum betac. I	ferulil-diglucosa	<i>Mesembryanthemum</i> ; <i>Beta</i>
Mesembryanthemum betac. II	diferulil-diglucosa	<i>Mesembryanthemum</i>
Mesembryanthemum betac. III	triferulil-diglucosa	<i>Mesembryanthemum</i>
6-O- β -glucósidos		
Bougainvilleina V	soforosa	<i>Bougainvillea</i>
Gomfrenina I	glucosa	<i>Basella</i> ; <i>Bougainvillea</i> ; <i>Gomphrena</i> ; <i>Opuntia</i> ; <i>Phytolacca</i> ;
Gomfrenina II	cumaril-glucosa	<i>Gomphrena</i>
Gomfrenina III	ferulil-glucosa	<i>Gomphrena</i>
Bougainvillea betac. I	6-cafeil-soforosa	<i>Bougainvillea</i>
Bougainvillea betac. II	6''-cumaril-soforosa	<i>Bougainvillea</i>
Bougainvillea betac. III	6-cumaril-soforosa	<i>Bougainvillea</i>
Bougainvillea betac. IV	2''-soforosil-6-cafeil-6''-cumaril-soforosa	<i>Bougainvillea</i>
Bougainvillea betac. V	2''-glucosil-6-cafeil-6''-cumaril-soforosa	<i>Bougainvillea</i>
Bougainvillea betac. VI	2''-glucosil-6,6''-dicumaril-soforosa	<i>Bougainvillea</i>
Bougainvillea betac. VII	6,6''-dicumaril-soforosa	<i>Bougainvillea</i>

Las betaxantinas, se forman por condensación del ácido betalámico con aminas o aminoácidos (Strack *et al.*, 2003) (Fig. 1.53). La presencia de aminas conjugadas le confiere un máximo de absorción a menor longitud de onda en comparación con sus aminoácidos homólogos (Stintzing *et al.*, 2002).

En los frutos de *Opuntia ficus-indica*, la principal betaxantina es el indicaxanteno, que contiene triptófano (Reynoso *et al.*, 1997). En la remolacha (*Beta vulgaris*) las betaxantinas mayoritarias son vulgaxantina I y vulgaxantina II, sustituidas con glutamina y ácido glutámico, respectivamente (Huang y Von Elbe, 1985).

La Tabla 1.9 resume las diferentes betaxantinas identificadas en el reino vegetal, presentando su nombre vulgar, el sustituyente amino diferenciador y el género en el que están presentes.

Figura 1.60. Estructura del indicaxanteno (izda) y del vulgaxanteno I (dcha)

Tabla 1.9. Betaxantinas en plantas (Stintzing y Carle, 2008)

BETAXANTINA	SUSTITUYENTE	GÉNERO
Dopaxantina	DOPA	<i>Glottiphyllum; Lampranthus; Portulaca</i>
Humilixantina	5-hidroxinorvalina	<i>Rivina</i>
Indicaxanteno I	prolina	<i>Opuntia; Beta</i>
Miraxantina I	metionina sulfóxido	<i>Mirabilis</i>
Miraxantina II	ácido aspártico	<i>Mirabilis</i>
Miraxantina III	tiramina	<i>Mirabilis; Beta</i>
Miraxantina V	dopamina	<i>Mirabilis; Beta</i>
Muscaaurina VII	histidina	<i>Beta; Opuntia</i>
Portulacaxantina I	hidroxiprolina	<i>Portulaca</i>
Portulacaxantina II	tirosina	<i>Beta; Portulaca</i>
Portulacaxantina III	glicina	<i>Beta; Portulaca</i>
Vulgaxantina I	glutamina	<i>Beta; Opuntia; Portulaca</i>
Vulgaxantina II	ácido glutámico	<i>Beta; Portulaca</i>
Vulgaxantina III	asparragina	<i>Beta</i>
Vulgaxantina IV	leucina	<i>Beta; Opuntia</i>
Alanina betaxantina	alanina	<i>Beta</i>
G.A.B.A. betaxantina	ácido γ -aminobutírico	<i>Beta; Opuntia</i>
Histamina betaxantina	histamina	<i>Beta</i>
Isoleucina betaxantina	Isoleucina	<i>Beta; Opuntia</i>
Metionina betaxantina	metionina	<i>Opuntia</i>
Metoxitiramina betaxantina	3-metoxitiramina	<i>Beta; Celosia</i>
Fenilalanina betaxantina	fenilalanina	<i>Beta; Celosia; Opuntia</i>
Serina betaxantina	serina	<i>Beta; Opuntia</i>
Triptófano betaxantina	triptófano	<i>Beta; Celosia</i>
Valina betaxantina	valina	<i>Beta; Opuntia</i>

Contrariamente a otros pigmentos naturales de tonalidades amarillo-anaranjadas empleados industrialmente como colorantes alimentarios, las betaxantinas son muy estables en un amplio rango de pH que oscila entre 3.5 y 7 (Kugler *et al.*, 2007a). Esta propiedad les confiere una gran proyección tecnológica como colorantes para una diversa gama de alimentos: helados, yogures, batidos, golosinas, bebidas refrescantes, etc.

En investigaciones previas realizadas por el grupo de investigación QUIMYTEC, (Fernández-López *et al.*, 2002a; Castellar *et al.*, 2003; Obón *et al.*, 2009) se comprobó que los frutos de *Opuntia* presentan altas cantidades de betalaínas, tanto betacianinas como betaxantinas, comparables e incluso superiores a las de los extractos de *Beta vulgaris*, que los hace aptos para ser empleados como fuente de estos pigmentos, con la particularidad que al tratarse de frutos, sus extractos aportan sabores y olores agradables, al contrario que ocurre con los extractos de remolacha, con características organolépticas terrosas que desmerecen su calidad.

1.3.3. Ruta biosintética

A diferencia de lo que ocurre con otras familias de pigmentos vegetales como carotenoides, antocianinas o clorofilas, la ruta biosintética de las betalaínas no se conoce todavía con detalle. A partir de la estructura química de las betalaínas y de algunos de los intermedios biosintéticos, se propuso una primera versión de la ruta biosintética (Strack *et al.* 2003). Las reacciones iniciales fueron elucidadas mediante experimentos de marcaje isotópico con tirosina y DOPA. Se demostró que el esqueleto completo de tirosina era incorporado al ácido betalámico y *ciclo*-DOPA. Las enzimas fundamentales participan en esta síntesis son: tirosinasa, DOPA 4,5-dioxigenasa y betanidina-glucosiltransferasa. La enzima tirosinasa, o polifenol oxidasa, desempeña una función clave. Se ha descrito y purificado a partir de extractos que contenían betalaínas en *Amanita muscaria*, *Portulaca grandiflora* y remolacha roja. Se encuentra ampliamente distribuida en toda la escala filogenética. Se trata de una cuproproteína que cataliza dos tipos de reacciones acopladas a expensas de oxígeno molecular: la hidroxilación de monofenoles en posición *orto* para dar el correspondiente *o*-difénol (actividad monofenolasa) y la oxidación de *o*-difénolos a sus correspondientes *o*-quinonas (actividad difenolasa) (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2011).

La variedad de posibles substratos y la elevada reactividad de las *o*-quinonas generadas por la tirosinasa determinan la participación de esta enzima en procesos fisiológicos de formación de polímeros tan diversos como la biosíntesis de ligninas, la esclerotización de la cutícula de artrópodos y la formación de las melaninas responsables de la pigmentación en animales.

La revisión de *Strack et al. (2003)* se centra principalmente en una ruta tomando como punto de partida la tirosina (*Xiao-Hong Han et al., 2009*). *Gandía-Herrero et al., (2005)* propusieron otra ruta biosintética tomando como punto de partida la tiramina en lugar de la tirosina.

1.3.3.1. Biosíntesis basada en la tirosina

La biosíntesis se inicia por la hidroxilación de la tirosina, mediante la cual se convierte en DOPA (dihidroxifenilalanina). Esta reacción es catalizada por la tirosinasa, la cual es activada por la hidrolasa (EIA). La DOPA resultante tiene tres salidas:

- A) La DOPA es oxidada a dopaquinona por la tirosinasa, y activada por la polifenol-oxidasa (EIB).
- B) La DOPA es convertida a seco-DOPA, catalizando la reacción la DOPA-dioxigenasa (EII).
- C) Se produce la descarboxilación de la DOPA, dando lugar a dopamina, y actuando como catalizador la DOPA-descarboxilasa (EV).

La dopaquinona formada en la salida A) es ciclada para formar ciclo-DOPA. La condensación de ciclo-DOPA con ácido betalámico puede dar lugar a betanidina. Esta betanidina puede ser glucosilada con la adición de betanidin-5-glucosiltransferasa (EIII), y formar ciclo-DOPA glucósido (*Sasaki et al., 2005*). Este nuevo producto es condensado con ácido betalámico y da lugar directamente a betanina sin dar lugar previamente betanidina.

La seco-DOPA formada en la salida B) es convertida a ácido betalámico. La enzima que cataliza esta reacción es desconocida. El ácido betalámico tiene cinco

rutas posibles para llegar a la formación de betacianinas y betaxantinas. Las dos primeras son la clásicas que fueron descritas por *Strack et al.*, (2003), en la que el ácido betalámico es condensado con ciclo-DOPA para formar betanidina, o bien condensado con algún grupo amino para formar betaxantina. En la tercera ruta el ácido betalámico es condensado con ciclo-DOPA glucósido y forma betanina directamente. En la cuarta ruta el ácido betalámico es combinado con 2-descarboxi-ciclo-DOPA y da lugar a 2-descarboxil-betanidina. En la quinta, el ácido betalámico reacciona con la tirosina y forma tirosin-betaxantina directamente.

Finalmente, la dopamina formada en la salida C) es convertida en dopamin-quinona, bajo la catálisis de la enzima tirosinasa. Esta dopamin-quinona da lugar a 2-descarboxi-ciclo-DOPA (*Kobayashi et al.*, 2001), la cual a su vez es condensada con ácido betalámico para dar 2-descarboxil-betanidina. Esta última es glucosilada para producir 2-descarboxil-betanina. La glucosilación es catalizada por la enzima 5-glucosil-transferasa (EIII).

Figura 1.61. Ruta biosintética de betalainas basada en la tirosina

1.3.3.2. Biosíntesis basada en la tiramina

Esta ruta fue propuesta por primera vez por *Kobayashi et al. (2001)*. En este caso, la tiramina es directamente hidroxilada a dopamina por acción de la hidroxil-tirosinasa (EIA). Después, la dopamina es oxidada para producir dopamin-quinona bajo la catálisis de la polifeniloxidas-tirosinasa (EIB). A continuación, la dopamin-quinona es convertida a 2-descarboxi-ciclo-DOPA, la cual se condensa con ácido betalámico para formar 2-descarboxi-betanidina. La glucosilación de la 2-descarboxi-betanidina es igual que la que se produce en la ruta biosintética basada en la tirosina, siendo el producto final la 2-descarboxi-betanina y actuando de nuevo la enzima 5-glucosil-transferasa (EIII).

Además de este proceso, otra ruta biosintética fue propuesta recientemente por *Gandía-Herrero et al., (2005)*. Esta ruta está basada en la condensación inicial de la tiramina con ácido betalámico para dar tiramin-betaxantina. Ésta posteriormente es hidroxilada por la hidroxilasa-tirosinasa (EIA) para producir dopamin-betaxantina. La dopamin-betaxantina es oxidada por la tirosinasa (EIB) para dar dopamin-betaxantin-quinona. Finalmente esta última es ciclada para producir 2-descarboxi-betanidina. Según *Gandía-Herrero et al., (2005)*, esta segunda ruta alternativa que parte también de tiramina es más eficaz que la anterior, ya que los productos intermedios obtenidos son más estables.

Sobre esta ruta aún hay varias preguntas por responder: “¿Cómo tiene lugar la condensación del ácido betalámico con tirosina o con dopamina?”, es decir, “la condensación ocurre de manera espontánea o interviene alguna enzima en el proceso?”; “¿la ciclación de la dopamin-betaxantin-quinona es espontánea o interviene alguna enzima?”. Además, en el caso de que intervenga alguna enzima en estas dos reacciones, “¿cuáles son esas enzimas?”.

Figura 1.62. Ruta biosintética de las betalainas basada en la tiramina

1.3.4. Bioactividad

Los compuestos bioactivos son componentes de los alimentos que poseen actividad biológica dentro del organismo que va a redundar en beneficios para la salud (*Barber et al., 1999*). Se conocen como alimentos funcionales a aquellos, de origen animal o vegetal, consumidos en la dieta diaria, que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos (*Drago Serrano et al., 2006*).

En los últimos años, la Ciencia de los Alimentos se dirige hacia un objetivo claro de conseguir optimizar la nutrición en términos de mejora en la salud de los consumidores (*Ashwell, 2003*). Estas campañas de promoción de alimentos nutritivos y saludables han tenido eco en los consumidores, que cada vez demandan más alimentos funcionales cuyo beneficio para la salud esté científicamente

demostrado. De hecho, son numerosos los proyectos y publicaciones dirigidos a identificar y entender los mecanismos de acción que tienen los compuestos funcionales presentes en los alimentos sobre nuestro organismo.

Existe una abundante literatura sobre las actividades biológicas de las betalaínas, especialmente de su actividad antioxidante, lo cual puede ayudar a prevenir enfermedades degenerativas, cáncer y diversas cardiopatías.

Son conocidas las funciones fisiológicas que desempeñan estos pigmentos en la protección de las plantas contra daños oxidativos (*O'Neill et al., 2002*). Al igual que ocurre en las plantas, el metabolismo humano también genera moléculas con funciones oxigenadas muy reactivas (hidroxilos, aniones superóxido, peróxidos y otros radicales) y también moléculas nitrogenadas como el óxido nítrico. Una excesiva producción fisiológica de estos radicales puede superar la capacidad antioxidante del organismo, la cual radica en sustancias (vitamina C, vitamina D y otros) y enzimas antioxidantes. Como consecuencia de ello, las proteínas, los lípidos y el ADN se verán afectados por estos radicales libres y, consecuentemente, generarán daños y disfunción en las membranas celulares, enzimas y material genético (*Stintzing y Carle, 2004*). Desde esta perspectiva, resulta evidente el apoyo que las sustancias de naturaleza antioxidante como las betaxantinas prestan frente al deterioro oxidativo de las células.

La estructura polifenólica de las betaxantinas, junto a la presencia de un sistema conjugado de enlaces dobles les confiere una notable actividad antirradicales libres. La presencia de grupos –OH, excelentes donantes de electrones y neutralizadores de radicales libres, es determinante en esta función fisiológica. Existe abundante literatura científica sobre la actividad biológica (bioactividad) de betalaínas (*Azeredo, 2009; Fernández-López y Giménez, 2013*). Es conocido que estos pigmentos se asocian a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) para aumentar su resistencia a la oxidación.

Varios trabajos han descrito la actividad de la betanina –perteneciente al grupo de las betacianinas–, y del indicaxanteno –perteneciente al grupo de las betaxantinas– para fijar el ácido hipocloroso (HClO), que es el antioxidante más

potente producido por determinados leucocitos (neutrófilos) en la sangre humana (*Escribano et al., 1998; Kanner et al., 2001; Kujala et al., 2001; Butera et al., 2002; Pavlov et al., 2002; Wettasinghe et al., 2002; Cai et al., 2003*).

Puntualizando en el indicaxanteno, que es el principal pigmento que proporciona el color amarillo a los frutos de *Opuntia ficus-indica*, han sido numerosos los beneficios saludables que se le asignan:

- ✓ Mejora del tránsito intestinal, evitando las contracciones intestinales y los calambres abdominales (*Baldassano et al., 2011*).
- ✓ Alta capacidad antioxidante sobre el ácido hipocloroso que es el oxidante más poderoso producido por los neutrófilos humanos (*Allegra et al., 2005*). Además, esta capacidad antioxidante aumenta con la presencia de α -tocoferol (*Tesoriere et al., 2007*).
- ✓ *Feugang et al. (2006)* y *Stintzing y Carle (2006)* revisaron estudios sobre la capacidad antioxidante de frutos de *Opuntia*. *Zou et al. (2005)* observó en sus experimentos que al incorporar extractos de frutos de *Opuntia* en la alimentación de ratones afectados por tumores, el crecimiento de las células malignas se inhibía, atribuyendo este efecto al poder antioxidante de las betalaínas (indicaxanteno y betanina fundamentalmente) presentes en los extractos.
- ✓ Además de su poder colorante, su aporte a la dieta resulta muy beneficioso ya que aporta numerosos aminoácidos esenciales (*Leathers et al., 1992*). *Kapadia et al. (2003)* demostró la eficacia de la betanina para inhibir el crecimiento de tumores en piel e hígado, inducidos por diferentes agentes químicos cancerígenos en sus experimentos realizados con ratones. Otro dato interesante es que la actividad antioxidante de las betaxantinas aumenta con el número grupos hidroxilo y amino. Por el contrario, en las betacianinas las reacciones de glicosilación disminuyen la capacidad antioxidante, mientras que las reacciones de acilación la aumentan.

Con respecto a las betacianinas, también son numerosos los trabajos que hablan sobre sus efectos beneficiosos en la salud y en la prevención de enfermedades:

- ✓ *Vaillant et al. (2005)* observó que la capacidad antioxidante de la pulpa de pitaya roja (*Hylocereus*) es tan alta como la de la remolacha roja.
- ✓ *Wu et al. (2006)* concluyó que la piel de la pitaya roja (*Hylocereus*) presentaba una alta capacidad antioxidante, así como destacaba su capacidad de inhibir la proliferación de células cancerígenas, achacando estos efectos a la acción de betalaínas.
- ✓ Además de la capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerígenas y de prevenir enfermedades degenerativas, algunos estudios (*Tesoriere et al., 2005*) también evidencian que la incorporación de betalaínas a la alimentación humana por medio de frutos de *Opuntia*, aumenta la vida de los glóbulos rojos y los protege de la hemólisis (desintegración de los glóbulos rojos).

Figura 1.63. Efectos biosaludables de las betalaínas.

Además de proporcionar un color atractivo en los alimentos donde se incorporan, resulta evidente que las betaxantinas también resultan beneficiosas para nuestro organismo. La Fig. 1.63 resume los efectos biosaludables más importantes de estos pigmentos.

2. Justificación y Objetivos

2.1. JUSTIFICACIÓN

Como se ha comentado en el capítulo de Introducción, los colorantes naturales se llevan utilizando como aditivos alimentarios, o bien para otros usos, desde las primeras civilizaciones. Sin embargo, la aparición de colorantes orgánicos sintéticos ha desplazado durante la primera mitad del siglo XX a los naturales hasta un segundo plano, debido sobre todo a su mayor estabilidad y su mayor poder colorante.

La preocupación por la salud por parte de los consumidores ha hecho que en los últimos años se haya producido un cambio de tendencia hacia el empleo de colorantes naturales, ya que además de aportar color, son sustancias con propiedades saludables.

No cabe duda que estas propiedades sirven para reconocer la importancia de los pigmentos naturales en nuestra dieta, cuya valía supera ampliamente a la función de proporcionar un color atractivo, adecuado, o reconocible como natural, a un alimento. Sin embargo, nos dejamos llevar por las llamativas coloraciones, que por supuesto añaden un toque de fantasía y variedad cromática. Y está bien que así sea, puesto que enmascarados por el color se ocultan muchos beneficios derivados no sólo ya de los pigmentos, sino del conjunto de componentes de frutas y vegetales (fibra, vitaminas y otros ingredientes funcionales) para los que los pigmentos hacen de reclamo. En definitiva, dejemos que la Naturaleza nos atraiga con sus llamativos colores y aprovechémonos de las recompensas que nos esperan por haber sido persuadidos.

El continuo crecimiento del mercado de pigmentos para su uso en alimentos y bebidas hace necesario desarrollar nuevas estrategias de producción, entre las que se encuentra la búsqueda de nuevas fuentes de pigmentos. Una de esas la pueden constituir los frutos de *Opuntia*, debido al poder colorante de estos frutos, sus apreciadas propiedades nutritivas, y los escasos requerimientos de agua y aportación de nutrientes que necesitan las plantas de *Opuntia* para su crecimiento, algo que se adecúa muy bien a las características del clima de la Región de Murcia.

En base a los antecedentes reflejados, se propone esta Tesis Doctoral con el fin de diseñar un proceso de extracción de betaxantinas de frutos de *Opuntia* para uso como colorante natural y su aplicación en algunos alimentos modelo para estimar su proyección tecnológica.

2.2. OBJETIVOS

De manera global se puede decir que el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el diseño de un proceso integrado para la obtención de un colorante amarillo hidrosoluble natural, a partir de frutos de *Opuntia*, para su empleo comercial en forma de extracto, su aplicación en productos alimentarios, y la comparación de su comportamiento con otros colorantes naturales comerciales. Adicionalmente se valorará también la presencia en estos extractos de otros componentes con características funcionales.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos parciales:

1) Obtención y caracterización del extracto colorante

A este objeto se seleccionarán frutos amarillos de *Opuntia ficus-indica*, que tras su homogeneización se someterán a extracción con agua, etanol y con una mezcla hidroalcohólica, se concentrarán, y se les analizará su contenido en pigmentos individuales, pH, sólidos solubles, densidad, viscosidad e intensidad colorante. Se compararán las propiedades de los extractos individuales obtenidos y se elegirá el más óptimo sobre el que hacer análisis más concretos.

2) Concentración del extracto colorante

El extracto colorante más óptimo de los tres ensayados se someterá a un proceso de evaporación rotativa a presión reducida, a fin de obtener un extracto concentrado en betalaínas sobre el que centraremos el resto de nuestras investigaciones.

3) Caracterización físico-química del extracto concentrado

Al extracto colorante concentrado en betalaínas se le determinará: contenido en pigmentos individuales, pH, sólidos solubles, densidad,

viscosidad e intensidad colorante. Además se analizará y cuantificará la presencia de sustancias bioactivas, como fenoles totales, flavonoides y carotenoides.

4) Estudio de la estabilidad frente a la temperatura

Se analizará la resistencia a la degradación frente a la temperatura del extracto colorante concentrado y se comparará su comportamiento con el de otros colorantes amarillos típicos de uso alimentario.

5) Secado por atomización del extracto concentrado líquido para obtener un colorante en polvo

Esta etapa de secado precisará de la optimización en base a temperatura y caudal de aire, presencia de coadyuvantes, agentes encapsulantes, etc., a fin de obtener el máximo rendimiento posible en la atomización, obtener un colorante de calidad fácilmente dispersable, y minimizar la degradación de los pigmentos presentes por efecto de la temperatura.

6) Incorporación de los extractos colorantes en alimentos modelo

Se realizará un estudio de aplicación del colorante obtenido en alimentos modelo del tipo yogur o bebidas refrescantes, en el que se determinará la capacidad colorante y su estabilidad, así como la posible influencia en las características organolépticas del producto acabado.

3. Parte

Experimental

3.1. MATERIALES

Para la investigación se emplearon frutos maduros de *Opuntia ficus-indica* de coloración amarillo-anaranjada intensa. La selección y recolección de los mismos se realizó en parcelas ubicadas en la Región de Murcia. Los frutos no procedieron de plantas cultivadas, sino que se seleccionaron plantas asilvestradas para la recolección de los mismos.

Se recolectaron frutos maduros con similar índice de madurez (Figura 3.1), con el objetivo de lograr el máximo rendimiento en el contenido de pigmentos.

Los frutos recolectados se trasladaron rápidamente al laboratorio para evitar cualquier alteración o degradación de los mismos, y una vez allí se procedió con ellos según la siguiente rutina:

- Barrido de los frutos, con objeto de eliminar los gloquidios que dificultan su manipulación.

- Clasificación y selección de los frutos recolectados, a fin de eliminar aquellos cuyo estado de madurez no fuera óptimo o presentara cualquier defecto o alteración.
- Pelado manual, con el cuidado necesario para no dañar el fruto (Figura 3.2).
- Cuarteo y formación de submuestras representativas.
- Pesado, envasado y almacenado a -24°C hasta su posterior análisis.

Figura 3.1. Frutos de *Opuntia* seleccionados para la investigación

Figura 3.2. Pelado y separación de la ectodermis de frutos de *Opuntia*.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extracción de pigmentos y obtención de los extractos colorantes

3.2.1.1. Materiales

- Balanza electrónica Gram Serie SV.
- Homogeneizador Ultraturrax modelo Ika Labortechnik T-25 basic (Alemania).
- Agitador magnético.
- Centrífuga refrigerada Hermle Z-383-K (Wehingen, Alemania).
- Filtros de nylon de 0.45 μm (Teknokroma, Barcelona, España).
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) procedente de los laboratorios Scan (Irlanda).
- Agua destilada.

3.2.1.2. Procedimiento

Los frutos pelados se dejaron descongelar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se homogeneizaron con el equipo Ultraturrax modelo Ika Labortechnik T-25 basic (Figura 3.3).

Figura 3.3. Homogeneizador Ultraturrax Ika Labortechnik T-25 basic

La extracción se llevó a cabo utilizando tres disolventes diferentes con el objetivo de obtener extractos colorantes distintos y comparar sus características físico-químicas:

- ✓ Agua
- ✓ Etanol
- ✓ Mezcla agua/etanol 60:40 v/v.

El zumo de *Opuntia* homogeneizado se mezcló con cada uno de los disolventes en proporción fruto/disolvente de 1:5 w/v. Cada una de las mezclas fue agitada magnéticamente durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Tras la homogeneización, las mezclas fueron centrifugadas en un equipo Hermle Z-383-K (Figura 3.4) a 15000 rpm y 10 °C durante 10 minutos para depositar y eliminar los restos vegetales insolubles y semillas. Después de la centrifugación se decantó el sobrenadante del residuo sólido. El extracto líquido se pasó por filtros de nylon de 0.45 µm para separar pequeñas fibras y restos vegetales que pudieran interferir en los análisis químicos.

Figura 3.4. Centrífuga Hermle Z-383-K

3.2.2. Caracterización físico-química de los extractos

Se llevó a cabo una caracterización físico-química de los tres extractos a fin de concluir cuál era el más óptimo sobre el que obtener un extracto colorante concentrado, y realizar sobre él un estudio más detallado sobre su viabilidad para emplearlo como colorante alimentario.

Esta caracterización se basó en determinar el contenido en sólidos solubles, pH, densidad, viscosidad, acidez, espectro de absorción y determinación del contenido en betaxantinas de los extractos.

3.2.2.1. Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles totales presentes en un zumo o pulpa. Para medir estos sólidos solubles se utilizó un refractómetro óptico Carl Zeiss (Tokio, Japón). Para su empleo, se coloca una pequeña cantidad de agua destilada en el campo del refractómetro y se calibra el aparato en la posición 0. Posteriormente, se seca el campo y se coloca una pequeña cantidad de muestra del extracto a analizar. Finalmente, se lee la cantidad de sólidos solubles (°Brix) sobre una escala de 0 a 32 °Brix. La medida de cada extracto se realizó por triplicado.

3.2.2.2. pH

El pH es el parámetro que permite conocer la concentración de protones (H^+) existentes en un medio. Para su determinación se utilizó un pH-metro micro pH 2000 de la casa comercial Crison (Madrid, España) y el cual nos permite obtener medidas con precisión de 0.01 unidades de pH. La medida de pH de cada muestra se realizó por triplicado.

3.2.2.3. Densidad

La densidad es la masa de una sustancia referida a un volumen determinado. La determinación de la densidad de los extractos se realizó pesando 5 mL de cada uno de ellos en una balanza de precisión Sartorius BP 121S. Los 5 mL se tomaron con una micropipeta, a fin de conseguir la mayor precisión posible, y una temperatura de 20 °C. La medida se realizó por triplicado y los resultados se dieron en g/mL.

3.2.2.4. Viscosidad

La viscosidad es la resistencia que ofrece un fluido al movimiento relativo de sus moléculas. Es una propiedad muy importante de los fluidos, ya que nos permite conocer su mayor o menor dificultad para su bombeo a través de una instalación.

Se define la viscosidad dinámica del fluido mediante la siguiente expresión:

$$\mu = \nu \cdot \rho$$

siendo μ la viscosidad dinámica del fluido, ν la viscosidad cinemática, y ρ la densidad del fluido. La viscosidad dinámica se suele expresar en poises (P), donde:

1 P = $10^{-1} \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$, aunque lo más habitual es expresar la viscosidad dinámica en centipoises (1 P = 100 cP).

La viscosidad cinemática se suele expresar en stockes (St), donde 1 St = $0.0001 \text{ m}^2/\text{s}$, aunque lo más habitual es expresar la viscosidad cinemática en centistockes (1 cSt = $1 \text{ mm}^2/\text{s}$).

La viscosidad de los extractos se determinó con un viscosímetro Cannon-Fenske, que consiste en un capilar de vidrio a través del cual cae el fluido por gravedad. Estos viscosímetros constan de 2 bulbos y la medida de la viscosidad se calcula midiendo el tiempo que tarda el fluido en caer a través de ellos. Para ello, el viscosímetro Cannon-Fenske (Figura 3.8) dispone de 2 marcas rayadas, debiéndose medir el tiempo que tarda el fluido en bajar desde una marca hasta la otra. En nuestro caso, la viscosidad se midió en un baño termostático a dos temperaturas diferentes, 25 °C y 40 °C, y con dos viscosímetros distintos. En todos los casos las medidas se realizaron por triplicado.

Teniendo en cuenta las constantes de los viscosímetros a las temperaturas dadas, para calcular la constante a una temperatura diferente se extrapolaron los resultados.

De esta manera, la viscosidad de los extractos se calculó de la siguiente manera: $\nu = c \cdot t$, siendo ν la viscosidad cinemática, c la constante de cada viscosímetro

a una temperatura dada, y t el tiempo que tarda en caer el fluido desde una marca rayada a otra.

La viscosidad dinámica se calculó en cP teniendo en cuenta que: $\mu = \nu \cdot \rho$, siendo μ la viscosidad dinámica del fluido, ν la viscosidad cinemática, y ρ la densidad del fluido. Para los cálculos se debe tener especial cuidado en los cambios de unidades para dar los resultados de la forma correcta.

Figura 3.5. Viscosímetro Cannon-Fenske

3.2.2.5. Acidez

La acidez se determinó mediante valoración de los extractos con NaOH 0.01 M, (Panreac, Barcelona, España). La valoración se llevó a cabo hasta conseguir que el pH de los extractos aumentara hasta 8.2. La acidez se expresó como mmol de ácido cítrico por litro de extracto.

3.2.2.6. Análisis por espectrofotometría y determinación del contenido en betaxantinas

Los análisis por espectrofotometría se llevaron a cabo con un espectrofotómetro modelo 8453 UV-Visible de la casa comercial Agilent (Waldbronm, Alemania) y en el que se emplean cubetas de cuarzo de 3 mL para su medida y se registró el espectro visible de los extractos con barridos entre 350-700 nm.

El contenido en betaxantinas se expresó como contenido en indicaxanteno ($M=308$ g/mol), que es la betaxantina mayoritaria presente en los frutos de *Opuntia ficus-indica*. La medida de absorbancia se realizó a 480 nm, teniendo en cuenta que la absorbancia estuviera entre los valores 0 y 1. En caso contrario se diluyó la muestra para conseguirlo, a fin de que la relación entre contenido en indicaxanteno y absorbancia fuese lineal, y a la hora de hacer los cálculos se tuvo en cuenta este factor de dilución. Para el cálculo del contenido en betaxantinas se utilizó el coeficiente de absorción molar del indicaxanteno, $\epsilon=48000$ L/(mol·cm) (Kugler et al., 2007).

3.2.2.7. Determinación de las coordenadas de color

A partir del espectro de absorción de los extractos en el rango de 350 a 700 nm se hizo una determinación objetiva del color de los mismos siguiendo el espacio CIELAB, que está adaptado también como norma UNE. Los valores de las coordenadas colorimétricas (L^* , a^* , b^* , C^* y h) fueron obtenidos usando como estándar el iluminante D_{65} y un ángulo con respecto al observador de 10° , considerando las siguientes expresiones:

$$(1) \quad L^* = 116 \cdot (Y / Y_n)^{1/3} - 16$$

$$(2) \quad a^* = 500 \cdot \left[(X / X_n)^{1/3} - (Y / Y_n)^{1/3} \right]$$

$$(3) \quad b^* = 200 \cdot \left[(Y / Y_n)^{1/3} - (Z / Z_n)^{1/3} \right]$$

$$(4) \quad C^* = \left[(a^*)^2 + (b^*)^2 \right]$$

$$(5) \quad h^\circ = \arctan(b^* / a^*)$$

donde, X_n , Y_n y Z_n son los valores de X , Y , y Z para el iluminante D_{65} ($X_n=95.0247$, $Y_n=100.0000$, $Z_n=108.8314$). En el caso de que las relaciones X/X_n , Y/Y_n o Z/Z_n sean igual o inferior a 0.008856, serán reemplazados por $(77.878 \cdot F + 16)$, donde F es X/X_n , Y/Y_n o Z/Z_n , según corresponda.

En las expresiones anteriores la coordenada L^* recibe el nombre de luminosidad y puede tomar valores entre 0 y 100, para estímulos independientes toma siempre el valor 100 y no sirve para su especificación. Las coordenadas colorimétricas a^* y b^* forman un plano perpendicular a la luminosidad. La coordenada a^* define la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad, hacia el rojo si $a^*>0$, hacia el verde si $a^*<0$. Análogamente la coordenada b^* define la desviación hacia el amarillo si $b^*>0$, hacia el azul si $b^*<0$, como muestra la Figura 3.6.

Figura 3.6. Coordenadas colorimétricas

El conjunto a^* , b^* recibe el nombre de coordenadas cromáticas y junto con la luminancia (L^*) definen el color de un objeto. El ángulo de tono angular (h^*), varía entre 0° y 360° (0° =rojo; 90° =amarillo; 180° =amarillo-verdoso; 270° =azul) y para estímulos acromáticos ($a^*=0$, $b^*=0$) es una magnitud no definida. Ambos términos también definen la cromaticidad del color del estímulo y junto con la claridad determinan las coordenadas cilíndricas del espacio CIE LCh (Figura 3.7).

Figura 3.7. Coordenadas cilíndricas del espacio CIE LCh

Figura 3.8. Esfera de color CIELAB. Perfiles o planos (a^* , b^*) con diferentes valores de luminosidad (L^*) constante.

3.2.3. Obtención de un extracto colorante concentrado

Tras la caracterización físico-química llevada a cabo con los extractos obtenidos, se hizo un análisis de los datos a fin de elegir uno de ellos para concentrarlo y realizar un estudio más detallado de él. Tras este estudio, se decidió elegir el extracto obtenido con disolvente agua/etanol 60:40 v/v como el más óptimo.

Se llevó a cabo una nueva extracción utilizando como disolvente la mezcla hidroalcohólica agua/etanol 60:40 v/v siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.2.1. El extracto colorante obtenido se concentró bajo vacío en un Rotavapor Büchi R-200 (Figura 3.9) ajustando las condiciones a 35 °C y presión de 6 kPa. De esta manera, durante el proceso de concentración se consiguió eliminar la mayor parte de etanol del extracto.

Figura 3.9. Rotavapor Büchi R-200 (Flawil, Suiza)

3.2.3.1. Caracterización físico-química

El extracto colorante obtenido mediante concentración en el rotavapor se analizó y se determinaron sus características físico-químicas del mismo modo que se había hecho anteriormente con los extractos previos:

- ✓ Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)
- ✓ pH
- ✓ Densidad
- ✓ Viscosidad
- ✓ Acidez
- ✓ Espectro de absorbanza y determinación del contenido en betaxantinas
- ✓ Determinación de las coordenadas de color

Esta caracterización físico-química se realizó siguiendo los mismos procedimientos que los descritos a lo largo del apartado 3.2.2. y con los que se obtuvieron las principales características físico-químicas de los tres extractos previos.

3.2.3.2. Análisis cromatográfico

En el análisis químico en general, y en el de los pigmentos en particular, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha convertido en una técnica muy utilizada debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación y su aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en este caso la alimentaria (*Skoog et al., 2003*).

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija.

La cromatografía líquida “clásica” se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Después de depositar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Los distintos compuestos presentes en la muestra se separan según su mayor o menor afinidad con la fase móvil y la estacionaria. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de micras, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC), que ha sido la utilizada en este trabajo, consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención de cada compuesto dentro de la columna es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se le denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por la disminución de la energía libre de la entropía asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye.

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, compuestos de cadenas hidrocarbonadas largas se asocian con tiempos de retención mayores porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida.

Aparte de la hidrofobicidad de la fase móvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía

de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención.

Otra variable importante es el pH, puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio por controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquier resto de sílice de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contraiones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

En el presente trabajo se emplearon dos equipos de HPLC:

- HPLC con detector de fotodiodos (PDA, Figura 3.10), para la obtención del perfil cromatográfico del extracto colorante. Se puede decir que este perfil cromatográfico es la huella dactilar del extracto.
- HPLC con detector de masas (HPLC-MS, Figura 3.11) para la identificación de los pigmentos detectados con el cromatógrafo HPLC-PDA.

Análisis cromatográfico mediante HPLC-PDA

El perfil cromatográfico del extracto colorante procedente de frutos de *Opuntia* se determinó con un HPLC modelo Alliance (Waters, Milford, MA, USA), equipado con dos bombas M510, un inyector automático modelo 717plus, y dos detectores en línea: un detector de fotodiodos (PDA) M996, y un detector de fluorescencia modelo W2475.

Se empleó una columna Atlantis dC₁₈ con un tamaño de partícula de 5 µm, de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro del fabricante Waters. El análisis y procesamiento de los datos se realizó con el sistema “Millennium 2010 Chromatography Manager”.

Las condiciones de análisis para obtener el perfil del extracto colorante fueron las siguientes:

- Fase móvil A: Ácido acético (Romil, Loughborough, UK) al 0.5 % en agua ultrapura (Milli-Q, procedente de Millipore, Bedford, MA) (0.5 v/99.5 v).
- Fase móvil B: Ácido acético (Romil, Loughborough, UK) al 0.5 % en acetonitrilo (Romil, Loughborough, UK) (0.5 v/99.5 v).
- Flujo: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 20 μ L
- Tiempo de análisis: 25 minutos

Para el gradiente de elución (Tabla 3.1) se siguió el propuesto en la bibliografía (*Fernández-López y Almela, 2001*).

Figura 3.10. Equipo de HPLC-PDA utilizado en los análisis

Tabla 3.1. Programa de elución para el análisis de pigmentos por HPLC-PDA

TIEMPO (min)	FASE MÓVIL A (%)	FASE MÓVIL B (%)
0	100	0
12	88	12
25	88	12

Análisis cromatográfico mediante HPLC-MS-PDA

Para confirmar la identificación de los pigmentos detectados en el perfil cromatográfico del extracto colorante procedente de frutos de *Opuntia*, se utilizó un HPLC-MS modelo Waters Alliance 2695 (Milford, MA. USA), compuesto por una bomba cuaternaria de flujo variable, un inyector automático, un detector de fotodiodos modelo 2996 y un detector de espectrometría de masas ZQ cuádrupolo.

Se empleó una columna Atlantis dC₁₈ con tamaño de partícula de 5 µm, de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro del fabricante Waters. El detector de masas MS cuádrupolo dispone de una sonda de electropulverización (ESI), y se utilizó nitrógeno como gas de arrastre.

Las condiciones de análisis fueron idénticas a las empleadas en HPLC-PDA, a las que hay que añadir las fijadas para la obtención de los espectros de masas:

- Capilaridad: 3500 V
- SCAN: 50-1000 m/z
- Flujo de N₂: 10 L/min
- Voltaje de cono: 15 y 45 eV

Figura 3.11. Equipo de HPLC-MS-PDA utilizado en el análisis

3.2.4. Análisis de compuestos bioactivos

3.2.4.1. Determinación de fenoles totales

Los polifenoles son uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo parte importante de la dieta humana.

Constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, formadas por más de un grupo fenol en sus moléculas, y son metabolitos secundarios de los vegetales y se encuentran distribuidos en diferentes tejidos de las plantas. Actualmente han despertado un reciente interés debido a sus propiedades antioxidantes y a sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como prevención de enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio.

Estos compuestos se clasifican en diferentes grupos en función del número de anillos fenólicos que contienen y de los elementos estructurales que unen unos

anillos con otros (Manach *et al.*, 2004). Podemos distinguir entre ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, y lignanos.

La cuantificación de fenoles totales se realizó siguiendo el método descrito por Skerget *et al.*, (2005). Se trata de un método de análisis espectrofotométrico basado en una reacción colorimétrica de oxidación-reducción. En él, se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu, que consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) y de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). El reactivo de Folin-Ciocalteu se reduce por oxidación de los fenoles a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). Esta coloración azul posee una absorbancia máxima a 760 nm y es proporcional a la cantidad de compuestos fenólicos. Como estándar de referencia en la medida de fenoles totales se utilizó ácido gálico porque se encuentra a alta concentración en frutas y verduras, y por ser utilizado habitualmente en la determinación de polifenoles junto con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Materiales

- Ácido gálico.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania).
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3).
- Agua destilada.
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)

Procedimiento

Se preparan patrones de ácido gálico a diferentes concentraciones: 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm y 500 ppm. Se cogen tubos de ensayo y se echa en cada tubo 0.5 mL del patrón, y 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu en dilución 1:10. Se deja reaccionar 5 minutos y posteriormente se añade a cada tubo de

ensayo 2 mL de Na_2CO_3 al 5 %. Los tubos de ensayo se introducen en un baño termostático a 50 °C durante 5 minutos y posteriormente se enfrían rápidamente hasta temperatura ambiente. Finalmente se mide la absorbancia a 760 nm y se construye la recta de calibrado que servirá para calcular la concentración de fenoles totales en nuestro extracto colorante.

Para analizar la muestra, se toman 0.5 mL del extracto colorante y se añaden 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de Na_2CO_3 al 5 % y se sigue el mismo procedimiento que el llevado a cabo para obtener la recta de calibrado.

El contenido total en fenoles se expresa en mg GAE (equivalentes de ácido gálico) por 100 mg de fruto.

3.2.4.2. Análisis y cuantificación de flavonoides

Se analizó el extracto de frutos de *Opuntia* con el objetivo de detectar y cuantificar la presencia de miricetina, quercetina, kaempferol, isorhamnetina y luteolina. Previamente se llevó a cabo una hidrólisis ácida del extracto y posterior extracción en fase sólida.

Materiales

- Ácido clorhídrico 3 M (HCl),
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$).
- Metanol (CH_3OH).
- Acetato amónico 50 mM (NH_4OAc).
- MTBE ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$).
- Ácido fosfórico (HPO_3).
- Agua destilada.

- Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE cartridge).
- Filtros de nylon de 0.45 μm (Teknokroma, Barcelona, España).
- Patrones de miricetina, quercetina, kaempferol, isorhamnetina y luteolina procedentes de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España).
- Extractor Soxhlet
- HPLC-PDA
- Columna Sperisorb ODS-2 con un tamaño de partícula de 5 μm , 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro.

Procedimiento

Se toman 5 g de fruto y se mezclan con 200 mL de etanol/HCl 3M (70:30 v/v). Se introduce en un cartucho y se lleva a cabo la extracción en un extractor Soxhlet a 90 $^{\circ}\text{C}$ durante 2.5 horas. El extracto se enfría rápidamente, se filtra y se enrasa a 250 mL con la mezcla etanol/HCl 3M (70:30 v/v).

Posteriormente se activan los filtros de extracción en fase sólida (SPE) añadiendo 1 mL de metanol, 1 mL de agua destilada, 2 mL de metanol al 5 % en agua, y 2 mL de metanol/acetato amónico 50 mM (30:70 v/v). Se seca el filtro bajo vacío y se descarta la mezcla obtenida.

Una vez activado el cartucho, se añaden 3 mL del extracto obtenido previamente y 3 mL de MTBE/metanol (80:20 v/v). Finalmente, la elución fue reconstituida y recuperada con 1 mL de fase móvil (0.5 mL de HPO_3 al 0.5 % y 0.5 mL de metanol).

A continuación, tomamos los patrones de flavonoides y se prepara un patrón con concentraciones individuales de 10 ppm. Se analizan por HPLC mediante elución isocrática con HPO_3 al 0.5 % y MeOH (50:50 v/v). Los perfiles cromatográficos se identifican a 370 nm de longitud de onda.

Finalmente se inyecta la muestra de *Opuntia* extraída, se identifican los flavonoides de acuerdo a los tiempos de retención en comparación con los patrones, y se calcula la concentración de ellos integrando los picos de los patrones (concentración conocida) y comparándolos con los de la muestra a analizar.

3.2.4.3. Determinación de carotenoides

La extracción y determinación de carotenoides se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito previamente por *Kuti (2004)*.

Materiales

- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$).
- Acetona (CH_3COCH_3).
- Hexano ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).
- Homogeneizador Ultraturrax modelo Ika Labortechnik T-25 basic (Alemania).
- Centrífuga refrigerada Hermle Z-383-K (Wehingen, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-VIS Agilent 8453 (Waldbronn, Alemania)

Procedimiento

Se toman 5 g de fruto de *Opuntia* y se homogeneizan en el Ultraturrax. Posteriormente se lleva a cabo la extracción utilizando 25 mL de una mezcla de hexano/acetona/alcohol (50:25:25 v/v) y se mantiene en agitación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm y 10 °C. Tras la centrifugación, se recupera la epifase con los carotenoides extraídos y se

transfiere a un matraz aforado de 25 mL. Se enrasa el matraz aforado a 25 mL con hexano.

El contenido total de carotenoides se determina midiendo la absorbancia a 450 nm, y se determina el contenido en carotenoides mediante el coeficiente de extinción del β -caroteno $E_{1cm}^{1\%} = 2505$ (Rodríguez-Amaya, 2001).

3.2.5. Estudio de estabilidad al almacenamiento del extracto colorante concentrado

Como se ha comentado en el capítulo de Introducción, uno de los principales inconvenientes que poseen los colorantes alimentarios naturales, en comparación a los sintéticos, es su menor estabilidad a la temperatura y a largos periodos de almacenamiento. Es por ello, que en el presente estudio se hizo especial hincapié en analizar la estabilidad que ofrecen las betaxantinas de *Opuntia* a diferentes temperaturas y en diferentes periodos de tiempo, comparando nuestro extracto colorante con otros colorantes naturales amarillos presentes en el mercado.

Se tomaron muestras del extracto colorante obtenido y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C y a 25 °C. Una vez por semana y durante 7 semanas se analizó su espectro de absorbancia y se determinó su contenido en betaxantinas. En todos los casos los análisis se realizaron por triplicado.

La estabilidad durante el almacenamiento del extracto se expresó en términos de vida media ($t_{1/2}$), relacionando el contenido en betaxantinas de la muestra inicial (B_0) y el contenido en betaxantinas a 4 °C y 25 °C en un periodo de tiempo determinado (B_t). Se calculó la relación:

$$\ln\left(\frac{B_0}{B_t}\right)$$

y se representó gráficamente frente al tiempo de almacenamiento. En esta gráfica se observó que la degradación de la betaxantinas sigue una cinética de primer orden, con lo que se calculó el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) como el tiempo en el que el contenido en betaxantinas se reduce a la mitad.

3.2.6. Microencapsulación y atomización del extracto colorante

La estabilidad de las betalaínas en general, y de las betaxantinas en particular, se ve afectada por el pH, la actividad del agua, la exposición a la luz y al oxígeno, y a la temperatura. Se admite que la temperatura es el factor más decisivo en su degradación (*Castellar et al., 2003; Fernández-López et al., 2013; Giménez et al., 2015*). Conseguir aumentar la estabilidad de estos pigmentos es fundamental para garantizar su aplicación como colorantes alimentarios.

La estabilización de las betaxantinas puede ser mejorada mediante técnicas de microencapsulación, como el secado por atomización (spray-drying). Se define la microencapsulación como una técnica por la que una sustancia es recubierto por un biopolímero con el objetivo de protegerlo del oxígeno, agua y otras condiciones para mejorar su estabilidad (*Desai y Park, 2005*). Como agentes encapsulantes se pueden utilizar polisacáridos (almidones, maltodextrinas, goma arábica,...), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos,...) y proteínas (gelatina, caseína, suero láctico) (*Gibbs et al., 1999*).

El secado por atomización es un método físico de encapsulación que consiste, en líneas generales en atomizar un material que se encuentra en estado líquido, ya sea como disolución o como dispersión, en forma de finas gotas sobre una corriente de gas caliente. Para efectuar la encapsulación, el material de recubrimiento se disuelve en un disolvente apropiado y en esta disolución se dispersa la sustancia, sólida o líquida, que va a servir como material activo. La dispersión, se introduce en la cámara de secado con aire en contracorriente. El aire

caliente proporciona el calor de evaporación requerido para la separación del disolvente, produciéndose en esta forma la encapsulación. En el proceso de secado por atomización es muy importante escoger de manera adecuada los parámetros de caudal de aspiración, caudal de aire de atomización, caudal de alimentación y temperatura del aire de atomización, ya que estos factores influyen decisivamente en el rendimiento de atomización, así como en el tamaño de partícula obtenida y su distribución. Asimismo, también es importante elegir adecuadamente el agente encapsulante, así como su proporción en relación al material que se pretende encapsular. Dependiendo del tamaño final de las partículas obtenidas se puede hablar de microencapsulación o nanoencapsulación.

Los materiales utilizados, así como la rutina de trabajo llevada a cabo en el estudio de microencapsulación por atomización del extracto colorante, se basaron en trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación (*Obón et al., 2009*) y se resumen a continuación:

3.2.6.1. Obtención del extracto en polvo

Materiales

- Extracto colorante de betaxantinas de *Opuntia*.
- Agentes encapsulantes:
  - Maltodextrina: Glucidex 6D (Roquette Laisa, Valencia, España).
  - Fructoligosacáridos-Inulinas: Beneo HPX (Beneo, Barcelona, España); Beneo Synergy 1 (Beneo, Barcelona, España); Actilight 950 P (Bejhin-Meiji Industries, Japón); Beneo HP (Beneo, Barcelona, España); Beneo ST (Beneo, Barcelona, España); Beneo HSI (Beneo, Barcelona, España); Beneo P95 (Beneo, Barcelona, España).
- Equipo de secado por atomización (Fig. 3.12 y 3.13) mini Spray-Dryer B-290 (Büchi, Suiza).

Este último equipo está constituido por:

- 1) Entrada de aire caliente
- 2) Entrada de la corriente estabilizada en la cámara de secado y boquilla de atomización.
- 3) Cámara de secado o cilindro de pulverización ($h=50$ cm, $D=15$ cm).
- 4) Ciclón para separar el producto de la corriente de aire.
- 5) Filtro de salida.
- 6) Salida del aire de secado.

Figura 3.12. Esquema general del atomizador Mini Spray-Dryer B-290

Figura 3.13. Atomizador Mini Spray Dryer B-290

Procedimiento

- 1) Se miden los °Brix del extracto colorante y se preparan disoluciones en agua de los distintos agentes encapsulantes con idéntico contenido en sólidos solubles totales (°Brix) que el extracto de betaxantinas de *Opuntia*.
- 2) Se realizan ensayos de atomización utilizando diferentes proporciones de extracto/agente encapsulante, a fin de comprobar cómo influye la proporción de zumo/encapsulante en el producto colorante sólido (rendimiento de atomización, tamaño de partícula, mayor o menor aglomeración en las partículas, intensidad de color, etc).

En todos los ensayos las condiciones de atomización fueron las optimizadas en ensayos previos (*Obón et al., 2009*):

- Temperatura del aire de atomización: 160 °C
- Bomba de aspiración: 85 %.
- Caudal de bombeo del zumo: 30 % (5.8 mL/min).

El Mini Spray-Dryer B-290 funciona según el principio de flujo paralelo, es decir, el producto pulverizado y el aire seco caliente se desplazan en el mismo sentido. El rendimiento de evaporación del equipo está sobre 1 L/h de agua. El tiempo medio de residencia es de 1.0-1.5 segundos. Los tamaños de partícula que se obtienen están en el rango de 1-25 µm.

Las muestras de polvo obtenidas se almacenaron en placas Petri dentro de un desecador con gel de sílice anhidro. Para determinar su peso se empleó una balanza electrónica Sartorius BP 121S con resolución de décimas de miligramo.

El rendimiento del proceso de atomización en los distintos ensayos realizados se determina según:

$$\% \text{ RENDIMIENTO} = \frac{m_{\text{extracto sólido}}}{(m_{\text{zumo}} \times \text{°Brix}_{\text{zumo}}) + (m_{\text{encapsulante}} \times \text{°Brix}_{\text{encapsulante}})} \times 100$$

3.2.6.2. Análisis del extracto en polvo por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se estudiaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) los diferentes extractos en polvo obtenidos con un equipo Hitachi modelo S-3500N (Hitachi Technologies, Tokio, Japón) (Figura 3.14). Las muestras de polvo obtenidas se fijaron a una cinta adhesiva de doble cara colocada en un portamuestras.

Las muestras se metalizaron con oro durante 2 min con objeto de incrementar la conductividad, aportar estabilidad y fijar las partículas para que no oscilasen al aproximar la lente del microscopio y poder obtener imágenes de alta resolución. La distancia de la lente fue de 7 mm.

Figura 3.14. Microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3500N

Todas las imágenes se tomaron buscando un campo representativo plano de la muestra, operando a 5 kV y con magnificación de 1000 aumentos.

3.2.7. Ensayos de termosensibilidad del extracto. Comparación con otros colorantes amarillos naturales de uso alimentario

3.2.7.1. Extractos colorantes

Aparte del extracto de betaxantinas de *Opuntia*, para este ensayo se emplearon los siguientes colorantes alimentarios comerciales: luteína, β -caroteno,

riboflavina y curcumina en polvo suministrados por Proquimac Food & Pharma (Barcelona, España); también amarillo gardenia suministrado por B&K Food Manufacturng Group Co. (Xianmen, China). Se prepararon disoluciones patrón de cada colorante (1000 mg / 100 mL) en etanol/agua (3:2, v/v). En el caso de los colorantes luteína y β -caroteno, se añadieron unas gotas de acetona a la disolución para lograr la completa disolución de los colorantes. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas de cada colorante hasta alcanzar un valor de absorbancia de 0.700 ± 0.050 cada una a su longitud de onda de máxima absorbancia. Las disoluciones finales se mantuvieron en la oscuridad refrigeradas a 5 °C y se emplearon dentro de los 5 días posteriores a su preparación.

3.2.7.2. Tratamiento térmico

La estabilidad térmica de los extractos colorantes se evaluó a 30 °C, 50 °C, 70 °C y 90 °C en diferentes experimentos. Los mismos se distribuyeron en tubos de vidrio (Pobel S.A. Madrid, España) de 25 mL de capacidad con tapón roscado, se cubrieron con papel aluminio para evitar la exposición a la luz y se colocaron en el baño termostático a la temperatura de análisis requerida. A intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas se extrajeron alícuotas (3 mL) de cada uno de ellos, se sumergieron en hielo durante 5 min con objeto de detener la degradación térmica, a continuación se pasaron por un filtro de nylon de 0.45 μ m y se les registro su espectro de absorbancia entre 400 y 700 nm. Una muestra no tratada de cada uno de los extractos colorantes permitió contrastar los cambios de color experimentados durante el ensayo.

3.2.7.3. Cinética de degradación del color

La expresión general para una cinética de degradación se puede escribir como:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^m$$

Donde “A” es el valor de la propiedad considerada, “k” es la constante de velocidad, y “m” es el orden de reacción. Se admite, en general, que la pérdida de color durante el tratamiento térmico de colorantes naturales y productos que los contienen, lo que supone un orden logarítmico de degradación, que matemáticamente se puede expresar como:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -kt$$

La ecuación de Arrhenius expresa la relación entre la constante de velocidad de un proceso “k” y la temperatura absoluta “T”, según:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT}$$

Siendo “A” el valor de absorbancia residual después del proceso de tratamiento térmico, “A₀” la absorbancia inicial, “t” el tiempo de tratamiento (h), “k” la constante de velocidad (h⁻¹), “k₀” el factor de frecuencia (h⁻¹), “E_a” la energía de activación (kJ.mol⁻¹), “R” la constante universal de los gases (8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹) y “T” la temperatura absoluta (Kelvin).

Los tiempos de vida media (t_{1/2}) se determinaron representando gráficamente el logaritmo neperiano de la relación A₀/A frente al tiempo de tratamiento. La pendiente de la recta, que pasa por el origen de coordenadas, coincide con la constante de velocidad (k), a partir de la cual y mediante la expresión (t_{1/2}=ln 2/k) se obtienen los valores de t_{1/2} y sus correspondientes coeficientes de correlación. Las energías de activación de cada colorante se obtienen a partir de la ecuación de Arrhenius representando ln k frente a 1/T; la pendiente de la recta coincide con -E_a/R, relación de la que se deduce la energía de activación.

3.2.7.4. Determinaciones colorimétricas

El seguimiento de la evolución del color durante el tratamiento térmico de los colorantes investigados se realizó mediante los parámetros del espacio de color CIELAB: L^* (luminosidad), a^* (coordenada rojo-azul) y b^* (coordenada azul-amarillo), usando el iluminante estándar D_{65} y 10° de ángulo de observador.

3.2.8. Incorporación del extracto colorante en alimentos modelo

La etapa final del diseño y desarrollo de todo aditivo alimentario es su incorporación sobre alimentos debidamente seleccionados y el estudio de su comportamiento dentro de dichas matrices alimentarias.

La elección y formulación de los alimentos modelo se siguió según estudios previos de *Obón et al., (2009)* realizados con un extracto colorante obtenido de frutos de *Opuntia stricta*. Como alimentos modelo se formularon un yogur azucarado y una bebida refrescante.

3.2.8.1. Formulación de los alimentos modelo

El yogur se preparó partiendo de un preparado comercial desnatado al que se añadió 20 g/kg de sacarosa y extracto colorante. La bebida refrescante se preparó en base a una disolución acuosa de benzoato sódico (0.14 g/L), sorbato potásico (0.18 g/L), ácido ascórbico (0.02 g/L), ácido cítrico 1.52 g/L y sacarosa (86 g/L) (*Dyrby et al., 2001*). Tras su preparación la disolución se filtró asépticamente a través de un filtro de 0.20 μm de luz.

La formulación de ambos alimentos modelo se realizó en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar a fin de evitar la posible contaminación microbiológica de los mismos.

Sobre cada alimento modelo se ensayaron dos extractos colorantes en polvo, ambos procedentes de betaxantinas de *Opuntia*, pero preparados en lotes distintos.

El extracto 1 se incorporó a razón de 1.6 g/kg en el yogur y de 2.4 g/L en la bebida refrescante. La dosis de extracto 2 fue de 4.0 g/kg en el yogur y 3.2 g/L en la bebida. Estas dosis se establecieron de forma subjetiva a fin de obtener apariencia en el elaborado final similar a la presentada por los mismos alimentos disponibles en el mercado.

Los alimentos preparados se depositaron en frascos estériles y se conservaron en la oscuridad bajo refrigeración (4 °C) con seguimiento periódico del color.

3.2.8.2. Evolución objetiva del color

Con el fin de hacer un seguimiento del color en los alimentos preparados, con ayuda de un colorímetro Minolta CM 508i (Minolta Co. Ltd., Japón), se registraron las coordenadas colorimétricas L^* , a^* y b^* . Durante 4 semanas se fueron registrando las coordenadas de color y se determinó la variación de color en términos de ΔE :

$$\Delta E^* = \sqrt{(L_t^* - L_0^*)^2 + (a_t^* - a_0^*)^2 + (b_t^* - b_0^*)^2}$$

Donde L_t^* , a_t^* , b_t^* , son los valores de las coordenadas de color en el instante t , y L_0^* , a_0^* , b_0^* , son los valores de las coordenadas de color al inicio del ensayo.

Se admite que con valores de $\Delta E^* < 1$ el ser humano no es capaz de observar diferencias de color, $1 < \Delta E^* < 2$ representa una diferencia de color aceptable, y $\Delta E^* > 2$ indican una diferencia de color considerable entre dos muestras (Johnston y Kao, 1989).

Finalmente se realizó un panel de cata con tres personas con objeto de determinar la influencia del colorante añadido en el sabor del alimento.

4. Resultados y Discusión

4.1. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE PIGMENTOS

El diseño de un nuevo proceso industrial requiere una evaluación apropiada que pondere los diferentes aspectos desde los que abordar la situación de partida, estudio que redundará en el éxito definitivo del proceso. El diseño del proceso va a conllevar seguir una serie de pasos (Fig. 4.1) que, una vez superados van a traducirse en el establecimiento y desarrollo del proceso ideado.

Las etapas iniciales del procesado de frutos de *Opuntia* suponen la selección, clasificación, lavado y acondicionamiento (eliminación de gloquidios y separación de la ectodermis) para obtener el fruto pelado, listo para proceder a la obtención del extracto de pigmentos. El fruto así obtenido se homogeniza a alta velocidad como paso previo a la incorporación del extractante.

Figura 4.1. Fases en el diseño de un proceso tecnológico

La pulpa homogeneizada adicionada con el extractante se agita magnéticamente con el fin de facilitar la difusión de los pigmentos hacia la fase líquida. Se estudió la capacidad extractante del agua, etanol y agua/etanol (60:40) (v/v). Los tres extractantes seleccionados son de marcada naturaleza polar dada la hidrofobicidad de los pigmentos a extraer (betaxantinas) y la probada efectividad del agua y los alcoholes (EtOH y MeOH) en la extracción de pigmentos de naturaleza betalaínica (*Fernández-López y Almela, 2001; Castellar et al., 2003; Fernández-López et al., 2012*).

La selección del extractante adecuado es importante, no sólo porque interese lograr arrastrar la máxima cantidad de pigmentos, sino porque también es interesante minimizar en el extracto final la presencia de pectinas y mucílago, componentes habituales en los frutos de *Opuntia*, pero que van a aportar turbidez y desmerecer la calidad del extracto. Mediante los procesos de centrifugación y posterior filtrado del sobrenadante, se va a descartar el material vegetal presente inicialmente en el extracto (celulosa, pectinas y mucílago), con lo que vamos a conseguir un extracto colorante limpio.

La Tabla 4.1 presenta las principales características químicas de los extractos obtenidos en función del extractante utilizado. El pH fue similar en los tres casos, próximo a 7.0, en el rango de valores publicados (5.3–7.1) para otros frutos de *Opuntia ficus-indica* (Sáenz, 2000), lo que viene a confirmar a éstos como frutos de escasa acidez, y facilita su utilización como colorante alimentario puesto que al incorporarlo sobre alimentos como yogures, helados o mermeladas, no aportaría acidez, por lo que no modificaría el perfil organoléptico del producto al que se aplica.

El contenido total en sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) se encuentra en todos los casos en torno a 12.0, valores que son similares a los obtenidos por *Díaz Medina et al.*, (2006) y *Sáenz et al.*, (2009). Los valores de densidad obtenidos siguen un orden lógico, siendo el extracto alcohólico el menos denso, seguido del extracto hidroalcohólico y del extracto acuoso, que presenta una densidad de 1.00 g/mL igual que el agua a temperatura ambiente.

Los datos de viscosidad recopilados reflejan que el extracto hidroalcohólico es el más viscoso a temperatura ambiente (3.00 cP), seguido del extracto alcohólico (2.23 cP) y del extracto acuoso (1.36 cP). La mayor viscosidad del extracto hidroalcohólico refleja que en el proceso de extracción, pectinas y sustancias mucilaginosas presentes en el fruto se han fijado en el disolvente y aparecen presentes en el extracto colorante final. Por tanto, se confirma que con el empleo de la mezcla agua/etanol 60:40 v/v se consigue tanto una mayor extracción de los pigmentos, como de las pectinas y mucílago presentes en los frutos. El extracto acuoso presenta una viscosidad a temperatura ambiente cercana a 1.00 cP, que es la viscosidad del agua pura. Este dato refleja que mediante el empleo del agua como disolvente se consigue una menor extracción de las pectinas presentes en los frutos de *Opuntia*. A pesar de estas diferencias, los resultados de viscosidad reflejan que los tres extractos son fluidos, con una viscosidad ligeramente superior a la del agua, y que por tanto su bombeo en instalaciones, procesos de agitación y mezcla

se realizarían de manera sencilla. Por tanto, la viscosidad no es un factor limitante para utilizar cualquiera de los tres extractos como colorante alimentario.

La espectrofotometría UV/VIS se ha revelado como una de las técnicas más empleada por los investigadores para la caracterización y análisis de extractos colorantes. Mediante esta técnica es posible obtener el espectro de absorción de un colorante en el rango visible, determinando de este modo su “huella dactilar”. Este espectro de absorción no sólo depende de la naturaleza de la molécula en estudio, sino que también depende fuertemente de las interacciones disolvente-soluto (Zakerhamidi *et al.*, 2012). Por tanto, el hecho de emplear un disolvente u otro en el proceso de extracción de un pigmento puede provocar diferencias notables en su espectro de absorción. En nuestro caso, podemos concluir que la correcta elección del disolvente optimiza el proceso de extracción de los pigmentos presentes en los frutos de *Opuntia*.

La Figura 4.2 muestra la influencia del extractante en el espectro visible de absorción (350-700 nm) del extracto colorante obtenido.

Figura 4.2. Espectros de absorción de los extractos de frutos de *Opuntia ficus-indica*

En los tres casos, los máximos de absorción se sitúan en 480 nm, confirmando que absorben en la región del amarillo del espectro visible. Aun coincidentes en la longitud de onda de máxima absorción, aparecen algunas diferencias en los perfiles de los tres extractos. Los extractos alcohólico e hidroalcohólico presentan un máximo de absorción más definido, mientras que el extracto obtenido con agua alcanza un máximo más “redondeado”. Pero la diferencia más notable es sin duda los diferentes valores de los máximos de absorbancia dependiendo del disolvente utilizado, siendo la absorbancia del extracto hidroalcohólico destacadamente superior (0.7893) a la del extracto acuoso (0.7516) y alcohólico (0.6990). Esto significa que con la mezcla agua/etanol se consigue extraer mayor cantidad de betaxantinas.

A partir de los valores de absorbancia a 480 nm es posible cuantificar el contenido total en betaxantinas presente en los extractos. Esta cuantificación de betaxantinas queda referida al contenido en indicaxanteno, que es la betaxantina mayoritaria presente en los frutos de *Opuntia ficus-indica* (Fernández-López *et al.*, 2002), para lo cual se utilizó el coeficiente de extinción molar de este pigmento $\epsilon=48000 \text{ L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ (Kugler, *et al.*, 2007).

El análisis del espectro visible de los extractos sirvió como base para obtener sus coordenadas de color CIELab, siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental. De este modo se puede evaluar de un modo objetivo el color de cada uno de los extractos.

Tabla 4.1. Características químicas de los extractos colorantes

PARÁMETRO	EXTRACTANTE		
	AGUA	ETANOL	AGUA/ETANOL 60:40 (v/v)
Absorbancia (480 nm)	0.7516±0.0006	0.6990±0.0008	0.7893±0.0004
Indicaxanteno (mmol/kg fruto)	0.59±0.01	0.56±0.02	0.68±0.02
Sólidos solubles totales (°Brix)	12.1±0.1	10.8±0.2	12.0±0.2
pH	6.89±0.03	7.48±0.04	7.29±0.04
Densidad a 25 °C (g/mL)	1.00±0.01	0.85±0.02	0.93±0.02
Viscosidad a 25 °C (cP)	1.36±0.10	2.23±0.03	3.00±0.01
Viscosidad a 40 °C (cP)	1.08±0.09	1.72±0.10	1.98±0.04
COORDENADAS DE COLOR			
<i>L</i> * (luminosidad)	86.07±0.09	87.40±0.06	88.24±0.05
<i>a</i> * (rojo-verde)	5.84±0.03	-1.36±0.02	5.13±0.04
<i>b</i> * (amarillo-azul)	97.92±0.07	91.49±0.09	96.54±0.07
<i>C</i> * (cromaticidad)	98.09±0.08	91.50±0.08	96.67±0.03
<i>h</i> ^o (ángulo de color)	3.42±0.02	-0.85±0.01	3.04±0.01

Valores expresados como media ± SD de 3 determinaciones

A la vista de los resultados se observa la mayor absorbancia (0.7893) del extracto agua-etanol, que se traduce en un mayor contenido en indicaxanteno (0.68 mmol/kg de fruto), lo que significa que con el empleo de este disolvente se consigue un mayor rendimiento en la extracción de betaxantinas de los frutos. Este nivel de betaxantinas obtenido es más alto que el reportado por *Butera et al.*, (2002), y similar al contenido encontrado por *Castellanos-Santiago y Yahia (2008)* y por *Dehbi et al. (2013)* en frutos de esta misma especie.

La semejanza que presentan los perfiles de los espectros de absorción de los tres extractos, hace predecir unos valores en las coordenadas de color muy similares. Sin embargo, las ligeras diferencias comentadas anteriormente se traducen en valores diferentes de las coordenadas L^* , a^* , b^* , y por tanto en el color de los extractos. Los valores de L^* (luminosidad) son similares en los tres casos; sin embargo aparecen diferencias más notables en las coordenadas colorimétricas a^* y b^* . Los extractos hidroalcohólico y acuoso presentan un valor en la coordenada b^* notablemente superior al del extracto alcohólico, revelando que el color amarillo es más intenso en estos dos extractos. Esto también queda reflejado en la mayor absorbancia que presentan estos dos extractos a 480 nm, que es la longitud de onda del color amarillo dentro del espectro visible. Los extractos hidroalcohólico y acuoso también presentan un valor en la coordenada a^* notablemente superior al del extracto alcohólico. Por tanto, al tener estos dos extractos mayor intensidad de color en la región del rojo y del amarillo, el color de ambos es más anaranjado que el del extracto alcohólico.

Tras analizar estos resultados, se concluye que el etanol es el extractante que ofrece los resultados menos satisfactorios en cuanto a color y contenido en betaxantinas.

Al comparar los extractos acuoso e hidroalcohólico es éste último el que logra extraer un 15 % más de pigmentos (0.68 mmol/kg frente a 0.59 mmol/kg). También es el extracto hidroalcohólico el que presenta mayor luminosidad. El único parámetro en contra es la viscosidad, ligeramente superior a la presentada por los extractos etanólico y acuoso, no obstante consideramos los valores a 25 y 40 °C como aceptables y no creemos que éste vaya a ser un factor determinante que dificulte su potencial empleo.

Estos resultados hacen que sea el extracto hidroalcohólico el que se considere más interesante para ensayos posteriores de concentración y purificación.

4.2. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PIGMENTOS POR HPLC

Mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es posible obtener el perfil cromatográfico del potencial extracto colorante seleccionado. Este perfil cromatográfico es característico de cada especie y permite identificar los pigmentos presentes en ellos. En nuestro caso, el estudio cromatográfico se ha compuesto de dos etapas: en primer lugar la obtención del perfil cromatográfico del extracto elegido como más óptimo, el hidroalcohólico, mediante detección por fotodiodos (HPLC-PDA); y una segunda etapa en la que hemos identificado los pigmentos presentes de acuerdo con su espectro de masas (HPLC-MS-PDA).

Para la identificación de las diferentes betaxantinas detectadas se ha tenido el ion molecular de cada una de ellas, así como los tiempos de retención obtenidos tanto por el detector PDA como por el MS. Finalmente, se ha elaborado una tabla en la que se resumen las betaxantinas identificadas (Tabla 4.2).

El detector de fotodiodos (PDA) permite registrar en continuo el espectro de absorción (en el intervalo de longitudes de onda seleccionado), lo que posibilita de forma bastante aproximada una primera identificación de los picos presentes en el cromatograma, su identificación inequívoca se consigue analizando el espectro de masas de cada pico y también siguiendo en el detector de masas el ion molecular (SIR) correspondiente a cada pigmento seleccionado.

La Fig. 4.3 presenta el espectro de bandas (isograma) y el cromatograma, registrado a 480 nm, del extracto colorante obtenido. La simetría de bandas en el isograma viene a corroborar la pureza de los picos, informándonos de que la separación cromatográfica de los mismos es óptima. Esto también prueba que el gradiente de elución empleado es correcto y permite la resolución de todos los pigmentos presentes.

Figura 4.3. Isograma (arriba) y cromatograma registrado a 480 nm (abajo) del extracto colorante obtenido

Según muestra la Fig. 4.3 se observan siete bandas cromatográficas, seis de las cuales presentan su máximo de absorbancia entre los 470-480 nm, se trata por tanto de betaxantinas, mientras que la restante, la banda 6, tiene su máximo de absorción alrededor de los 535 nm, prueba de que se trata de una betacianina.

El análisis de los cromatogramas obtenidos también revela, desde el punto de vista cuantitativo, que son, con mucho, las betaxantinas los pigmentos más abundantes, destacando la banda 5 como mayoritaria entre todas las presentes.

El análisis mediante HPLC-MS permite la identificación de cada una de las bandas cromatográficas, identificación que se efectúa, tanto en base al análisis de sus espectros de masas, como mediante el seguimiento del ion molecular ($[M+H]^+$), de cada betaxantina. Así pudieron identificarse todos los picos según se muestra en las Figuras 4.4 a 4.10.

El seguimiento del ion molecular 349, correspondiente a la muscaarina VII (histidina-betaxantina), registra un cromatograma cuyo único pico presenta un tiempo de retención de 4.48 min, idéntico al presentado por el pico 1 en la Fig. 4.3, lo que confirmaría la naturaleza de éste.

Figura 4.4.: Seguimiento (SIR) del ion molecular 349 correspondiente a la muscaarina VII

El pico 2, con tiempo de retención de 6.12 min, fue identificado como vulgaxantina I (glutamina-betaxantina) tras comprobar que el seguimiento de su ion molecular, con relación m/z de 340, reproducido en la Fig. 4.5, generó un cromatograma con un único pico, a idéntico tiempo de retención de 6.12 min.

Figura 4.5. Seguimiento (SIR) del ion molecular 340 correspondiente a la vulgaxantina I

De un modo análogo se identificaron el resto de picos cromatográficos. El pico 3 como miraxantina V (dopamina-betaxantina) con m/z igual a 347 (Fig. 4.6). El pico 4 como ácido γ -amino butírico-betaxantina (GABA-betaxantina), con relación m/z de 297 (Fig. 4.7). El pico 5 como indicaxanteno (prolina-betaxantina) con relación m/z de 309 (Fig. 4.8). El pico 6 como betanina con relación m/z de 552 (Fig. 4.9). Por último, el pico 7, con tiempo de retención de 13.90 min corresponde a la metionina-betaxantina, con relación m/z de 343 (Fig. 4.10).

Figura 4.6. Seguimiento (SIR) del ion molecular 347 correspondiente a la miraxantina V

Figura 4.7. Seguimiento (SIR) del ion molecular 297 correspondiente a la GABA-betaxantina

Figura 4.8. Seguimiento (SIR) del ion molecular 309 correspondiente al indicaxanteno

Figura 4.9. Seguimiento (SIR) del ion molecular 552 correspondiente a la betanina

Figura 4.10. Seguimiento (SIR) del ion molecular 343 correspondiente a la metionina-betaxantina

En la Tabla 4.2 se resumen las características químicas más importantes de los pigmentos mayoritarios identificados en el extracto colorante.

Tabla 4.2. Pigmentos identificados en el extracto colorante de frutos de *Opuntia*

PIGMENTO	m/z [M+H] ⁺	Fórmula molecular	$\lambda_{\max}$ (nm)
BETAXANTINAS			
Muscaaurina VII	349	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₆	476
Vulgaxantina I	340	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₇	472
Miraxantina V	347	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	475
GABA-betaxantina	297	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	462
Indicaxanteno	309	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆	480
Metionina-betaxantina	343	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₆ S	477
BETACIANINAS			
Betanina	552	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	535

De entre todos los pigmentos presentes, es el indicaxanteno el mayoritario, y de acuerdo con el área de los picos del cromatograma, supone el 88 % del total de pigmentos presentes en el extracto. Muscaaurina VII y metionina-betaxantina son los siguientes en importancia, pero en ningún caso su presencia relativa llega a alcanzar el 6%.

La mayoría de los pigmentos identificados están reportados en la bibliografía como presentes en diferentes especies de *Opuntia*. Indicaxanteno es el más representativo y toma su nombre por ser el más común en la especie *Opuntia ficus-indica* (Stintzing et al., 2001; Butera et al., 2002; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008). Muscaaurina VII está presente en frutos de *O. robusta*, *O. ficus-indica*, *O. megacantha* y *O. streptacantha* (Stintzing et al., 2005; Castellanos y Yahia, 2008).

Vulgaxantina I, aparte de ser característico de la especie *Beta vulgaris*, también ha sido identificado en frutos de *O. robusta*, *O. ficus-indica* y *O. streptacantha* (Stintzing et al., 2005; El-Mostafa et al., 2014). Miraxantina V es una betaxantina típica en flores de *Mirabilis jalapa* y su descripción en frutos de *Opuntia* es novedosa (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013). GABA-betaxantina también está entre las betaxantinas frecuentemente descrita en frutos de *Opuntia* spp. (Stintzing et al., 2005; El-Mostafa et al., 2014). Metionina-betaxantina también está reportada como presente en diversos clones de especies de *O. ficus-indica* (Stintzing et al., 2005).

Además de las betaxantinas ya comentadas, en el extracto colorante también se detecta la presencia de betanina, la más común de la betacianinas presentes en la naturaleza. Esto viene a confirmar que a pesar de haber seleccionado para nuestra investigación frutos de intensa coloración amarilla, en éstos, coexisten ambas familias de pigmentos, hecho ya reportado en estudios previos (Fernández-López y Almela, 2001; Fernández-López et al., 2002; Stintzing et al., 2005).

Las Figuras 4.11 y 4.12 presentan las estructuras químicas de los diversos pigmentos identificados en el extracto colorante de frutos de *Opuntia*.

Figura 4.11. Betaxantinas identificadas en el extracto hidroalcohólico de frutos de *Opuntia*

Figura 4.12. Betanina identificada en el extracto hidroalcohólico de frutos de *Opuntia*

4.3. OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO CONCENTRADO DE PIGMENTOS. CARACTERIZACIÓN

En el mercado de los colorantes la intensidad de color es una de las características determinantes por las que van a ser evaluados. El que en una mínima cantidad del mismo se acumule un alto potencial colorante va a ser un factor clave a la hora de juzgar su proyección tecnológica y ampliar sus posibilidades de éxito comercial.

Del estudio y caracterización de los extractos colorantes obtenidos a partir de frutos de *Opuntia* se ha llegado a la conclusión que, de acuerdo a sus características químicas, especialmente su contenido en pigmentos, el extracto hidroalcohólico, es el más adecuado para su potencial empleo como colorante alimentario natural. Aunque los tres extractantes ensayados presentaban un comportamiento bastante similar, el mayor contenido en betaxantinas y su mayor tono amarillo nos hacen prever que el poder colorante del extracto hidroalcohólico, junto a su estabilidad, son los óptimos en comparación a los otros dos disolventes ensayados.

Así, el siguiente paso es la concentración y purificación de este extracto hidroalcohólico para incrementar su contenido relativo en pigmentos. Mediante evaporación rotativa a presión reducida se va a eliminar parte del extractante sin afectar la estabilidad de los pigmentos. Tras la concentración del extracto, se va a realizar una caracterización, y un análisis y comparación de resultados del extracto concentrado y del extracto diluido. Esto nos va a permitir estudiar la viabilidad del proceso de concentración, ya que la mayoría de los colorantes naturales presentes en el mercado se comercializan en la forma de zumos concentrados, o en la forma de colorante en polvo. Por tanto, se va a determinar si durante el proceso de concentración se produce una degradación de los pigmentos presentes o variaciones de sus características físico-químicas originales.

Se trabaja a 6 kPa de presión (aproximadamente 0.06 atm), esta presión tan reducida permite evaporar todo el etanol presente y parte del agua del extracto, aun trabajando a baja temperatura (35 °C). No es conveniente superar esta temperatura porque los pigmentos naturales suelen degradarse a temperaturas altas y esto sería una grave inconveniencia en nuestro fin último.

La importancia de obtener un extracto concentrado es reducir la actividad del agua en el producto final lo que a permitir incrementar la estabilidad de los pigmentos y minimizar el riesgo de contaminación microbiana, lo que va a suponer aumentar el tiempo de vida útil del extracto colorante.

La Fig. 4.13 presenta el diagrama de flujo que describe el proceso de extracción completo, partiendo de los frutos de *Opuntia* hasta llegar al extracto colorante concentrado. El proceso completo comprende las etapas de: selección, clasificación, lavado, eliminación de gloquídios y pelado, englobados conjuntamente como acondicionamiento del fruto, tras los cuales se procede a la extracción y concentración de pigmentos.

Durante el proceso se generan como subproductos la ectodermis de los frutos, el botón depositado durante la centrifugación y la mezcla hidroalcohólica generada en el proceso de evaporación rotativa. La ectodermis constituye entre el 42-48% del peso del fruto, y entre sus componentes destacan celulosa, glucosa y proteínas. En la bibliografía se pueden encontrar diversos usos potenciales de la ectodermis, entre los que destaca su empleo como bioadsorbente, útil para la eliminación de metales pesados presentes en efluentes acuosos (Barrera *et al.*, 2006; Fernández-López *et al.*, 2014). El botón con los residuos sólidos depositados tras la centrifugación viene a representar un 10-12 % de la pulpa extraída y está compuesto esencialmente por fibras vegetales, mucílago y las semillas que acompañan al fruto. Tanto los polisacáridos como las semillas pueden tener un uso potencial como coproductos en la industria alimentaria. Destaca el uso del aceite de semillas de higo chumbo tanto en la industria farmacéutica como en la alimentaria (El-Mannoubi *et al.*, 2009).

Figura 4.13. Diagrama de flujo con el proceso de obtención del extracto colorante a partir de frutos de *Opuntia*

Por último, el residuo líquido (alcohol y agua) generado durante el proceso de concentración siempre puede ser destilado con objeto de recuperar el etanol presente y así disminuir el volumen de efluente líquido generado y reducir los costes de tratamiento de los residuos.

El análisis del extracto colorante concentrado (Tabla 4.3) permitió su caracterización y evaluar los cambios experimentados durante el proceso de evaporación rotativa. Lo más destacable es que la capacidad colorante del extracto se incrementa proporcionalmente al factor de concentración sin que el resto de parámetros evaluados se vean notablemente influenciados.

Tabla 4.3. Análisis físico-químico del extracto colorante concentrado

PARÁMETRO	EXTRACTO CONCENTRADO
Absorbancia (a 480 nm) disolución al 1%	0.1764±0.0200
Contenido en betaxantinas (g/L)	0.27±0.01
Sólidos solubles totales (°Brix)	37.6±0.9
pH	5.83±0.04
Acidez (mmol ácido cítrico/L)	10.90±2.50
Densidad a 25 °C (g/mL)	1.04±0.04
Viscosidad a 25 °C (cP)	1.40±0.05
Viscosidad a 40 °C (cP)	0.96±0.06
COORDENADAS DE COLOR	
<i>L</i> * (luminosidad)	92.72±0.06
<i>a</i> * (rojo-verde)	-0.78±0.02
<i>b</i> * (amarillo-azul)	68.49±0.07
<i>C</i> * (cromaticidad)	68.49±0.07
<i>h</i> ^o (ángulo de tono)	-0.66±0.01

Valores expresados como media ± SD de 3 determinaciones

Con respecto a la evolución de los parámetros de color, es significativo el ligero incremento de la luminosidad, y la disminución experimentada por los parámetros a^* y b^* , lo que a efectos prácticos se traduce en una mayor fortaleza del color amarillo del extracto, tendiendo hacia tonos algo más anaranjados.

Si se vuelve a diluir el extracto concentrado en la misma mezcla hidroalcohólica y se compara su espectro visible de absorción con el del extracto diluido inicial (Fig. 4.14) se puede observar que los espectros de ambos son prácticamente superponibles, lo que viene a indicarnos que el proceso de concentración no ha influido en el perfil de pigmentos del extracto, no ha existido degradación durante el mismo.

Figura 4.14. Espectros de absorción de los extractos inicial y concentrado

A la vista de los resultados se observa que el perfil de absorción de los espectros es muy similar antes y después de la concentración. Los valores de absorción varían a consecuencia del diferente factor de dilución aplicado a los

extractos para tratar de ajustar la absorbancia máxima en torno a 1. Sin embargo, el máximo de absorbancia se alcanza en ambos casos a la misma longitud de onda (480 nm) y el perfil de absorbancia sigue exactamente el mismo patrón. Por tanto se concluye que la concentración del extracto colorante elegido no provoca desplazamiento del perfil de absorbancia a longitudes de onda diferentes en comparación al extracto original. Se puede decir por ello que el extracto concentrado sigue manteniendo la misma identidad que el extracto original diluido.

La densidad del colorante ha aumentado ligeramente tras el proceso de concentración. Se trata de una consecuencia predecible, ya que durante la concentración a baja presión se consigue la evaporación y destilación del disolvente más volátil, que en este caso es el etanol, quedando el zumo colorante enriquecido en el disolvente menos volátil, que en este caso es el agua. Por tanto, es lógico que el extracto colorante concentrado tenga una densidad muy similar a la del agua. En concreto la densidad del producto final ha quedado en 1.04 g/mL.

Una propiedad muy importante que debe ser tenida en cuenta en la fabricación y manipulación de todo colorante es la viscosidad. Al comparar los datos de viscosidad de los extractos antes y después de su concentración, se observa como la viscosidad se reduce a prácticamente la mitad. Al contrario de lo que se podría esperar, la viscosidad del extracto concentrado es notablemente menor al del producto inicial. Sin embargo, el análisis detallado de la Tabla 4.1 explica este comportamiento. En ella se puede apreciar cómo el empleo de etanol como disolvente aumenta notablemente la viscosidad del extracto colorante en comparación con el extracto acuoso. Como se ha comentado antes, durante la concentración se consigue purificar el zumo colorante, retirando el disolvente más volátil, es decir el etanol. Es por ello por lo que la viscosidad después de concentrar es inferior a la del extracto diluido. En efecto, el colorante concentrado presenta una viscosidad muy similar a la del extracto acuoso diluido: 1.40 cP a 25 °C frente a 1.36 cP del extracto acuoso diluido; y 0.96 cP a 40 °C frente a 1.08 del extracto acuoso. Por tanto, el extracto concentrado en betaxantinas presenta una viscosidad

en torno a 1 cP, que es la viscosidad del agua a temperatura ambiente. Se trata de una viscosidad óptima para el bombeo y manipulación del colorante al no provocar problemas de sobrepresión ni dificultad en el pesaje del colorante previo a su aplicación en un alimento.

El análisis cromatográfico por HPLC del extracto concentrado reveló un perfil bastante similar al del extracto colorante inicial (Fig. 4.15). Es destacable que en este cromatograma se identifican dos nuevas betaxantinas, las reseñadas ahora con los números 2 y 5, y que aparecen con tiempos de retención de 4.6 y 7.3 min, respectivamente.

Figura 4.15. Isograma (arriba) y cromatograma registrado 480 nm del extracto colorante concentrado de frutos de *Opuntia*

Al analizar sus características espectrales se comprueba que el pico 2 tiene su longitud de onda de absorbancia máxima a los 472 nm mientras la relación m/z de su ion molecular es de 299, a partir de estos datos y comparando con otros

resultados reportados en la bibliografía (Stintzing *et al.*, 2005; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008; El-Mostafa *et al.*, 2014), este nuevo pico 2 se identificó como serina-betaxantina. Con los datos de longitud de onda de máxima absorbancia del pico 5 (474 nm) y relación m/z de su ion molecular (341) y comparando con otros perfiles de betaxantinas identificados en diversas especies de *Opuntia*, publicados previamente, este pico se identificó como vulgaxantina II (ácido glutámico-betaxantina) (Stintzing *et al.*, 2005; Castellanos-Santiago y Yahia, 2008; El-Mostafa *et al.*, 2014).

Las Figuras 4.16 y 4.17 muestran los cromatogramas SIR correspondientes al seguimiento de los iones moleculares 299 y 341, que permitieron la identificación de la serina-betaxantina y la vulgaxantina II.

Figura 4.16. Seguimiento (SIR) del ion molecular 299 correspondiente a la serina-betaxantina

Figura 4.17. Seguimiento (SIR) del ion molecular 299 correspondiente a la vulgaxantina II

Tras estas dos nuevas identificaciones, el perfil completo de las betaxantinas presentes en el extracto concentrado de frutos de *Opuntia* se muestra en la Tabla 4.4, en la que aparecen los datos correspondientes a las 8 betaxantinas detectadas, así como el de la única betacianina presente.

A la vista de estos resultados se concluye que en el extracto concentrado de frutos de *Opuntia ficus-indica* se han identificado diversas betaxantinas: indicaxanteno, miraxantina V, muscaarina VII, vulgaxantina I, vulgaxantina II, GABA-betaxantina, metionina-betaxantina y serina-betaxantina. Como era de prever, el indicaxanteno es, con mucho, la betaxantina mayoritaria presente, lo que queda demostrado en la mayor intensidad obtenida en el espectro de masas, así como su mayor pico de absorción a 480 nm en el cromatograma general. Sin embargo, queda también demostrado que nuestro extracto colorante concentrado es también muy rico en otras betaxantinas, como muscaarina VII y miraxantina V. También se ha detectado la presencia de betanina en frutos de coloración amarilla a pesar de ser ésta una betacianina, lo que confirma la coexistencia de ambos grupos de betalaínas aun tratándose de frutos de coloración amarilla intensa.

Tabla 4.4. Pigmentos identificados en el extracto concentrado de frutos de *Opuntia*

PIGMENTO	m/z [M+H] ⁺	Fórmula molecular	$\lambda_{\max}$ (nm)
BETAXANTINAS			
Muscaaurina VII	349	C ₁₅ H ₁₆ N ₄ O ₆	476
Serina-betaxantina	299	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₇	472
Vulgaxantina I	340	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₇	472
Miraxantina V	347	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	475
Vulgaxantina II	341	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₈	474
GABA-betaxantina	297	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	462
Indicaxanteno	309	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆	480
Metionina-betaxantina	343	C ₁₄ H ₁₉ N ₂ O ₆ S	477
BETACIANINAS			
Betanina	552	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃	535

De las 9 betalaínas identificadas 8 habían sido ya descritas por *Kugler et al., 2007*, y por *Castellanos-Santiago y Yahia, 2008*. Únicamente la miraxantina V ha sido detectada en nuestro extracto colorante y no se ha encontrado referencia de haber sido identificada con anterioridad en frutos de *Opuntia*. Por tanto, los resultados obtenidos son prometedores, ya que confirman que nuestro extracto colorante es rico en numerosas betaxantinas.

Analizando en detalle el cromatograma general del extracto concentrado (Fig. 4.15) se observan unos picos minoritarios y no bien definidos con tiempos de retención en torno a 19 y 21 minutos. A pesar de su escasa intensidad se ha intentado su identificación pero no ha sido posible ni siquiera una caracterización preliminar de los mismos.

Figura 4.18. Estructura de las nuevas betaxantinas identificadas en el extracto colorante concentrado de frutos de *Opuntia*

4.4. ANÁLISIS DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Los antioxidantes naturales presentes en plantas y frutas desarrollan un sistema de defensa endógeno que las protege de agentes externos (*de Almeida Lopes et al., 2012*). Epidemiológicamente se ha observado que una dieta rica en alimentos de origen vegetal puede reducir el riesgo de algunas enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (enfermedad coronaria, infarto cerebral, obesidad, algunos cánceres, o enfermedades neurodegenerativas). Aparte de los nutrientes, los alimentos de origen vegetal poseen una plétora de componentes bioactivos responsables de este efecto protector. Por todo ello, y por el creciente interés de la sociedad por los alimentos con efectos beneficiosos para la salud y con propiedades antioxidantes, se ha analizado los niveles de determinadas sustancias bioactivas (carotenoides, flavonoides y fenoles totales) en los extractos de frutos de *Opuntia ficus-indica*, los cuales han servido de base en la obtención de un extracto colorante rico en betaxantinas.

4.4.1. Determinación de carotenoides

Los carotenoides están ampliamente distribuidos entre todos los frutos de la naturaleza y a la vez que los hacen atractivos por su color, también les proporcionan un valor nutritivo adicional por sus importantes propiedades antioxidantes (*Kuti, 2004*).

Los frutos de *Opuntia* no destacan por su gran contenido en carotenoides. Su color se debe fundamentalmente a la presencia de betalaínas que son las que les aportan sus llamativos tonos amarillo-anaranjado-rojizos dependiendo de la especie a cultivar de que se trate. No obstante, no debe obviarse su presencia a la hora de determinar los niveles de sustancias bioactivas en estos frutos.

Dadas sus características lipofílicas, para su extracción se hace necesario el empleo de un disolvente (o mezcla de ellos) de marcada naturaleza apolar. En nuestro caso, la mezcla hexano/acetona/EtOH permitió obtener un extracto limpio y claro que contenía los carotenoides presentes en el fruto.

Figura 4.19. Espectro de absorción del extracto de carotenoides de *Opuntia ficus-indica*

En la Fig. 4.19 se muestra el espectro de absorción (350-700 nm) del extracto obtenido con los carotenoides presentes en los frutos de *Opuntia*. La absorbancia que tiene lugar en la región del espectro comprendida entre los 400 y 500 nm es responsabilidad directa de la presencia de carotenoides en el extracto. También se puede observar la presencia de clorofilas, responsables del pico de absorbancia que se produce alrededor de los 660 nm.

La cuantificación del total de carotenoides presentes se suele hacer en función del mayoritario, en este caso el β -caroteno (Kuti, 2004; Tesoriere et al., 2005), empleando el coeficiente de extinción reportado en la bibliografía (Rodríguez-Amaya, 2001). En la Tabla 4.5 se presentan los datos obtenidos.

Tabla 4.5. Contenido en carotenoides y fenoles totales en frutos de *Opuntia ficus-indica*

	CAROTENOIDES (μg de β -Caroteno/g fruto)	FENOLES TOTALES (mg GAE/100 g fruto)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	0.921 $\pm$ 0.08	92.48 $\pm$ 0.20

Media $\pm$ SD de 3 determinaciones

Como ya hemos comentado, los frutos de *Opuntia* no destacan por su contenido en carotenoides. Los resultados obtenidos lo confirman (0.92 $\mu\text{g/g}$) y son similares a los reportados por Atef *et al.*, (2013), con valores de 0.91 μg de β -caroteno por g de fruto fresco, y ligeramente inferiores a los obtenidos por Yahia y Candelario-Mondragón (2011) que rondan los 2.0 $\mu\text{g/g}$. En frutos rojos de *Opuntia stricta* y *Opuntia undulata*, los niveles de carotenoides son algo superiores, llegando hasta los 6 $\mu\text{g/g}$ (Fernández-López *et al.*, 2010). Los nutricionistas recomiendan el consumo de frutos ricos en carotenoides para combatir el estrés oxidativo de las células (Rao y Rao, 2007) y, desde este punto de vista, aunque los frutos de *Opuntia* no estén considerados una importante fuente de carotenoides, siempre van a contribuir a incrementar el nivel de los mismos en la dieta.

4.4.2. Determinación de fenoles totales

Se asume que una de las formas de protección frente a la oxidación por los radicales libres es la ingestión de sustancias que sean capaces de captarlos y neutralizarlos. Estas sustancias se conocen genéricamente como antioxidantes y se ingieren habitualmente en la dieta. Hay muchos tipos de antioxidantes naturales en los alimentos. Un grupo especial de antioxidantes naturales muy importante son los polifenoles. Estas sustancias, como su nombre indica, contienen dos o más grupos fenólicos en su molécula.

Los compuestos fenólicos se consideran atrapadores de radicales libres. Su modo de reacción es el que muestra la Fig. 4.20. En esta reacción el fenol se oxida a quinona y después a peróxido ($-OOR$). Cuando el peróxido se forma en una biomolécula, esta pierde su función fisiológica y ello puede provocar daños serios en el funcionamiento de células y tejidos. De ahí la importancia de la ingesta de sustancias antioxidantes para que sean ellas las que neutralicen los radicales libres y eviten la reacción de éstos con las biomoléculas.

Figura 4.20. Mecanismo de reacción entre polifenoles y radicales libres

Los fenoles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu dando un color azul característico. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con restos fenólicos presentes en el medio. El ácido fosfomolibdowolfrámico (formado por las dos sales en el medio ácido), es de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de fenoles presentes, y que determinada su absorbancia a 760 nm y comparada con la de una recta de calibración obtenida con cantidades conocidas de ácido gálico, va a permitir la cuantificación de fenoles en nuestro extracto.

En los frutos de *Opuntia* analizados el contenido fue de 92.48 mg/100 g (Tabla 4.5). El resultado está en el mismo rango de valores publicados para frutos de

Opuntia amarillos (Díaz-Medina et al., 2007; El-Mostafa et al., 2014; Albano et al., 2015) y es algo inferior a los valores reportados para frutos rojos (Fernández-López et al., 2010), que puede llegar a superar los 220 mg/100 g. Esto viene a confirmar el mayor poder antioxidante de las betacianinas frente a las betaxantinas. Si comparamos con el contenido de fenoles totales en otros frutos, los frutos amarillos de *Opuntia* presentan valores superiores a los reportados para otras frutas como melocotón, nectarina o ciruela, mientras su contenido es bastante inferior al de frutos rojos característicos como fresa, grosella o arándanos (Gil et al., 2002).

4.4.3. Determinación de flavonoides

Los flavonoides son un grupo diverso de polifenoles presentes en el reino vegetal, que a veces contribuyen a la coloración característica de determinadas frutas y verduras, con diferentes efectos biosaludables. El organismo humano no puede producirlos, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Aherne y O'Brien, 2002).

Algunos estudios han reportado la presencia de determinados flavonoides en frutos de *Opuntia*. Así, Kuti (2004), Moussa-Ayoub et al., (2011) y Yedes et al., (2013) detectaron la presencia de miricetina, quercetina, kaempferol, isorhamnetina y luteolina en estos frutos, aunque algunos de ellos en niveles de trazas.

A raíz de estos estudios previos preparamos un patrón con esos cinco flavonoides y se optimizó un método cromatográfico por HPLC para su análisis en los frutos de *Opuntia ficus-indica* después de su hidrólisis ácida en caliente y posterior extracción en fase sólida (SPE).

La Fig. 4.21 presenta el cromatograma patrón (320 nm) obtenido con los cinco flavonoides seleccionados. Se observa la buena resolución de las bandas, simetría de picos y la estabilidad de la línea base. La identificación de las bandas es la reflejada en la Tabla 4.6.

Figura 4.21. Cromatograma patrón de flavonoides

Tabla 4.6. Flavonoides identificados en el cromatograma patrón

PICO	FLAVONOIDE	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)
1	Miricetina	7.12
2	Quercetina	13.60
3	Luteolina	16.84
4	Kaempferol	25.03
5	Isorhamnetina	27.37

El cromatograma obtenido del extracto de frutos de *Opuntia* analizados es el mostrado en la Fig. 4.22 donde se observa que solo se detecta la presencia de miricetina (pico 1) e isorhamnetina (pico 5), ambos en escasa concentración.

Figura 4.22. Cromatograma del extracto de flavonoides en frutos de *Opuntia*

Comparando y cuantificando con respecto al cromatograma patrón se comprueba que la presencia de flavonoides en los frutos analizados es minoritaria (Tabla 4.7) y solamente se detecta la presencia de miricetina (0.46 mg/100 g) e isorhamnetina (0.36 mg/100 g), lo que representa un total de 0.82 mg/100 g. Estos valores son superiores a los reportados por *Moussa-Ayoub et al., (2011)* en frutos de la misma especie (0.17 mg/100 g), y se quedan por debajo de los valores detectados por *Yeddes et al., (2013)*, que pueden llegar hasta los 40 mg/100 g.

Tabla 4.7. Flavonoides en frutos amarillos de *Opuntia ficus-indica*

PICO	FLAVONOIDE	CONCENTRACIÓN (mg/100 g fruto)
1	Miricetina	0.46
5	Isorhamnetina	0.36

En frutos rojos de *O. stricta*, *O. undulata* y *O. ficus-indica* también se han obtenido valores más altos (Fernández-López et al., 2010). Esta disparidad en los resultados puede ser fruto tanto del método analítico empleado como del modo en que los frutos sean procesados. No es lo mismo emplear un método espectrofotométrico, que directamente nos va a dar un dato de flavonoides totales que reaccionan con un determinado reactivo, que emplear un método cromatográfico con el que se analiza la presencia de flavonoides individuales y el total se obtiene como la suma de estos. Con respecto al método de procesamiento del fruto, conviene resaltar que a veces se dan datos de frutos enteros, sin la eliminación de la ectodermis, y está admitido que muchas sustancias fenólicas tienden a acumularse en las partes más externas de los frutos con objeto de potenciar su función fisiológica protectora contra la radiación UV, atraer mejor a especies animales polinizadoras y dispersantes de semillas y ejercer como defensores químicos frente a patógenos y depredadores (Toor y Savage, 2005).

4.5. ESTABILIDAD AL ALMACENAMIENTO DEL EXTRACTO COLORANTE CONCENTRADO

En los últimos años la principal tendencia en colorantes ha sido la sustitución de sintéticos por naturales y ésta continúa siendo la inclinación en la actualidad, si bien, las líneas de investigación de las compañías proveedoras se dirigen a conseguir colorantes naturales saludables y que proporcionen mayor estabilidad y una intensidad y brillo iguales a las de los sintéticos, sin necesidad de incrementar las dosis.

La termolabilidad y la fotosensibilidad son probablemente los principales inconvenientes que limitan el uso y manipulación de los colorantes alimentarios naturales. Desde el punto de vista técnico, en el desarrollo de todo aditivo alimentario deben quedar claras las condiciones de almacenamiento, utilización y manipulación. En el caso de los colorantes, es su estabilidad la que va a determinar su proyección tecnológica y la que posibilite, en gran medida, su aceptación o no en el mercado.

En general, los colorantes son bastante estables y se conservan y almacenan sin presentar problemas importantes. No obstante, siempre es interesante conocer los datos concretos de un colorante determinado con objeto de evitar situaciones que puedan desfavorecer su estabilidad y lleguen a desmerecer la calidad del elaborado final.

En nuestro caso se ha pretendido conocer el comportamiento del extracto concentrado de *Opuntia ficus-indica* bajo dos condiciones de almacenamiento prolongadas: bajo refrigeración a 4 °C y a temperatura ambiente a 25 °C, en ambos casos protegido de la luz. Con esto se pretende conocer si nuestro extracto colorante, en caso de ser comercializado, qué condiciones de almacenamiento serían las adecuadas, y durante cuánto tiempo mantendría una concentración de pigmentos aceptable.

Los datos de estabilidad obtenidos se han modelizado ajustando el proceso degradativo a modelos cinéticos clásicos. En general se acepta que la degradación del color en extractos naturales se adecúa bien a cinéticas de pseudo primer orden (Castellar *et al.*, 2006; Fernández-López *et al.*, 2012). La estabilidad se suele expresar según el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) calculado mediante la regresión lineal del $\ln$ del % de absorbancia remanente frente al tiempo de almacenamiento.

Los datos obtenidos van a permitir predecir la estabilidad des extracto colorante y conocer parámetros como la constante de velocidad del proceso y $t_{1/2}$ del colorante a cada temperatura.

Fig 4.23. Estabilidad al almacenamiento en la oscuridad del extracto colorante de frutos de *Opuntia*

Muestras seleccionadas del extracto colorante se almacenaron en la oscuridad a temperatura controlada (4 °C y 25 °C) durante siete semanas. De forma periódica se fue evaluando espectrofotométricamente el nivel de betaxantinas totales remanentes en el extracto. La Fig. 4.23 presenta los resultados obtenidos. Al final del ensayo el extracto almacenado a 4 °C mantenía el 77 % del contenido

inicial de pigmentos, mientras que la muestra mantenida a 25 °C había experimentado una importante degradación y solo conservaba el 8 % de los pigmentos de partida.

A la vista de los resultados es manifiesta la influencia que ejerce la temperatura en la degradación del colorante. El proceso degradativo se puede ajustar a cinéticas de pseudo primer orden en ambos casos- Obtenidos los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) del colorante a cada una de las temperaturas analizadas se comprueba que bajo refrigeración (4 °C) asciende a 111 días, mientras que a 25 °C disminuye bastante quedando únicamente en 15 días. Es obvia la necesidad de almacenamiento a baja temperatura para que se preserven las propiedades colorantes durante un tiempo prolongado.

Almacenado bajo refrigeración, el extracto colorante de frutos de *Opuntia* presenta unas características óptimas que se mantienen durante un periodo suficiente. Su empleo en formulaciones alimentarias va a asegurar la funcionalidad del producto elaborado final.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos con un extracto colorante de betacianinas, conservado a idénticas temperaturas, también obtenido de frutos de *Opuntia*, se puede comprobar la mayor estabilidad de los pigmentos rojos frente a los amarillos (Castellar *et al.*, 2006).

Es de reseñar que estos resultados de estabilidad al almacenamiento corresponden a los obtenidos para extractos colorantes “crudos” exentos de cualquier proceso que pueda estabilizarlos y protegerlos de la acción degradativa de agentes externos.

Con objeto estabilizar e incrementar la vida útil del extracto colorante es habitual que se recurra a técnicas como la encapsulación, que va a permitir proteger las moléculas de pigmento al enmascararlas con un agente protector y va a prevenir la pérdida prematura de color. Los colorantes naturales encapsulados se conservan mejor, a la vez que son más estables frente a la luz, el pH o el calor, lo

que les va a permitir ser aplicados en formulaciones donde normalmente podría plantear problemas su empleo (*Obón et al., 2009; Gandía-Herrero et al., 2010*).

En el capítulo siguiente se estudia el secado por atomización (spray-drying) y microencapsulación del extracto colorante con diversas sustancias con objeto de mejorar sus propiedades, prolongar su vida útil y diversificar su proyección tecnológica.

4.6. ATOMIZACIÓN Y MICROENCAPSULACIÓN DEL EXTRACTO COLORANTE

El secado por atomización (*spray-drying*) consiste en la producción de un polvo fino y homogéneo obtenido a partir de un producto líquido por evaporación del disolvente que lo contiene. Este proceso (Fig. 4.24) se realiza en una cámara de secado, mezclando gas caliente, normalmente aire, con el líquido pulverizado (atomizado) que contiene gotas de tamaño idéntico, con una relación elevada entre masa y volumen. Por contacto directo del gas (aire) caliente con las gotas de producto pulverizado el disolvente se evapora rápidamente. Así, mediante secado por atomización una disolución, emulsión, suspensión o dispersión líquida se puede transformar en un producto totalmente seco y estable.

Figura 4.24. Sistema típico de secado por atomización

Inicialmente el producto líquido se introduce en el equipo por medio de una bomba peristáltica para salir pulverizado por la boquilla, a continuación se evapora el disolvente por contacto con una corriente de aire caliente, y como paso final los equipos utilizados en la industria presentan compartimentos de deposición de estas partículas para que, con la ayuda de un ciclón, al final sean recogidas en un vaso o

recipiente cerrado. Los bajos tiempos de residencia empleados y el efecto refrigerador debido a la evaporación, posibilita trabajar eficazmente con productos sensibles a la temperatura (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

El secado por atomización es una técnica usada desde hace más de 50 años en la industria alimentaria. Además de secar el producto, permite el recubrimiento de las partículas formadas con un cubierta protectora, mediante el proceso conocido como encapsulación (Gouin, 2004; Desai y Park, 2005). Cuando las partículas formadas presentan un diámetro en el rango de micras a milímetros el proceso se denomina microencapsulación. La microcápsula más simple posee una estructura compuesta por el material activo (*core*) y una delgada pared (*shell*) que lo envuelve y protege (Fig. 4.25).

Figura 4.25. Estructura general de una microcápsula

Mediante microencapsulación compuestos activos se recubren de una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger el producto de factores externos, de su interacción con otros componentes del medio o bien para controlar y ralentizar su liberación (Yáñez *et al.*, 2005).

La técnica de encapsulación ha permitido solucionar diversos problemas en la aplicación de ingredientes y aditivos alimentarios, como por ejemplo, enmascarar sabores indeseados, reducir la volatilidad e incrementar la estabilidad de determinados productos en condiciones ambientales adversas (Champagne y Fustier, 2007). Como paso previo al proceso de encapsulación se deben considerar algunos factores, como: cuál va a ser la aplicación de las microcápsulas, la

composición de los ingredientes, el mecanismo de liberación, tamaño de partícula, forma física final y el coste económico, entre otros. De acuerdo a estas consideraciones se determina el método de encapsulación y el agente encapsulante más apropiado (*Goud et al., 2005*).

Son diversos los métodos de microencapsulación (*Goud et al., 2005*):

- Métodos físicos: secado por atomización, extrusión y lecho fluidizado.
- Métodos químicos: coacervación, atrapamiento en liposomas y gelificación iónica.
- Métodos físico-químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

De todos los posibles, el secado por atomización (*spray-drying*) es el más ampliamente utilizado en la industria de alimentos, sobre todo porque es un método económico y porque también resulta efectivo para proteger diversos componentes como lípidos, vitaminas, antioxidantes, aromas o colorantes (*Hogan et al., 2001, Minemoto et al., 2002; Robert et al., 2003*).

Este método se puede utilizar en operaciones de recubrimiento de sólidos y líquidos porque a medida que se evapora el disolvente, el material de recubrimiento envuelve las partículas, lo que puede ser útil para enmascarar aromas y sabores y mejorar la estabilidad (*López, 2010*).

En la encapsulación de extractos de frutos de *Opuntia* mediante secado por atomización se ha logrado mayor retención de betalaínas y polifenoles cuando se partía de extractos acuosos de pulpa (*Sáenz et al., 2009*), lo que viene a sugerir que el mucílago de la pulpa, rico en polisacáridos, favorece el proceso de encapsulación de los compuestos bioactivos. Es conocido que la pulpa de frutos de *Opuntia* contiene un 4 % de mucílago, sustancia de estructura similar a las pectinas que contiene ácido urónico, xilosa, rhamnosa, arabinosa y galactosa (*Matsuhiro et al., 2006*).

En el campo alimentario la microencapsulación es un método que sigue en vanguardia debido principalmente a su sencillez y a su bajo coste económico. Son diversos los agentes encapsulantes que se emplean, destacando almidones (Loksuwan, 2007), maltodextrinas (Obón *et al.*, 2009; Sáenz *et al.*, 2009), ciclodextrinas, carboximetilcelulosa, goma arábiga, alginatos, carragenatos y quitosano (Souza *et al.*, 2005), también proteínas (Chen *et al.*, 2006) gelatina (Robert *et al.*, 2003) y grasas. Estos agentes encapsulantes muestran una función protectora sobre ingredientes sensibles contra el daño oxidativo (Robert *et al.*, 2003). Sin embargo, es importante tener en cuenta características como la flexibilidad, resistencia, permeabilidad, facilidad de aplicación y naturaleza hidrofóbica o hidrofílica de los mismos, ya que todos estos factores influirán en las características del producto final ((Gharsallaoui *et al.*, 2007).

En el caso concreto de los colorantes, la microencapsulación permite obtener un extracto en polvo, de manera que se facilita el transporte al reducir el peso, se preserva el producto de la acción de agentes externos (luz, oxígeno, humedad) y también de la acción microbiana ya que se reduce drásticamente la actividad del agua.

Los objetivos pretendidos en esta serie de ensayos han sido:

- Obtener un extracto colorante de betaxantinas en polvo.
- Seleccionar el encapsulante a utilizar de entre diversos fructooligosacáridos, inulinas y maltodextrinas ensayadas.
- Una vez elegido el agente encapsulante óptimo, escoger una correcta relación extracto colorante/agente encapsulante que permita obtener un mayor rendimiento en la atomización y un colorante de más calidad.

Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación con extractos de betacianinas procedentes de frutos de *Opuntia stricta* permitieron establecer las condiciones de atomización adecuadas. Así se optó por una temperatura del aire de 160 °C, un caudal de alimentación de 5 mL/min (bomba al 30 %) y un caudal de aspiración al 85 %. De entre las diversas condiciones ensayadas, con estas se logró

el mayor rendimiento en peso durante el secado y la mayor calidad del colorante final. El empleo de caudales de alimentación más altos no permitía un correcto secado del colorante debido a su corto periodo de residencia en la cámara de secado. Además, el hecho de emplear temperaturas más altas llevaba a una cierta degradación de los pigmentos y se obtenía menor intensidad de color en el colorante final (Obón *et al.*, 2009).

Como agente encapsulante se ensayaron productos comerciales de naturaleza polisacárida, como maltodextrinas (Glucidex®), inulina (Beneo®) y fructooligosacáridos (Beneo® y Actilight®). Para la selección del encapsulante óptimo es importante conocer sus propiedades físico-químicas, especialmente su temperatura de transición vítrea (T_g) y su higroscopicidad. Del valor de la T_g depende la eficacia del proceso de secado por atomización, así interesa que los encapsulantes presenten valores de T_g altos con objeto de evitar la pegajosidad (*stickiness*) en el polvo final obtenido. La higroscopicidad es la capacidad de una sustancia para absorber la humedad atmosférica. Cada sustancia tiene una humedad que se llama de equilibrio, es decir, un contenido de humedad tal de la atmósfera a la cual el material ni capta ni libera humedad al ambiente. Si la humedad ambiente es menor que este valor de equilibrio, el material se secará, si la humedad ambiente es mayor, se humedecerá. Se requiere que los agentes encapsulantes no sean higroscópicos con objeto de que no capten humedad para que no se aglomeren y apelmacen y puedan desmerecer la calidad del producto final.

La Tabla 4.8 muestra las características de los encapsulantes ensayados y el rendimiento del polvo colorante final obtenido. En todos los casos se empleó una relación materia seca zumo/materia seca encapsulante de 1/1 (Obón, *et al.*, 2009).

Tabla 4.8. Características y rendimiento de los encapsulantes ensayados

ENCAPSULANTE	COMPOSICIÓN	T_g (°C)	RENDIMIENTO EN PESO (%)
Glucidex 6D®	maltodextrina	160	75.8±1.9
Beneo HPX®	inulina	125	36.9±1.8
Actilight 950P®	fructooligosacárido	96	18.1±2.1
Beneo ST®	inulina	124	18.2±2.3
Beneo HSI®	fructooligosacárido/inulina (60/26)	88	15.1±1.9
Beneo P95®	fructooligosacárido	49	12.6±3.2

Los valores de rendimiento se corresponden a la media±SD de 3 determinaciones

A la vista de los resultados se observa cómo el empleo de la maltodextrina Glucidex 6D® permite obtener un mayor rendimiento en peso durante la atomización, en comparación al resto de fructooligosacáridos e inulinas ensayados. También es, de entre todos los encapsulantes probados, el de temperatura de transición vítrea más alta, lo que también favorece la mejor calidad del polvo final obtenido. En concreto, Glucidex 6D® permite obtener un rendimiento en peso dos veces superior al siguiente (Beneo HPX®).

A excepción del polvo obtenido con Glucidex 6D®, los demás presentaron apariencia apelmazada y pegajosa (Fig. 4.26) y una buena parte del colorante quedaba pegado en las paredes de la cámara de secado sin posibilidad de poder ser recuperado, lo que explica en parte el bajo rendimiento conseguido con estos agentes encapsulantes.

También se realizó un ensayo para tratar de obtener colorante en polvo sin añadir ningún encapsulante. El resultado no fue satisfactorio porque se obstruía la boquilla del atomizador debido a la elevada higroscopía del extracto colorante en fase sólida, lo que hace necesario la incorporación de un encapsulante no sólo para proteger el colorante de la acción de factores externos, sino también para conseguir un colorante sólido con una granulometría adecuada y con las partículas sólidas

sueltas entre sí (sin partículas pegadas). El hecho de no poder conseguir el colorante en polvo “puro” dada su alta higroscopía, hace más importante aún si cabe la microencapsulación mediante atomización para producir un colorante resistente a la acción del aire, humedad del ambiente y temperatura, constituido por partículas sueltas fácilmente dispersables, y tratando siempre de conseguir el mayor rendimiento posible durante esta etapa.

Figura 4.26. Muestras del polvo obtenido con los diversos encapsulantes

Elegido el encapsulante con mejor comportamiento, se procedió a continuación a optimizar la relación extracto de *Opuntia*/Glucidex 6D® con la finalidad de conseguir el mayor rendimiento y la mejor calidad del polvo seco, evaluada en términos de intensidad de color y de estabilidad en las partículas sólidas. Se prepararon diversos extractos con relación creciente entre materia seca de extracto colorante y Glucidex 6D®, se procedió a su atomización y finalmente se evaluó el rendimiento y características del polvo obtenido. La Tabla 4.9 resume los datos obtenidos.

Tabla 4.9. Rendimiento en peso de atomización con distintas proporciones de Glucidex 6D®

ENCAPSULANTE	MATERIA SECA ZUMO/MATERIA SECA ENCAPSULANTE	RENDIMIENTO EN PESO (%)
Glucidex 6D®	1/1	75.8±1.9
Glucidex 6D®	2/1	69.4±2.1
Glucidex 6D®	5/2	62.5±2.3
Glucidex 6D®	10/3	44.6±1.8
Glucidex 6D®	4/1	45.8±2.5

Los valores de rendimiento se corresponden a la media±SD de 3 determinaciones

A la vista de los resultados se aprecia como a medida que se aumenta la proporción de extracto colorante en proporción a la maltodextrina Glucidex 6D® el rendimiento en peso de atomización disminuye. El mayor rendimiento se obtiene con la relación 1:1, lo que viene en concordancia resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación (Lozano, 2009).

Figura 4.27. Colorante obtenido en función de la cantidad de encapsulante añadida

El hecho de aumentar la relación de colorante con respecto al encapsulante hace decaer notablemente el rendimiento de la atomización, debido a la alta higroscopía del extracto colorante que provoca que las partículas sólidas se

adhieran a la cámara de secado y no puedan ser recuperadas. Además el colorante sólido obtenido se hidrata rápidamente por la acción de la humedad ambiental y se aglomera volviéndose untuoso, lo que desmerece su calidad final. De esta manera, con relaciones más altas de zumo concentrado de *Opuntia* se consigue menor rendimiento de atomización y un extracto colorante difícil de manipular y poco operativo.

Por otro lado, destacar que no se han realizado ensayos empleando relaciones inferiores a 1, ya que el hecho de aumentar en exceso la cantidad de encapsulante provoca una dilución del color así como un encarecimiento del proceso en caso de extrapolarse a nivel industrial. Por tanto, se puede concluir que con la relación extracto colorante/Glucidex 6D® de 1.0 se ha conseguido un mayor rendimiento de atomización, el colorante obtenido tenía la mejor calidad en comparación al resto, con partículas no aglutinadas entre sí y con mejor intensidad de color.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite analizar la morfología de las partículas formadas durante el proceso de secado. En la Fig. 4.28 se pueden observar diversas microfotografías del extracto obtenido con relación 1/1, donde se visualiza que la gran mayoría de partículas presentan forma esférica y que el tamaño de las mismas es variable entre 1 y 10 μm .

Figura 4.28. Microfotografías electrónicas de las partículas atomizadas

4.7. ENSAYOS DE TERMOSENSIBILIDAD DEL EXTRACTO. COMPARACIÓN CON OTROS COLORANTES AMARILLOS DE USO ALIMENTARIO

Está aceptado que una de las principales limitaciones en el uso de colorantes alimentarios naturales en comparación con los sintéticos es su menor estabilidad frente a la temperatura. En ocasiones esta mayor degradación térmica que suele observarse en los colorantes naturales puede dificultar su utilización en procesos tecnológicos que impliquen altas temperaturas. Por ello se hace imprescindible un estudio completo del comportamiento de los colorantes naturales en diferentes condiciones de temperatura, a fin de conocer su estabilidad y poder elegir de este modo la matriz alimentaria más adecuada sobre la que ser aplicados.

El procesado de un alimento puede implicar su calentamiento a alta temperatura, dependiendo de su pH y de lo intenso que se pretenda vaya a ser su tratamiento (escaldado, pasteurización, esterilización, etc.). Aunque los colorantes naturales se están imponiendo en el mercado frente a los sintéticos y cada vez son más sus potenciales aplicaciones, la estabilidad es una de sus principales limitaciones (*Patras et al., 2010*). La incorporación de un colorante natural a un alimento requiere un conocimiento detallado de su comportamiento, así como evaluar su estabilidad frente a posibles procesos degradativos y las condiciones que los regulan para, en su caso, tomar las medidas apropiadas que aseguren la estabilidad suficiente y que permitan optimizar la producción, transporte y almacenamiento del alimento final. No existen estudios comparativos sobre la estabilidad térmica de colorantes amarillos naturales usados en alimentos por lo que parece interesante estudiar la estabilidad térmica (30 °C, 50 °C, 70 °C, 90 °C) del extracto colorante de frutos de *Opuntia*, y confrontarla a la de otros colorantes amarillos naturales empleados comúnmente por la industria alimentaria. Considerando que es esencial un conocimiento preciso de la cinética del proceso para poder predecir posibles cambios durante el procesado térmico, también se

han estimado los parámetros cinéticos de la degradación del color durante el tratamiento.

La comparación se ha realizado frente a los colorantes: luteína, β -caroteno, curcumina, riboflavina y amarillo gardenia. La estabilidad se ha analizado en términos de pérdida de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorbancia y variación de las coordenadas de color en función de la temperatura y del tiempo. Inicialmente se prepararon disoluciones de todos los colorantes seleccionados y sus absorbancias se aproximaron a 0.800 a su longitud de onda de absorbancia máxima.

La Tabla 4.10 muestra las características cromáticas de las disoluciones iniciales. Es de resaltar la alta luminosidad (>88) de todas las disoluciones y que, como era de esperar, el valor del parámetro b^* (coordenada azul-amarillo) resultó siempre positivo y alto. Respecto a las longitudes de onda de absorbancia máxima ($\lambda_{\max}$), todas estuvieron en el rango 400-500 nm, oscilando entre la mínima de 429 nm para curcumina y la máxima de 478 nm para el extracto de *Opuntia*.

Tabla 4.10. Características de las disoluciones iniciales de los colorantes investigados

COLORANTE	L^*	a^*	b^*	$\lambda_{\max}$ (nm)
Luteína	94.1 $\pm$ 0.2	-14.8 $\pm$ 0.3	75.1 $\pm$ 0.2	445 $\pm$ 0.8
Riboflavina	97.3 $\pm$ 0.4	-17.4 $\pm$ 0.3	69.1 $\pm$ 0.4	446 $\pm$ 0.6
Curcumina	95.6 $\pm$ 0.3	-19.1 $\pm$ 0.1	53.9 $\pm$ 0.2	429 $\pm$ 0.5
β -caroteno	93.9 $\pm$ 0.5	-14.6 $\pm$ 0.3	70.6 $\pm$ 0.4	448 $\pm$ 0.6
Amarillo Gardenia	96.5 $\pm$ 0.2	-13.8 $\pm$ 0.2	63.2 $\pm$ 0.2	437 $\pm$ 0.4
Extracto <i>Opuntia</i>	88.0 $\pm$ 0.4	-1.3 $\pm$ 0.2	51.2 $\pm$ 0.1	478 $\pm$ 0.7

Media $\pm$ SD de 3 determinaciones

En la Fig. 4.29 se pueden observar las disoluciones colorantes preparadas y los diferentes matices de amarillo que cada colorante proporciona.

Figura 4.29. Disoluciones de los colorantes seleccionados

Como ya se ha comentado, el tratamiento térmico es uno de los factores más importantes que influye en la estabilidad de un colorante. La temperatura acelera las reacciones degradativas y puede modificar o incluso llegar a hacer desaparecer el color. Las modificaciones estructurales que se ocasionan en la molécula del pigmento afectan sus propiedades espectrales y su color. El nivel de degradación dependerá de la temperatura y del tiempo de tratamiento, y por tanto hay una relación directa entre variación de color e intensidad del procesado térmico. Es fundamental para la industria alimentaria conocer cómo la temperatura afecta la estabilidad y apariencia de un colorante, para poder establecer estrategias que prevean y eviten cambios no deseados en el color del elaborado final.

4.7.1. Ensayo de termodegradación a 30 °C

La temperatura más baja de las ensayadas fue 30 °C. Aun manteniendo hasta 6 horas el tratamiento se observa que no origina grandes modificaciones en ninguno de los colorantes ensayados. Las Fig. 4.30 y 4.31 muestran la incidencia del tratamiento a 30 °C en los espectros visibles de absorbancia de cada uno de los colorantes.

Figura 4.30. Influencia de la temperatura (30 °C) en el espectro visible de β-caroteno, curcumina y amarillo gardenia.

Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

Figura 4.31. Influencia de la temperatura (30 °C) en el espectro visible de luteína, extracto de *Opuntia* y riboflavina.

Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

Analizados los datos de este primer ensayo de degradación térmica a 30 °C, se puede afirmar que todos los colorantes soportan bien esta temperatura, sin apenas degradación durante las 6 horas de tratamiento. No obstante, del análisis de los espectros se comprueba que en algunos casos ya se visualiza un ligero desplazamiento entre espectros de un mismo colorante. La Tabla 4.11 resume los incrementos de absorbancia observados para cada colorante a su longitud de onda máxima.

Tabla 4.11. Pérdidas de absorbancia registradas tras 6 horas de tratamiento a 30 °C

COLORANTE	Δ Absorbancia
Luteína	< 0.05
Riboflavina	< 0.05
Curcumina	< 0.05
β -caroteno	< 0.05
Amarillo Gardenia	< 0.05
Extracto <i>Opuntia</i>	0.112

Los datos confirman que únicamente el extracto de frutos de *Opuntia* experimenta una pérdida de absorbancia superior a 0.05, revelando su menor estabilidad térmica.

Para completar el estudio, también se analizó la influencia del tratamiento térmico en el color de los colorantes mediante el seguimiento de las coordenadas CIELAB. Así, se registró la evolución de los parámetros L^* (luminosidad), a^* (rojo-verde), b^* (amarillo-azul), C^* (cromaticidad) y h (ángulo de tono) durante el periodo de tratamiento. Las Tablas 4.12 a 4.17 muestran los resultados obtenidos en el ensayo de 30 °C. La influencia en el color visual se analizará viendo el desplazamiento del color en el plano colorimétrico (a^* , b^*).

Tabla 4.12. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 30 °C de luteína

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
<i>L*</i>	94.14	93.22	93.37	93.28	93.64	93.58	93.49
<i>a*</i>	-14.75	-15.40	-15.71	-15.47	-15.77	-15.86	-15.86
<i>b*</i>	61.08	76.78	75.81	77.17	76.98	77.79	77.68
<i>C*</i>	62.84	78.31	77.42	78.70	78.58	79.39	79.28
<i>h</i>	-13.58	-11.34	-11.70	-11.33	-11.58	-11.52	-11.54

Tabla 4.13. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 30 °C de riboflavina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
<i>L*</i>	97.34	97.08	97.69	97.27	97.01	97.27	97.19
<i>a*</i>	-17.37	-17.24	-17.10	-16.95	-16.80	-16.94	-16.81
<i>b*</i>	69.06	67.92	67.19	67.06	67.14	66.71	66.77
<i>C*</i>	71.21	70.07	69.33	69.17	69.21	68.82	68.86
<i>h</i>	-14.11	-14.24	-14.28	-14.19	-14.05	-14.25	-14.13

Tabla 4.14. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 30 °C de curcumina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
<i>L*</i>	95.56	95.55	95.55	94.96	95.33	95.29	95.13
<i>a*</i>	-19.07	-18.82	-19.03	-18.07	-18.80	-18.68	-18.78
<i>b*</i>	53.91	54.85	54.07	52.48	55.31	54.56	54.86
<i>C*</i>	57.18	57.99	57.32	55.50	58.41	57.67	57.99
<i>h</i>	-19.48	-18.94	-19.39	-19.00	-18.77	-18.90	-18.90

Tabla 4.15. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 30 °C de β -caroteno

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	93.91	93.51	91.60	91.80	93.05	92.99	93.30
a^*	-14.62	-14.53	-13.04	-13.35	-14.04	-14.27	-14.45
b^*	70.64	70.94	67.46	69.35	70.23	70.49	70.57
C^*	72.13	72.41	68.70	70.63	71.62	71.92	72.03
h	-11.70	-11.57	-10.94	-10.90	-11.31	-11.44	-11.57

Tabla 4.16. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 30 °C de amarillo gardenia

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	96.48	96.89	96.85	96.58	96.44	96.41	96.71
a^*	-13.78	-13.75	-13.51	-13.49	-13.24	-13.40	-13.59
b^*	63.20	61.49	60.88	61.01	59.44	60.92	61.21
C^*	64.68	63.01	62.37	62.49	60.90	62.38	62.70
h	-12.30	-12.60	-12.51	-12.46	-12.56	-12.41	-12.51

Tabla 4.17. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 30 °C del extracto de frutos de *Opuntia*

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	88.00	88.48	88.15	88.54	88.53	88.85	88.56
a^*	-1.25	-1.43	-1.16	-1.49	-1.62	-1.72	-1.83
b^*	51.17	50.73	48.73	50.11	49.90	48.20	50.15
C^*	51.19	50.75	48.74	50.13	49.93	48.23	50.18
h	-1.40	-1.62	-1.36	-1.70	-1.86	-2.04	-2.09

4.7.2. Ensayo de termodegradación a 50 °C

El diseño del ensayo de degradación a 50 °C se realizó de forma análoga al efectuado a 30 °C. Los tubos con las disoluciones colorantes envueltos en papel de aluminio se sumergieron en el baño termostatzado la temperatura deseada y se fueron extrayendo alícuotas a los tiempos establecidos, para, tras pasarlos por un baño de hielo, ser inmediatamente analizados.

Las Fig. 4.32 y 4.33 muestran la evolución en el tiempo de los espectros de absorbancia y la Tabla 4.18 cuantifica la pérdida de absorbancia experimentada por cada colorante tras 6 horas de tratamiento térmico.

Tabla 4.18. Pérdidas de absorbancia registradas tras 6 horas de tratamiento a 50 °C

COLORANTE	Δ Absorbancia
Luteína	< 0.05
Riboflavina	0.084
Curcumina	< 0.05
β -caroteno	< 0.05
Amarillo Gardenia	0.074
Extracto <i>Opuntia</i>	0.264

Se manifiesta la mayor severidad de este ensayo al ser ya varios los colorantes que experimentan pérdidas apreciables de absorbancia. Además del extracto de frutos *Opuntia*, que experimenta una disminución del 32 % en su absorbancia, también riboflavina y amarillo gardenia muestran signos evidentes de degradación.

Figura 4.32. Influencia de la temperatura (50 °C) en el espectro visible de β-caroteno, curcumina y amarillo gardenia

Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

Figura 4.33. Influencia de la temperatura (50 °C) en el espectro visible de luteína, extracto de frutos de *Opuntia* y riboflavina. Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

Tabla 4.19. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 50 °C de luteína

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	93.50	95.01	95.71	96.17	95.15	93.87	93.82
a^*	-16.66	-16.68	-16.75	-16.71	-16.65	-16.10	-16.35
b^*	65.70	68.98	69.59	70.20	69.57	69.37	69.19
C^*	67.78	70.97	71.58	72.16	71.54	71.22	71.09
h	-14.23	-13.59	-13.54	-13.39	-13.46	-13.07	-13.30

Tabla 4.20. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 50 °C de riboflavina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	96.79	97.66	98.47	99.00	98.95	97.20	97.08
a^*	-17.39	-17.22	-17.10	-17.08	-17.04	-16.59	-15.90
b^*	69.09	67.94	68.69	69.03	68.27	66.81	65.53
C^*	71.24	70.09	70.79	71.12	70.37	68.84	67.43
h	-14.13	-14.23	-13.98	-13.90	-14.02	-13.94	-13.64

Tabla 4.21. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 50 °C de curcumina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	95.64	96.27	96.92	96.67	96.40	95.77	94.97
a^*	-18.00	-18.59	-18.11	-18.11	-18.08	-17.99	-18.08
b^*	48.37	51.90	50.19	50.27	50.87	50.78	51.23
C^*	51.61	55.13	53.36	53.44	53.99	53.88	54.33
h	-12.50	-12.32	-12.30	-12.28	-12.15	-12.01	-12.03

Tabla 4.22. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 50 °C del β -caroteno

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	95.17	93.61	94.62	94.68	94.25	92.96	93.17
a^*	-14.45	-14.07	-14.11	-14.12	-14.08	-13.82	-13.94
b^*	65.16	64.42	64.71	64.88	65.39	64.96	65.42
C^*	66.75	65.93	66.23	66.40	66.89	66.41	66.89
h	-12.50	-12.32	-12.30	-12.28	-12.15	-12.01	-12.03

Tabla 4.23. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 50 °C de amarillo gardenia

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	95.87	97.03	97.73	97.59	97.24	96.42	96.55
a^*	-13.69	-13.79	-13.84	-13.88	-13.68	-13.48	-13.42
b^*	65.53	62.47	64.18	63.25	62.45	61.73	61.24
C^*	66.94	63.97	65.65	64.75	63.93	63.19	62.70
h	-11.80	-12.44	-12.17	-12.38	-12.35	-12.32	-12.36

Tabla 4.24. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 50 °C del extracto de frutos de *Opuntia*

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	87.56	89.45	91.04	91.68	92.31	91.50	90.09
a^*	5.17	3.22	2.20	1.31	0.44	-0.11	-0.32
b^*	48.91	48.03	47.11	45.92	44.50	42.53	40.77
C^*	49.18	48.14	47.16	45.94	44.51	42.53	40.77
h	6.03	3.84	2.68	1.63	0.56	-0.14	-0.44

El estudio térmico realizado a 50 °C muestra que tanto el extracto de frutos de *Opuntia* como el amarillo gardenia son los más sensibles en estas condiciones, disminuyendo notablemente la coordenada b^* pasadas las 6 horas del comienzo del ensayo, lo que revela pérdida del color amarillo ocasionada por la degradación de los pigmentos presentes. El resto de colorantes resultan muy estables en estas condiciones de temperatura modificando muy ligeramente su espectro con respecto a los de sus respectivos patrones a tiempo cero. Destacan especialmente los colorantes curcumina y luteína, que apenas presentan cambios en el tiempo en sus respectivos espectros de absorción, y consecuencia de ello en sus coordenadas colorimétricas.

4.7.3. Ensayo de termodegradación a 70 °C

De forma idéntica a como se diseñaron los ensayos anteriores se realizó el experimento a 70 °C. Resulta evidente (Tabla 4.25) que esta temperatura ya afecta a un mayor número de colorantes, destacando luteína, β -caroteno y curcumina por su estabilidad, superponiéndose sus espectros incluso después de 6 horas de tratamiento térmico.

Tabla 4.25. Pérdidas de absorbancia registradas tras 6 horas de tratamiento a 70 °C

COLORANTE	Δ Absorbancia
Luteína	< 0.05
Riboflavina	0.178
Curcumina	< 0.05
β -caroteno	< 0.05
Amarillo Gardenia	0.184
Extracto <i>Opuntia</i>	0.464

Figura 4.34. Influencia de la temperatura (70 °C) en el espectro visible de β -caroteno, curcumina y amarillo gardenia.
Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

Figura 4.35. Influencia de la temperatura (70 °C) en el espectro visible de luteína, extracto de frutos de *Opuntia* y riboflavina. Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

El estudio de la evolución de las coordenadas colorimétricas (Tablas 4.26 a 4.31) pone de manifiesto que el colorante riboflavina y el extracto de frutos de *Opuntia* muestran signos evidentes de degradación. Es de destacar que aunque la luminosidad (L^*) de los extractos colorantes no se ve afectada en el tiempo, si resulta evidente la disminución experimentada por el parámetro amarillo-azul (b^*). En el amarillo gardenia esta disminución de b^* es de 10 unidades, en la riboflavina se reduce en 12 unidades, y en el extracto de frutos de *Opuntia* la disminución de b^* llega hasta las 18 unidades.

Tabla 4.26. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 70 °C de luteína

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	93.03	93.86	94.74	94.37	92.00	94.47	93.42
a^*	-16.38	-16.30	-16.56	-16.46	-15.46	-16.42	-15.99
b^*	65.66	66.63	66.64	66.50	65.21	65.61	65.34
C^*	67.67	68.59	68.66	68.51	67.01	67.64	67.27
h	-14.01	-13.75	-13.95	-13.90	-13.34	-14.05	-13.75

Tabla 4.27. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 70 °C de riboflavina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	96.33	97.51	97.90	97.95	96.88	97.76	97.77
a^*	-17.56	-17.30	-17.15	-17.03	-16.58	-16.28	-16.16
b^*	70.79	69.16	67.86	67.07	64.13	63.02	62.04
C^*	72.93	71.29	69.99	69.20	66.24	65.09	64.11
h	-13.93	-14.04	-14.19	-14.25	-14.50	-14.49	-14.60

Tabla 4.28. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 70 °C de curcumina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	89.89	94.37	95.04	86.21	94.44	94.73	92.31
a^*	-15.34	-17.29	-17.48	-13.16	-16.97	-17.32	-16.26
b^*	50.25	49.27	48.84	50.15	48.85	48.27	48.25
C^*	52.54	52.22	51.88	51.85	51.72	51.28	50.92
h	-16.98	-19.34	-19.70	-14.71	-19.16	-19.74	-18.62

Tabla 4.29. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 70 °C de β -caroteno

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	92.34	92.85	90.78	94.61	93.80	93.98	93.59
a^*	-14.20	-13.92	-12.77	-14.24	-14.14	-14.00	-14.03
b^*	64.78	64.61	65.11	66.36	65.59	65.37	65.58
C^*	66.32	66.09	66.35	67.88	67.10	66.85	67.06
h	-12.37	-12.15	-11.10	-12.11	-12.16	-12.09	-12.07

Tabla 4.30. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 70 °C de extracto amarillo gardenia

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	94.95	96.86	97.28	97.41	97.25	97.25	97.16
a^*	-13.86	-13.80	-14.10	-13.75	-13.77	-13.51	-13.40
b^*	65.86	61.75	60.48	59.05	57.49	56.05	55.37
C^*	67.30	63.27	62.10	60.63	59.12	57.65	56.97
h	-11.88	-12.60	-13.12	-13.11	-13.47	-13.55	-13.61

Tabla 4.31. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 70 °C del extracto de frutos de *Opuntia*

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	88.22	88.70	89.42	89.27	89.22	89.26	89.57
a^*	5.00	-3.58	-4.38	-4.58	-4.14	-3.53	-3.43
b^*	48.96	48.90	44.65	40.74	36.58	33.06	30.55
C^*	49.21	49.03	44.86	41.00	36.82	33.25	30.74
h	5.83	-4.19	-5.60	-6.41	-6.45	-6.10	-6.41

En el extracto de frutos de *Opuntia* también se observa con el paso del tiempo una disminución en el parámetro rojo-azul (a^*) que puede ser resultado de la degradación de la betanina presente en el extracto. El hecho de que en el resto de colorantes no se produzca variabilidad destacada en la coordenada a^* puede estar motivada por la ausencia de pigmentos rojos en esos extractos.

4.7.4. Ensayo de termodegradación a 90 °C

La mayor temperatura ensayada fue 90 °C. De manera análoga a la de experimentos anteriores se estudió el comportamiento de los 6 colorantes seleccionados a esta temperatura. De los resultados obtenidos cabe destacar la estabilidad de luteína y β -caroteno, que aun en estas condiciones tan extremas, prácticamente superponen sus espectros de absorbancia tras 6 horas de tratamiento. Por otro lado, queda patente la termolabilidad el extracto de frutos *Opuntia*, y ya en la primera hora de tratamiento pierde el 60 % de la absorbancia inicial, para a partir de la segunda hora quedar prácticamente decolorado en su totalidad.

En la Tabla 4.32 se cuantifica lo que supone el rigor de este tratamiento en cuanto a pérdida de absorbancia inicial para cada colorante, y se comprueba que esta temperatura también provoca la degradación de la curcumina, que hasta ahora no había resultado afectada.

Tabla 4.32. Pérdidas de absorbancia registradas tras 6 horas de tratamiento a 90 °C

COLORANTE	Δ Absorbancia
Luteína	< 0.05
Riboflavina	0.369
Curcumina	0.191
β -caroteno	< 0.05
Amarillo Gardenia	0.240
Extracto <i>Opuntia</i>	0.689

Se puede observar analizando los espectros de absorbancia (Fig. 4.36 y 4.37), que el perfil de los mismos se mantiene durante las 6 horas de tratamiento térmico. Este solo incide en la mayor o menor absorción, lo que prueba que la temperatura degrada el pigmento responsable del color pero el/los compuestos que se forman ya no absorben en el rango visible. Esto es así para los 6 colorantes analizados.

Del análisis de la evolución de las coordenadas colorimétricas es de reseñar que este tratamiento de 90 °C, incluso durante 6 horas, no afecta la luminosidad de los extractos y como era de esperar, donde si repercute de forma notable, especialmente en el amarillo gardenia, riboflavina y extracto de frutos de *Opuntia*, es en la drástica disminución de b^* .

Se verá en el próximo apartado como todos estos cambios desplazan en el plano colorimétrico las muestras de cada colorante, y así los más estables apenas se desplazarán en el plano, mientras que los más termolábiles experimentarán un recorrido más amplio.

Figura 4.36. Influencia de la temperatura (90 °C) en el espectro visible de β -caroteno, curcumina y amarillo gardenia.
Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

Figura 4.37. Influencia de la temperatura (90 °C) en el espectro visible de luteína, extracto de frutos de *Opuntia* y riboflavina. Las diferentes líneas corresponden a los espectros tras su exposición a tiempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. La flecha indica que los sucesivos espectros se sitúan en ese sentido.

Tabla 4.33. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 90 °C de luteína

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	94.08	94.32	93.97	94.38	94.01	92.71	92.82
a^*	-15.79	-15.59	-15.45	-15.93	-15.66	-15.22	-15.26
b^*	62.08	61.60	61.77	60.90	61.22	60.24	60.62
C^*	64.06	63.54	63.67	62.95	63.19	62.13	62.51
h	-14.27	-14.21	-14.04	-14.66	-14.35	-14.18	-14.13

Tabla 4.34. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 90 °C de riboflavina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	97.30	97.62	97.89	97.99	97.94	98.68	98.40
a^*	-17.42	-16.76	-16.29	-15.56	-14.72	-14.21	-13.28
b^*	69.43	65.14	61.79	57.06	51.99	48.62	44.32
C^*	71.58	67.26	63.90	59.15	54.03	50.65	46.27
h	-14.08	-14.43	-14.77	-15.26	-15.81	-16.29	-16.68

Tabla 4.35. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 90 °C de curcumina

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	95.83	95.41	95.23	95.55	95.48	95.69	95.63
a^*	-18.23	-19.18	-19.23	-19.65	-19.76	-19.70	-20.03
b^*	50.03	54.22	55.30	56.81	57.24	57.13	57.83
C^*	53.25	57.51	58.55	60.11	60.55	60.43	61.20
h	-20.02	-19.48	-19.17	-19.08	-19.05	-19.02	-19.11

Tabla 4.36. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 90 °C del β -caroteno

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	92.21	94.02	93.95	94.15	93.75	94.15	94.11
a^*	-12.40	-13.51	-13.76	-13.75	-13.39	-13.74	-13.65
b^*	56.61	60.90	60.65	60.70	59.90	60.70	60.78
C^*	57.96	62.38	62.19	62.24	61.37	62.24	62.30
h	-12.35	-12.51	-12.78	-12.77	-12.60	-12.75	-12.65

Tabla 4.37. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 90 °C de amarillo gardenia

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	96.39	97.15	97.40	97.50	97.29	97.59	97.57
a^*	-13.93	-13.83	-13.41	-13.33	-12.90	-12.91	-12.65
b^*	64.64	59.00	54.77	53.33	50.46	49.05	47.08
C^*	66.13	60.60	56.39	54.97	52.08	50.72	48.75
h	-12.16	-13.19	-13.76	-14.04	-14.34	-14.75	-15.04

Tabla 4.38. Evolución de las coordenadas colorimétricas durante el ensayo de termodegradación a 90 °C del extracto de frutos de *Opuntia*

COORDENADA	TIEMPO 0	TIEMPO 1 h	TIEMPO 2 h	TIEMPO 3 h	TIEMPO 4 h	TIEMPO 5 h	TIEMPO 6 h
L^*	86.71	93.58	96.39	95.99	95.15	95.32	95.27
a^*	5.27	-4.85	-4.27	-3.06	-1.98	-1.52	-1.00
b^*	48.31	33.76	22.18	15.93	11.87	9.41	7.94
C^*	48.59	34.11	22.59	16.23	12.03	9.53	8.01
h	6.22	-8.18	-10.89	-10.86	-9.49	-9.17	-7.19

Para una mejor visualización de los cambios de color en cada colorante durante los tratamientos térmicos la Fig. 4.38 muestra la evolución en el plano colorimétrico de las coordenadas a^* y b^* a 30, 50, 70 y 90 °C.

Figura 4.38. Desplazamiento en el plano colorimétrico (a^* , b^*) de los cambios de color experimentados a 30 °C, 50 °C, 70 °C y 90 °C.

Se observa que a 30 °C todas las series de puntos permanecen agrupadas, experimentando un desplazamiento mínimo tras 6 horas de tratamiento térmico. Es de reseñar que cuanto más juntos permanecen los puntos, menor es la degradación

de color experimentada. Según se incrementa la temperatura, la dispersión de los puntos se hace más evidente, especialmente en las series correspondientes al extracto de betaxantinas de *Opuntia*, riboflavina y amarillo gardenia, confirmándose la menor estabilidad de estos colorantes.

A 70 y 90 °C, solo los puntos correspondientes a luteína y β -caroteno permanecen agrupados, con diferencias de color inferiores a 4.0 tras 6 horas de tratamiento, prueba evidente de su termorresistencia.

4.7.5. Modelo cinético

Los modelos cinéticos se pueden emplear para predecir de un modo rápido, objetivo y económico el color de un alimento (*Patras et al., 2010*). La aplicación de estos modelos al seguimiento del color de un alimento durante su procesamiento térmico permite evaluar de forma cuantitativa un parámetro específico en función del tiempo de tratamiento a una temperatura determinada usando la constante de velocidad del proceso una vez se haya establecido el orden de reacción.

El conocimiento de la cinética de degradación, la constante de velocidad del proceso y la energía de activación es crucial para poder llegar a predecir la pérdida de color durante el procesamiento térmico o almacenamiento de un colorante alimentario. La degradación térmica de los colorantes naturales suele ajustarse a procesos cinéticos de pseudo-primer orden (*Yang et al., 2008; Fratianni et al., 2013; Fernández-López et al., 2013*).

La cinética de degradación térmica revela la pérdida de absorbancia con el tiempo de incubación. Los datos modelados son los presentados en la Fig. 4.39, que muestra la absorbancia residual de cada colorante a su máxima longitud de onda de absorción en función de la temperatura y tiempo de tratamiento.

Figura 4.39. Efecto del binomio temperatura–tiempo en la absorbancia remanente de cada colorante.

Nótese la discontinuidad de los ejes para luteína, riboflavina, curcumina, β-caroteno y amarillo gardenia.

Se aprecia en todos los casos, aunque con niveles de intensidad muy distintos, que la degradación se incrementa al subir la temperatura de tratamiento. Los carotenoides (β -caroteno y luteína) son los más termorresistentes e incluso después de 6 horas a 90 °C, luteína mantiene el 93 % de su absorbancia inicial mientras que β -caroteno lo hace en un 96 %, sin presentar variaciones apreciables de color. En posición intermedia están curcumina, amarillo gardenia y riboflavina, que mantienen, respectivamente el 83 %, 67 % y 53 % de su absorbancia inicial tras someterse al más severo de los tratamientos térmicos.

En el extracto de frutos de *Opuntia*, solo el 11 % de la absorbancia inicial se mantiene tras 6 horas de tratamiento a 90 °C, lo que prueba la menor estabilidad térmica de las betaxantinas frente al resto de colorantes ensayados.

Aunque no existen estudios comparativos de la estabilidad térmica de colorantes naturales amarillos, nuestros resultados reafirman la consabida termorresistencia de los carotenoides (*Boon et al., 2010*). La confirmación de la mayor sensibilidad de las betaxantinas a la temperatura (*Moßhammer et al., 2006; El Gharras et al., 2008*) viene a mostrarnos que el empleo de este colorante debe realizarse en alimentos que no precisen de tratamiento térmico que pueda conllevar su posible degradación.

Las constantes de velocidad de degradación (k), tiempos de vida media ($t_{1/2}$) y energías de activación de cada colorante (E_a) se muestran en la Tabla 4.39. Las constantes de velocidad (k) presentan una manifiesta dependencia de la temperatura, haciéndose más elevadas conforme esta se incrementa, lo que viene a reflejar que, en todos los casos, la degradación de color se intensifica a temperaturas más altas. Las más altas constantes de velocidad se dan en los colorantes más termosensibles (extracto de betaxantinas de *Opuntia* y riboflavina), mientras que en los más estables (luteína y β -caroteno) los valores de k son muy inferiores. En todos los colorantes los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) se reducen al incrementarse la temperatura. Los valores más altos de $t_{1/2}$ se presentan en los carotenoides, siendo β -caroteno el más estable de todos. A 90 °C el $t_{1/2}$ del β -

caroteno es de 141.5 horas, valor que es 6 veces superior al de curcumina, 22 veces más alto que el de riboflavina y 69 veces el del extracto de betaxantinas de *Opuntia*. A 30 °C esas diferencias se amortiguan y a esta temperatura el $t_{1/2}$ del β -caroteno es de 223.6 horas, doble que el de curcumina y 5.2 veces el del extracto de betaxantinas. A temperaturas altas la diferente estabilidad de los colorantes se hace mucho más evidente. Estudios previos coinciden que los carotenoides muestran tiempos de vida bastante altos, a la vez que la labilidad de las betaxantinas por encima de 30 °C está bien documentada (Boon *et al.*, 2010; El-Gharras *et al.*, 2008).

Tabla 4.39. Parámetros cinéticos para la degradación térmica de los colorantes amarillos investigados

COLORANTE	TEMPERATURA (°C)	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	E_a (kJ mol ⁻¹)
Luteína	30	0.45	92.42 (0.94)*	3.2
	50	0.52	79.67 (0.92)	
	70	0.54	77.02 (0.96)	
	90	0.59	74.53 (0.98)	
Riboflavina	30	0.61	68.63 (0.98)	36.4
	50	0.84	49.51 (0.93)	
	70	2.29	18.19 (0.99)	
	90	6.38	6.52 (0.99)	
Curcumina	30	0.39	106.64 (0.92)	23.7
	50	0.65	63.59 (0.94)	
	70	1.19	34.83 (0.95)	
	90	1.80	23.11 (0.94)	
β -Caroteno	30	0.19	223.60 (0.98)	6.5
	50	0.23	177.73 (0.97)	
	70	0.25	169.06 (0.94)	
	90	0.29	141.46 (0.95)	
Amarillo Gardenia	30	0.55	76.17 (0.93)	31.2
	50	0.76	55.01 (0.94)	
	70	2.33	17.82 (0.95)	
	90	3.68	11.31 (0.99)	
Betaxantinas Opuntia	30	0.98	42.27 (0.98)	43.7
	50	4.13	10.08 (0.98)	
	70	6.55	6.35 (0.99)	
	90	20.32	2.05 (0.97)	

Entre paréntesis se indica el coeficiente de correlación (R^2) de la determinación

Para evaluar la sensibilidad de k con la temperatura se emplea la ecuación de Arrhenius:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT}$$

Representando gráficamente $\ln k$ frente a $1/T$ se obtiene una recta de pendiente $-E_a/R$ de la que se deducen las energías de activación de cada colorante. A temperaturas altas las moléculas poseen mayor energía cinética y es mayor el número de las mismas que supera la energía de activación para que la reacción tenga lugar. Así, la energía de activación nos va a informar de la sensibilidad de la velocidad de reacción a la temperatura. Los valores de E_a oscilaron desde 3.2 kJ/mol (luteína) hasta 43.7 kJ/mol (extracto de betaxantinas de *Opuntia*). El mayor valor de E_a representa que la velocidad de reacción es más sensible a los cambios de temperatura, es decir, un pequeño incremento de esta va a aumentar de forma muy considerable la velocidad de reacción. Los valores obtenidos de energías de activación están en línea de los reportados en la bibliografía para colorantes naturales como rojo cochinilla (3 kJ/mol, 50-90 °C) (Fernández-López *et al.*, 2013), carotenoides (20 kJ/mol, 70-105 °C) (Ahmed *et al.*, 2002), betacianinas (38-53 kJ/mol, 50-120 °C) (Moßhammer *et al.*, 2006) y antocianinas (59 kJ/mol, 60-90 °C) (Wang y Xu, 2007).

Como resultados más relevantes del capítulo podemos resaltar que la industria alimentaria demanda colorantes naturales amarillos de naturaleza hidrosoluble. Dado que el procesado de los alimentos puede conllevar su tratamiento térmico, es necesario conocer el comportamiento frente a la temperatura de los colorantes con objeto de prevenir posibles degradaciones de color y optar por el más adecuado según el alimento en cuestión. Las investigaciones realizadas determinan que el extracto de betaxantinas de *Opuntia* presenta una cierta termolabilidad que desaconseja su empleo en alimentos cuyo procesado precise temperaturas superiores a 30 °C. No obstante este colorante

presenta un color amarillo brillante característico, estable bajo condiciones controladas de temperatura, por lo que los frutos de *Opuntia* pueden considerarse materia prima de un extracto colorante amarillo natural para uso en alimentos como bebidas refrescantes, yogures, helados, postres, etc., que no precisen elevadas temperaturas en su elaboración.

Para completar el estudio sería interesante conocer el comportamiento del extracto colorante en algún alimento con objeto de descartar posibles interacciones e incompatibilidades con determinados compuestos de las matrices alimentarias donde se incorporen.

4.8. INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO COLORANTE EN ALIMENTOS MODELO.

La proyección tecnológica del colorante obtenido a base de betaxantinas de *Opuntia* va a venir determinada tanto por la estabilidad térmica del mismo, como por su comportamiento al ser incorporado en determinadas matrices alimentarias, en las que va a poder interactuar o no con otros componentes allí presentes y como consecuencia experimentar posibles cambios que modifiquen sus propiedades, alteren el alimento y lo desmerezcan, llegando a desaconsejar su empleo.

Un requisito que debe cumplir un colorante alimentario es la estabilidad, tanto frente a los procesos industriales de elaboración, también frente a las condiciones de pH y a las posibles interacciones con otros constituyentes del alimento en que se aplique. Es conocido que la estabilidad de las betalaínas depende principalmente del pH, luz, oxígeno y temperatura (Azeredo, 2009). En cuanto al pH, se muestran estables en un rango amplio de valores (entre 3 y 7), en el caso concreto de las betaxantinas su estabilidad máxima se da entre pH 4 y pH 6 (Gandía-Herrero et al., 2010), lo que les hace especialmente aptas para ser empleadas en un amplio espectro de alimentos de acidez baja o neutra. También se conoce su fotosensibilidad, agravada si la atmósfera de conservación es aerobia. En condiciones anaerobias su degradación es insignificante (Gandía-Herrero et al., 2010). En el capítulo anterior hemos comprobado que la termoestabilidad es el factor que más puede restringir su empleo como colorante alimentario. Temperaturas superiores a 30 °C aceleran su proceso degradativo y provocan su decoloración progresiva.

Estas propiedades, junto a su carácter hidrosoluble, son las que van a determinar los alimentos en los que va a ser factible su empleo. En principio, los alimentos más adecuados para su aplicación como colorante serían productos lácteos, tales como yogures, batidos, margarinas, etc.; postres, y bebidas

refrescantes. Estos alimentos se conservan bajo refrigeración, además su fecha de consumo preferente no es demasiado larga, por lo que es previsible que el extracto colorante de betaxantinas de *Opuntia* pueda tener un comportamiento óptimo en estas matrices alimentarias.

Para el ensayo en alimentos modelo se han elegido dos matrices alimentarias típicas, una en base acuosa y otra de naturaleza láctea. Por un lado se ha seleccionado una típica bebida refrescante, elaborada a base de agua, azúcar, ácido cítrico, ácido ascórbico y sorbato potásico. En segundo lugar se seleccionó un yogur azucarado. En ambos alimentos se añadió cierta cantidad de extracto colorante hasta conseguir un color típico de cualquier producto de este tipo que se puede encontrar en el mercado.

La estabilidad del colorante en el alimento se ha determinado en función de la evolución de las coordenadas de color. Cambios significativos en sus coordenadas colorimétricas y en su diferencia de color total (ΔE^*) implican la alteración del color inicial a consecuencia de la degradación de los pigmentos presentes.

Se ensayaron dos extractos colorantes en polvo preparados de manera idéntica a partir de frutos de *Opuntia* distintos y los resultados se presentan de modo independiente.

Tabla 4.40. Evolución en el tiempo de las coordenadas de color en el yogur adicionado con el extracto de *Opuntia* I.

TIEMPO (días)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	88.12	-2.25	12.72	--
7	88.21	-2.29	12.12	0.61
14	87.82	-2.63	12.94	0.53
21	88.34	-2.39	12.25	0.54
28	88.14	-2.51	12.48	0.35

La Tabla 4.40 presenta los valores de las coordenadas colorimétricas y diferencias de color experimentadas por el yogur adicionado del extracto de *Opuntia* I. Los resultados obtenidos reflejan que las modificaciones de la coordenada b^* (amarillo-azul) son mínimas y los valores de ΔE^* , muy inferiores a 1 en todos los casos, incluso después de transcurridas 4 semanas del inicio del experimento. En la bibliografía se admite que con valores de ΔE^* inferiores a 1 el ojo humano no es capaz de observar diferencias de color (Johnston y Kao, 1989). En la Fig. 4.40 se observa que las diferencias de color son inapreciables entre la muestra inicial y final.

Figura 4.40. Muestras de yogur coloreadas con el extracto de *Opuntia* I.

Figura 4.41. Muestras de yogur coloreadas con el extracto de *Opuntia* II.

Los resultados obtenidos con el extracto de *Opuntia* II fueron coincidentes con los del extracto I. La Fig. 4.41 presenta las muestras de yogur adicionadas con este segundo extracto colorante, sin apreciarse diferencias con respecto al primer yogur preparado. La Tabla 4.41 muestra la valoración objetiva del color en este segundo ensayo. La evolución del color con el tiempo es muy estable y el valor de ΔE^* inferior a 1 en todos los casos, por lo que el color del alimento transcurridas 4 semanas es prácticamente igual al momento de inicio del estudio. Esto indica que la degradación de los pigmentos dentro de la matriz alimentaria ha sido muy poco importante, en efecto imperceptible al ojo humano.

En este segundo caso sí se observa una ligera tendencia decreciente en los valores de la coordenada b^* y un ligero aumento de la coordenada a^* . Esto puede indicar que, aunque las consecuencias aún no son perceptibles visualmente, sí que se está empezando a producir una alteración de los pigmentos de este colorante dentro de la matriz alimentaria.

Tabla 4. 41. Evolución en el tiempo de las coordenadas de color en el yogur adicionado con el extracto de *Opuntia* II.

TIEMPO (días)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	87.43	-3.56	19.20	--
7	87.28	-3.23	18.83	0.52
14	87.52	-2.93	18.71	0.80
21	87.48	-2.88	18.76	0.81
28	87.11	-2.90	18.57	0.97

Es de reseñar que en los dos ensayos realizados con yogur el pH se mantuvo estable en 4.3 y que ninguna muestra presentó síntomas de contaminación microbiana.

La utilización del extracto de betaxantinas de *Opuntia* sobre una bebida refrescante modelo y su posterior seguimiento durante 4 semanas, refleja también un buen comportamiento del colorante y una baja degradación de los pigmentos presentes. Las dos bebidas preparadas presentaron un pH de 3.0. Aunque la desviación de color es algo mayor que la observada en el yogur azucarado, se puede decir que sigue siendo una ligera diferencia asumible.

Tabla 4. 42. Evolución en el tiempo de las coordenadas de color en la bebida refrescante adicionada con el extracto de Opuntia I.

TIEMPO (días)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	28.38	-0.03	11.67	--
7	26.50	-0.10	11.50	1.89
14	28.22	0.06	11.09	0.61
21	28.83	0.24	11.05	0.81
28	26.94	-0.06	11.21	1.51

Tabla 4. 43. Evolución en el tiempo de las coordenadas de color en la bebida refrescante adicionada con el extracto de Opuntia II.

TIEMPO (días)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*
0	36.48	-2.84	11.54	--
7	35.61	-2.50	11.72	0.95
14	35.99	-2.63	11.29	0.59
21	35.89	-2.37	11.15	0.85
28	34.23	-2.58	11.86	2.29

En la bebida refrescante también fue similar el comportamiento de los extractos de *Opuntia* I y II (Tablas 4.42 y 4.43). La diferencia más significativa se puede encontrar en la luminosidad (L^*) de las muestras, algo más alta en el caso de

la bebida elaborada con el extracto II. En el resto de parámetros el comportamiento fue prácticamente idéntico. La diferencia total de color sí fue ligeramente superior en la bebida refrescante comparada con la obtenida en el yogur, aquí los valores de ΔE^* fueron de 1.5 y 2.3, pero se admite que diferencias de color entre 0 y 1.5 se consideran mínimas y las muestras son visualmente idénticas, en el rango entre 1,5 y 5.0 la diferencia de color es visualmente diferenciable y para ΔE^* superiores a 5.0 la diferencia de color es muy apreciable.

Figura 4.42. Bebida refrescante elaborada con extracto de *Opuntia* I.

Figura 4.43. Bebida refrescante elaborada con extracto de *Opuntia* II

Las diferencias visuales en la bebida refrescante se pueden observar en las Fig. 4.42 y 4.43.

Los datos de color muestran que en esta matriz alimentaria, aun con la presencia de ácido ascórbico, que previene al colorante de sufrir degradaciones oxidativas se ha producido una mayor alteración del color. Esto puede deberse a que como la bebida es transparente, la penetración de la luz es mayor y esto puede afectar a la estabilidad del colorante. A diferencia de la bebida, el yogur es un alimento opaco, por lo que la penetración de la luz a través del envase es menor y los pigmentos se encuentran más protegidos. Por ello la variación de las coordenadas de color es menor. Aun así se puede concluir que el comportamiento del colorante sobre la bebida es adecuado, con desviación de color poco significativa.

Se observa que la aplicación del extracto colorante de betaxantinas de *Opuntia* en los alimentos modelo ensayados resulta eficaz ya que además de proporcionar tonos de color consistentes y estables en el tiempo, se dispersa uniformemente en las matrices alimentarias sin sangrado ni precipitación en el tiempo.

5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- Ante el hecho de la demanda por el mercado de colorantes naturales amarillos de naturaleza hidrosoluble se estima de interés investigar la obtención, caracterización y proyección tecnológica de un nuevo colorante a partir de frutos de *Opuntia*.
- Se seleccionan frutos de *Opuntia ficus-indica* de coloración amarilla intensa como materia prima para la obtención de un extracto colorante natural para uso alimentario. Los pigmentos responsables de su coloración, las betaxantinas, se caracterizan por ser pigmentos vacuolares de naturaleza hidrofílica, y por tanto fácilmente dispersables en matrices alimentarias acuosas.

- Los tres extractantes ensayados (EtOH, agua y agua/EtOH) resultan aptos y permiten la extracción de prácticamente todas las betaxantinas presentes en el fruto, aunque seleccionamos la mezcla hidrolacohólica como extractante óptimo por ser su rendimiento ligeramente superior.
- El estudio cromatográfico del extracto colorante permite la detección de ocho betaxantinas, destacando como mayoritario el indicaxanteno. También se identifican muscaarina VII, vulgaxantina I, vulgaxantina II, GABA-betaxantina, metionina-betaxantina, serina-betaxantina y miraxantina V. Estas betaxantinas se ve acompañadas, aunque en escasa cantidad, de betanina, pigmento rojo característico del grupo de las betacianinas.
- Por primera vez se identifica miraxantina V (dopamina-betaxantina) en frutos de *Opuntia*. Hasta la fecha solo se había reportado presente en flores de *Mirabilis jalapa* y en *Beta vulgaris*.
- Por evaporación rotativa a presión reducida y baja temperatura (35 °C) se consigue concentrar el extracto, incrementando su poder colorante proporcionalmente al factor de concentración, hasta alcanzar una concentración de 0.27 g/L de betaxantinas sin deterioro en las propiedades del colorante.
- El análisis de sustancias bioactivas ha permitido cuantificar la presencia de carotenoides, fenoles totales y flavonoides en el extracto colorante. Los resultados obtenidos confirman el efecto beneficioso adicional del colorante debido a la presencia de estas sustancias bioactivas.
- Durante el proceso de microencapsulación y secado por atomización se concluye que el agente encapsulante más óptimo es el Glucidex 6D, ya que permite obtener un mejor rendimiento en la atomización y un colorante en polvo de mejor calidad. De las distintas proporciones de Glucidex 6D empleadas se demuestra que la proporción 1.0 entre zumo colorante y encapsulante es la óptima, pues permite obtener un mejor rendimiento durante el proceso de

atomización, reduciendo la naturaleza higroscópica del polvo colorante obtenido.

- Los ensayos de termosensibilidad en el rango (30 °C – 90 °C) revelan que la temperatura es uno de los factores que más afectan la estabilidad de estos pigmentos. Los estudios confirman que el proceso de termodegradación se puede modelar mediante una cinética de pseudo primer orden, del que se pueden obtener las correspondientes constantes de velocidad (k) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$).
- Al comparar la estabilidad a la temperatura del colorante obtenido frente a la de otros colorantes naturales amarillos presentes en el mercado como luteína, curcumina, β -caroteno, riboflavina y amarillo gardenia, se comprueba que a temperaturas superiores a 30 °C el extracto de *Opuntia* experimenta procesos degradativos irreversibles que afectan de modo notable su capacidad colorante.
- La incorporación del extracto colorante en alimentos modelo (yogur y bebida refrescante) resulta efectiva, y además de proporcionar en ambos casos tonos de color consistentes y estables en el tiempo, se dispersa uniformemente en las matrices alimentarias sin sangrado ni precipitación durante el tiempo de conservación.

6. Referencias Bibliográficas

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2002). *Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism*. Nutrition, 18: 75–81.
- Ahmed, J., Shivhare, U.S., Sandhu, K.S. (2002). *Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree*. Journal of Food Science, 67: 2692–2695.
- Albano, C., Negro, C., Tommasi, N., Gerardi, C., Mita, G., Miceli, A., De Bellis, L., Blando, F. (2015). *Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [Opuntia ficus-indica (L.) Mill.] fruits from Apulia (South Italy) genotypes*. Antioxidants, 4: 269–280.
- Allegra, M., Furtmuller, P.G., Jantschko, W., Zederbauer, M., Tesoriere, L., Livrea, M.A., Obinger, C. (2005). *Mechanism of interaction on betanin and indacaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 332: 847–844.
- Ames, J.M., Arnoldi, A., Bates, L., Negroni, M. (1997). *Analysis of the methanol-extractable non-volatile Maillard reaction products of a model extrusion-cooked cereal product*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 1256–1263.
- Anderson, E.F. (2001). *The cactus family*. Timber Press, Portland, Oregon.
- Anese, M., Manzocco, L., Nicoli, M.C., Lerici, C.R. (1999). *Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 750–754.

- Arnoldi, A., Corain, E., Scaglioni, L., Arnes, J. (1997). *New coloured compounds from Maillard reaction between xylose and lysine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 650–655.
- Ashwell, M. (2003). *ILSI Europe Concise Monograph on Concepts of Functional Foods*, The International Life Sciences Institute, Washington, DC.
- Atef, A.M., Abou-Zaid, N., Ibrahim, I., Mostafa, T., Nadir, A. (2013). *Quality evaluation of sheets, jam and juice from prickly pear and melon blends*. Life Science Journal, 10: 200–208.
- Attoe, E.L., von Elbe, J.H. (1985). *Oxygen involvement in betanine degradation: effect of antioxidants*. Journal of Food Science, 50: 106–110.
- Azeredo, H. (2009). *Betalains: properties, sources, applications and stability – a review*. International Journal of Food Technology, 44: 2365–2376.
- Baldassano, S., Rotondo, A., Serio, R., Livrea, M.A., Tesoriere, L., Mulé, F. (2011). *Inhibitory effects of indicaxanthin on mouse ileal contractility: analysis of the mechanism of action*. European Journal of Pharmacology, 658: 200–205.
- Barber, M., Ross, J., Fearon, K. (1999). *Changes in nutritional, functional, and inflammatory markers in advanced pancreatic cancer*. Nutrition and Cancer, 35: 106–110.
- Barberá, G. (1999). *Historia e importancia económica y agroecológica*. En: Agroecología, Cultivo y Usos del Nopal. G. Barberá, P. Inglese y E. Pimienta Barrios Eds. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal, 132. Roma.
- Barrera, H., Ureña-Núñez, F., Bilyeu, C., Barrera-Díaz, C. (2006). *Removal of chromium and toxic ions present in mine drainage by ectodermis of Opuntia*. Journal of Hazardous Materials, 136: 846–853.
- Bouvier, F., Dogbo, O., Camara, B. (2003). *Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annato)*. Science, 300: 2089–2091.
- Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J., Decker, E.A. (2010). *Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 50: 515–532.
- Britton, G. (1996). *Carotenoids*. En: Natural Food Colorants. G.A.F. Hendry y J.D. Houghton Eds. Blackie Academic & Professional, Londres.
- Buescher, R., Yang, L. (2000). *Turmeric*. En: Natural Food Colorants. G.J. Lauro y F.J. Francis Eds. Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Burrows, A. (2009). *Palette of our palates: a brief history of food coloring and its regulation*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8: 394–408.
- Butera, D., Tesoriere, L., Di Gaudio, F. (2002). *Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (Opuntia ficus-indica) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 6895–6901.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. (1998). *Colourant properties and stability of Amaranthus betacyanin pigments*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 4491–4495.
- Cai, Y., Sun, M., Corke, H. (2003). *Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 2288–2294.

- Cai Y., Sun, M., Corke, H. (2005). *Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae*. Trends in Food Science and Technology, 16: 370–376.
- Cardello, A.V. (1994). *Consumer expectations and their role in food acceptance*. En: Measurement of Food Preferences, H.J. Mc Fie y D.M.H. Thompson Eds. Blackie Academic & Professional, Londres.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, L., Páez-Hernández, E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009). *Chemical studies of anthocyanins: a review*. Food Chemistry, 113: 859–871.
- Castellanos-Santiago, E.M., Yahia, E.M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 5758–5764.
- Castellar R., Obón J.M., Alacid M., Fernández-López J.A. (2003). *Color properties and stability of betacyanins from Opuntia fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 2772–2776.
- Castellar, M.R., Obón, J.M., Fernández-López, J.A. (2006). *The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colorant from Opuntia stricta fruits*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 122–128.
- Castellar, M.R., J. M. Obón, M. Alacid, J. A. Fernández-López. (2008) *Fermentation of Opuntia stricta (Haw.) fruits for betalains concentration*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 4253–4257.
- Champagne, C. and Fustier, P. (2007). *Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods*. Current Opinion in Biotechnology, 18: 184–190.
- Chen, L., Wu, Remondetto, G.E., Subirade, M. (2010). *Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems*. Trends in Food Science and Technology, 17: 272–283.
- Chen, Z., Wu, J. F., Fernando, S., Jagodzinski, K. (2011). *Soy-based, high biorenewable content UV curable coatings*. Progress in Organic Coatings, 71: 98–109.
- Clinton, S. K. (1998). *Lycopene: Chemistry, Biology and Implications for Human Health and Disease*. Nutrition Reviews, 56: 35–51.
- Coulate, T.P. (1988). *Food, the chemistry of its components*. Royal Society of Chemistry, Londres.
- Counsell, J.N., Jeffries, G.S., Knewstubb, C.J. (1979). *Some other natural colors and their applications*. En: Natural Colors for Foods and Other Uses. J.N. Counsel y J.A. Dunastable Eds., Applied Science, Londres.
- Cubero, N., Monferrer, A., Villalta, J. (2002). *Aditivos Alimentarios*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid.
- Dalzell, J.M. (1997). *LFRA Ingredients Handbook, Food Colours*, Leatherhead Food RA, Londres.
- De Almeida, M.M., Alcántara, M.R., Herbster, C.F., Enéas, F. (2012). *Bioactive compounds and total antioxidant capacity of cashew apples (Anacardium occidentale L.) during the ripening of early dwarf cashew clones*. Ciencia Agrotecnia Lavras, 36: 325–332.
- De Ancos, B., Ibañez, E., Reglero, G, Pilar-Cano, M. (2000). *Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 873–879.

- Dehbi, F., Hasib, A., Bouasiz, M., Ouattmane, A., Elbatal, H., Jaouad, A., Syadi, S. (2013). *Effect of phenolic compounds and betalain pigments on the antioxidant capacity of Moroccan prickly pear juices*. *Nature and Technology*, 9: 2–7.
- Delgado–Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes–López, O. (2000). *Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 173–289.
- Delgado–Vargas, F., Paredes–López, O. (2003). *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. CRC Press Boca Raton, Florida.
- DeMann, J.M. (1980). *Principles of Food Chemistry*, AVI Publishing Company, Westport, Connecticut.
- Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005). *Recent development in microencapsulation of food ingredients*. *Drying Technology*, 23: 1361–1394.
- Díaz–Medina, E.M., Rodríguez–Rodríguez, E.M., Díaz–Romero, C. (2007). *Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus–indica* fruits*. *Food Chemistry*, 103: 38–45.
- Downham, A., Collins, P. (2000). *Colouring our foods in the last and next millennium*. *International Journal of Food Science and Technology*, 35: 5–22.
- Drago, M.E., López, M., Sainz, T.R. (2006). *Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 4: 58–68.
- Dufossé, L. (2006) *Microbial Production of food grade pigment*. *Food Technology and Biotechnology*, 44: 313–321.
- El–Gharras, H., Hasib, A. Jaouad, A., El–Bouadili, A., Schoefs, B. (2008). *Stability of vacuolar betaxantin pigments in juices from Moroccan yellow *Opuntia ficus–indica**. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 351–356.
- El–Mannoubi, I., Barrek, S., Skanji, T., Casabianca, H., Zarrouk, H. (2009). *Characterization of *Opuntia ficus–indica* seed oil from Tunisia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45: 616–620.
- El–Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M.S., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., Cherkaoui–Malki, M. (2014). *Nopal cactus (*Opuntia ficus–indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease*. *Molecules*, 19: 14879–14901.
- Escribano, J., Pedreño, M.A., García–Carmona, F., Muñoz, R. (1998). *Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots*. *Phytochemical Analysis*, 9: 124–127.
- Fernández–López, J.A., Almela, L. (2001). *Application of high–performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits*. *Journal of Chromatography A*, 913: 415–420.
- Fernández–López, J.A., Castellar R., Obón J.M., Almela L. (2002a). *El higo chumbo: fuente de pigmentos*. *Investigación y Ciencia*, 313: 34–35.
- Fernández–López J.A., Castellar R., Obón J.M., Almela L. (2002b). *Screening and mass–spectral confirmation of betalains in cactus pear*. *Chromatographia*, 56: 591–595.
- Fernández–López, J.A., Almela, L., Obón, J.M., Castellar, R. (2010). *Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65: 253–259.

- Fernández-López, J.A., Giménez, P.J., Angosto, J.M., Moreno, J.I. (2012). *A process of recovery of a natural yellow colourant from Opuntia fruits*. Food Technology and Biotechnology, 50: 246–251.
- Fernández-López, J.A., Giménez, P.J. (2013). *Betalainas: colorantes naturales bioactivos*. Investigación y Ciencia, 445: 10–12.
- Fernández-López, J.A., Angosto, J.M., Giménez, P.J., León, G. (2013). *Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants*. Plant Foods for Human Nutrition, 68: 7–11.
- Fernández-Rubio, J., Martínez, V. (1983). *El cultivo de la chumbera para la producción de higos de retallo*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Hojas Divulgadoras 15: 1–83.
- Ferrer, A., Marco, F.M., Andreu, C. (2005). *Occupational asthma to carmine in a butcher: analysis of the literature on allergy to carmine*. International Archives of Allergy and Immunology, 158: 243–250.
- Feugang, J.M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F.C., Zou, C. (2006). *Nutritional and medicinal use of cactus pear (Opuntia spp.) cladodes and fruits*. Frontiers in Bioscience, 11: 2574–2589.
- Flores-Hernández, A., Orona-Castillo, I., Murillo-Amador, B., García Hernández, J.L., Troyo-Díez, E. (2004). *Yield and physiological traits of prickly pear cactus nopal (Opuntia spp.) cultivars under drip irrigation*. Agricultural Water Management, 70: 97–107.
- Francis, F.J. (1999). *Colorants. Practical Guides for the food industry*. American Association of Color Chemists. Eagan Press, St. Paul, Minnesota.
- Francis, F.J., Clydesdale, F.M. (1975). *Food colorimetry: theory and applications*, Avi Publishing Company Inc., Westport, Connecticut.
- Francis, F.J., Lauro, G.S. (2000). *Natural food colorants. Science and technology*. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.
- Fратиanni, A., Albanes, D., Mignogna, R., Cinquanta, L., Panfili, G., Di Matteo, M. (2013). *Degradation of carotenoids in apricots (Prunus armeniaca) during drying process*. Plant Foods for Human Nutrition, 68: 241–246.
- Frick, D. (2003). *The coloration of food*. Review of Progress in Coloration and Related Topics, 33: 15–32.
- García-Barrera, F.A., Reynoso, C.R., González de Mejía, E. (1998). *Estabilidad de las betalainas extraídas del garambullo (Myrtillocactus geometrizans)*. Food Science and Technology International, 4: 115–120.
- Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F. (2005). *Characterization of the monophenolase activity of tyrosinase on betaxanthins: the tyramine–betaxanthin/dopamine–betaxanthin pair*. Planta, 222: 307–318.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., Escribano, J. (2010). *Stabilization of the bioactive pigment of Opuntia fruits through maltodextrin encapsulation*. Journal of Agriculture Food Chemistry, 58: 10646–10652.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F. (2013). *Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments*. Trends in Plant Science, 18: 334–343.

- Garzón, G. (2008). *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión*. Acta Biológica Colombiana, 13: 27–36.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chanbin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). *Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview*. Food Research International, 40: 1107–1121.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. Hess-Pierce, B. Kader, A.A. (2002). *Antioxidants capacities, phenolic compounds, carotenoids and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 4976–4982.
- Gordon, H.T., Bouernfeind, J.C. (1982). *Carotenoids as food colorants*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 18: 59–97.
- Goud, K., Desai, H., Park, J. (2005). *Recent developments in microencapsulation of food ingredients*. Drying Technology, 23: 1361–1394.
- Gouin, S. (2004). *Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends*. Trends in Food Science and Technology, 15: 330–347.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C.G., Kallithraka, S., Kefalas, P., Garcia-Viguera, C. (2003). *Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition*. Food Chemistry, 83: 423–436.
- Griffiths, J. C. (2005). *Coloring foods and beverages*. Food Technology, 59: 38–44.
- Hendry, G.A.F. (1996). *Chlorophylls and chlorophyll derivatives*. En: Natural Food Colorants. G.A.F. Hendry y J.D. Houghton, Eds. Blackie Academic & Professional, Londres.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2006). *Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hylocerenin solutions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 390–398.
- Heuer, S., Richter, S., Metzger, J.W., Wray, V., Nimtz, M., Strack, D. (1994). *Betacyanins from bracts of Bougainvillea glabra*. Phytochemistry, 37: 761–767.
- Hodge, J.E. (1953). *Chemistry of browning reactions in model systems*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1: 928–943.
- Hogan, S.A., McNamee, B. F., O’Riordan, E.D., O’Sullivan, M. (2001). *Microencapsulating properties of sodium caseinate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 1934–1938.
- Houssier, C., Saver, K. (1970). *Circular dichroism and magnetic dichroism of the chlorophyll and photochlorophyll pigments*. Journal of the American Chemical Society, 92: 781–782.
- Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F., Knorr, D. (1989). *Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms*. Food Technology, 43: 99–107.
- Huang, A.S. y von Elbe, J.H. (1985). *Kinetics of the degradation and regeneration of betanine*. Journal of Food Science, 51: 670–674.
- Hutchings, J. (1999). *Food color and appearance*. M.D. Gaithersburg Eds., Aspen Publishers, Nueva York.
- Hutchings, J. (2006). *Talking about colour and ethics*. Color Research and Applications, 31: 87–89.
- Jackman, R.L., Smith, J.L. (1996). *Anthocyanins and betalains*. En: Natural Food Colorants, G.A.F. Hendry y J.D. Houghton Eds. Blackie Academic & Professional, Londres.

- Johnston, W.M., Kao, E.C. (1989). *Assessment of appearance match by visual observation and clinical colorimetry*. Journal of Dental Research, 68: 819–822.
- Johnston, D.E. (1992). *High pressure*. En: The Chemistry of Muscle-Based Foods. D.E. Ledward–Johnston y M.K. Knight Eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Kamuf, W., Nixon, A., Parker, O. (2000). *Caramel color*. En: Natural Food Colorants. G.J. Lauro y F.J. Francis Eds. Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Kanner, J., Harel, S., Granit, R. (2001). *Betalains – a new class of dietary cationized antioxidants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 5178–5185.
- Kapadia, G.J., Azuine, M.A., Sridhar, R. (2003). *Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot*. Pharmacological Research, 47: 141–148.
- Kobayashi, N., Schmidt, J., Wary, V., Schliemann, W. (2001). *Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins*. Phytochemistry, 56: 429–436.
- Kugler, F., Graneis, S., Stintzing, F.C., Carle, R. (2007a). *Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae*. Journal of Biosciences, 62: 311–318.
- Kugler, F., Stintzing, F.C., Carle, R. (2007b). *Evaluation of the antioxidant capacity of betalainic fruits and vegetables*. Journal of Applied Botany and Food Quality, 81: 69–76.
- Kujala, T., Loponen, J., Pihlaja, K. (2001). *Betalains and phenolics in red beetroot (Beta vulgaris) peel extracts: extraction and characterization*. Zeitschrift für Naturforschung, 56: 343–348.
- Kuti, J.O. (2004). *Antioxidant compounds from four Opuntia cactus pear fruit varieties*. Food Chemistry, 85: 527–533.
- Leathers, R.R., Davin, C., Zryd, J.P. (1992). *Betalain producing cell cultures of Beta vulgaris L. var. Bikores monogerm (red beet)*. In vitro Cellular and Developmental Biology, 28: 39–45.
- Loksuwan, J. (2007). *Characteristics of microencapsulated β -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin*. Food Hydrocolloids, 21: 928–935.
- López, D. (2010). *Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión*. Revista Cubana de Farmacia, 44: 381–389.
- Lozano, M. (2009). *Obtención de microencapsulados funcionales de zumo de Opuntia stricta mediante secado por atomización*. PFC. Universidad Politécnica de Cartagena.
- Massey, V. (2000). *The chemical and biological versatility of riboflavin*. Biochemical Society Transactions, 28: 283–296.
- Matsuhiro, B., Lillo, L., Sáenz, C., Urzúa, C., Zárate, O. (2006). *Chemical characterization of the mucilage from fruits of Opuntia ficus-indica*. Carbohydrate Polymers, 63: 263–267.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J.O., Stevenson, J. (2007). *Food additives and hyperactive behavior in 3-year-old and 8/9-year-old children*. The Lancet, 370: 1560–1567.

- Minemoto, Y., Hakamata, K., Adachi, S., Matsuno, R. (2002). *Oxidation of linoleic acid encapsulated with gum arabic or maltodextrin by spray-drying*. Journal of Microencapsulation, 19: 181–189.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Pérez-Gálvez, A., Hornero-Méndez, D. (2005). *Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples colorantes naturales*. CTC Alimentación: 26, 108–113.
- Moßhammer, M.R., Rohe, M., Stintzing, F. C., Carle, R. (2007). *Stability of yellow orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill. Cv. 'Gialla') betalains as affected by the juice matrix and selected food additives*. European Food Research and Technology, 225: 21–32.
- Moussa-Ayoub, T., El-Samahy, S., Kroh, L.W., Rohn, S. (2011). *Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation*. Food Chemistry, 124: 1177–1184.
- Muñoz-Muñoz, J.L., García-Molina, F., Varón, R., Tudela, J., García-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N. (2011). *Kinetic cooperativity of tyrosinase. A general mechanism*. Acta Biochimica Polonica, 58: 303–311.
- Nobel, P.S., Garcia-Moya, E., Quero, E. (1992). *High annual productivity of certain agaves and cacti under cultivation*. Plant Cell and Environment, 15: 329–335.
- Nobel, P.S. (1999). *Biología ambiental*. En: Agroecología, Cultivo y Usos del Nopal. G. Barberá, P. Inglese y E. Pimienta Barrios Eds. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal, 132. Roma.
- Nobel, P.S., Bobich, E.G. (2002). *Plant frequency, stem and root characteristics, and CO₂ uptake for *Opuntia acanthocarpa*: elevational correlates in the northwestern Sonoran desert*. Oecologia, 130: 165–172.
- Obón, J.M., Castellar, M.R., Alacid, M., Fernández-López, J.A. (2009). *Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems*. Journal of Food Engineering, 90: 471–479.
- O'Neill, S., Gould, K.S., Kilmartin, P.A., Mitchell, K.A., Markham, K.R. (2002). *Antioxidant capacities of green and cyanic leaves in the sun species, *Quintinia serrata**. Functional Plant Biology, 29: 1437–1443.
- Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnell, C., Tiwari, B.K., (2010). *Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation*. Trends in Food Science and Technology, 57: 640–644.
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., Ilieva, M. (2002). *Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures*. Zeitschrift für Naturforschung, 57: 640–644.
- Pimienta, E. (1997). *Suculentas mexicanas/cactáceas. El nopal en México y el mundo. Departamento de Ecología*. Centro de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. CVS Publicaciones. Guadalajara.
- Proudlove, R.K. (1994). *The Science and Technology of Foods*. Forbes Publications, Londres.
- Rao, A.V., Rao, L.G. (2007). *Carotenoids and human health*. Pharmacological Research, 55: 207–216.

- Reynoso, R., Garcia, F.A., Morales, D., Gonzalez de Mejia, E. (1997). *Stability of betalain pigments from a cactacea fruit*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2884–2889.
- Ribeiro, B., Barreto, D., Coelho, M. (2011). *Technological aspects of β –carotene production*. Food and Bioprocess Technology, 4: 693–701.
- Robert, P., Carsson, R., Romero, N., Masson, L. (2003). *Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (Rosa rubiginosa) oleoresin*. Journal of the American Oil Chemists Society, 80: 115–1120.
- Rodríguez–Amaya, D.B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. ILSI Human Nutrition Institute Press. Washington D.C.
- Sáenz, C. (2000). *An alternative for cactus pear (Opuntia spp.) fruits and cladodes*. Journal of Arid Environments, 46: 209–225.
- Sáenz, C. (2006). *Opuntia spp. bioactive compounds in foods: a plus for health*. Acta Horticulturae, 728: 231–233.
- Sáenz, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). *Microencapsulation by spray drying bioactive compounds from cactus pear (Opuntia ficus–indica)*. Food Chemistry, 114: 616–622.
- Sasaki, N., Wada, K., Koda, T., Kasahara, K., Adahi, T., Ozeki, Y. (2005). *Isolation and characterization of cDNAs encoding an enzyme with glucosyltransferase activity for cyclo–dopa from four o’clocks and feather cockscombs*. Plant and Cell Physiology, 46: 666–670.
- Sawaya, W.N., Khatchadourian, H.A., Safi W.M, Al–Muhammad, H.M. (1983). *Chemical characterization of prickly pear pulp, Opuntia ficus–indica, and the manufacturing of prickly pear jam*. Journal of Food Science and Technology, 18: 183–193.
- Scheinvar, L. (1995). *Taxonomía del género Opuntia*. En: Agroecología, Cultivo y Usos del Nopal. G. Barberá, P. Inglese y E. Pimienta Barrios Eds. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal, 132. Roma.
- Schliemann, W., Strack, D. (1998). *Intramolecular stabilization of acylated betacyanins*. Phytochemistry, 49: 585–588.
- Schoefs, B. (2002). *Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis*. Trends in Food Science and Technology, 13: 361–371.
- Schul, J. (2000). *Carmine*. En: Natural Food Colorants. G.J. Lauro y F.J. Francis Eds. Marcel Dekker, Nueva York.
- Schwartz, S.J., von Elbe, J.H. (1983). *Identification of betanin degradation products*. Zeitschrift für Lebensmittel–Untersuchung und –Forschung, 176: 448–453.
- Schwartz, S.J., Lorenzo, T. (1990). *Chlorophyll in food*. Food Science and Nutrition, 29: 1–13.
- Sepúlveda, E., Sáenz, C. (1990). *Características químicas y físicas de pulpa de tuna (Opuntia ficus–indica)*. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 30: 551–555.
- Sobkowska, E., Czapski, J., Kaczmarek, R. (1991). *Red table beet pigment as food colorant*. International Food Ingredients, 3: 24–28.

- Souza, T.C.R., Pariza, A.L., Brighente, I.M.C., Fávere, V.T., Laranjeira, M.C.M. (2005). *Chitosan microspheres containing the natural urucum pigment*. Journal of Microencapsulation, 22: 511–520.
- Stewart, E.M. (2001). *Food irradiation chemistry*. En: Food Irradiation: Principles and Applications R.A. Molins Eds. Wiley Intescience, Nueva York.
- Stahmann, J., Revuelta, L., Sculberger, H. (2000). *Biotechnical processes using Ashbya gossypii, Candida famata, Bacillus subtilis compete with chemical riboflavin production*. Applied Microbiology and Biotechnology, 53: 509–516.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. (2001). *Phytochemical and nutritional significance of cactus pear*. European Food Research and Technology, 212: 396–407.
- Stintzing, F.C., Schieber, A., Carle, R. (2002). *Identification of betalains from yellow beet (Beta vulgaris L.) and cactus pear [Opuntia ficus-indica (L.) Mill.] by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 2302–2307.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2004). *Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition*. Trends in Food Science and Technology, 15: 19–38.
- Stintzing, F., Herbach, K., Mosshammer, M., Carle, R., Sellappan, S., Akoh, C. Felker, P. (2005). *Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (Opuntia spp.) clones*. Journal Agricultural and Food Chemistry, 53: 442–451.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2006). *Cactus fruits – more than colour*. Fruit Processing, 16: 166–171.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2008). *Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications*. En: Food Colourants: Chemical and Functional Properties. C. Socaciu Eds., CRC Press, Boca Raton.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann, W. (2003). *Recent advances in betalain research*. Phytochemistry, 62: 247–269.
- Tesoriere, L., Butera, L., Allegra, M., Fazzari, M., Livrea, M.A. (2005). *Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1266–1270.
- Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Gentile, C., Livrea, M.A. (2007). *Kinetics of the lipoperoxyl radical-scavenging activity of indicaxanthin in solution and unilamellar liposomes*. Free Radical Research, 41: 226–233.
- Timberlake, C.F. (1980). *Anthocyanins—occurrence, extraction and chemistry*. Food Chemistry, 5: 69–80.
- Toor, R.K., Savage, G.P. (2005). *Antioxidant activity in different fractions of tomatoes*. Food Research International, 38: 487–494.
- Vaillant, F., Pérez, A., Dávila, I., Dornier, M., Reynes, M. (2005). *Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (Hylocereus sp.)*. Fruits, 60: 1–10.
- Wang, W.D., Xu, S.Y. (2007). *Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate*. Journal of Food Engineering, 82: 271–275.

- Wettasinghe, M., Bolling, B., Plhak, L., Xiao, H., Parkin, K. (2002). *Phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of beetroot (Beta vulgaris L.) extracts from phenotypes of different pigmentation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 6704–6707.
- Wissgott, U., Bortlik, K. (1996). *Prospects for new food colorants*. Trends in Food Science and Technology, 7: 289–302.
- Wong, D.W.S. (1989). *Mechanism and theory in food chemistry*. Van Nostran Reinhold, Nueva York.
- Wrolstad, R. E. (2000). *Anthocyanins*. En: Natural Food Colorants. F.J. Francis y G.J. Lauro, Eds., Marcel Dekker, Nueva York.
- Wrolstad, R.E. (2004). *Anthocyanin pigments – bioactivity and coloring properties*. Journal of Food Science, 69: 419–421.
- Wrolstad, R.E., Culver, C.A. (2011). *Alternatives to those artificial FD&C food colorants*. Annual Review of Food Science and Technology, 3: 59–77.
- Wu, L., Hsu, H.W., Chen, Y.C., Chiu, C.C., Lin, Y.I., Ho, J.A. (2006). *Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya*. Food Chemistry, 95: 319–327.
- Xiao-Hong, H., Zhao-Jian, G., Xing-Guo, X. (2009). *Enzymes and genes involved in the betalain biosynthesis in higher plants*. African Journal of Biotechnology, 8: 6735–6744.
- Yahía, E.M., Mondragón-Jacobo, C. (2011) *Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (Opuntia spp.)*. Food Research International, 44: 2311–2318.
- Yang, Z., Han, Y., Gu, Z., Fan, G., Chen Z. (2008). *Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (Zea Mays L.)*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 341–347.
- Yáñez, J., Salazar, J.A., Chaires, L., Jiménez, J., Márquez, M., Ramos, E.G. (2005) *Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación*. Avance y Perspectiva, 21: 313–319.
- Yaylayan, V.A., Kaminsky, E. (1998). *Isolation and structural analysis of Maillard polymers: caramel and melanoidin formation in glycine/glucose model system*. Food Chemistry, 63: 25–31.
- Yedes, N., Kalthoum, J., Trabelsi, M., Guyot, S., Sotin, H., Ayadi, M.T. (2013). *Comparative study of antioxidant power, polyphenols, flavonoids and betacyanins of peel and pulp of three Tunisian Opuntia forms*. Antioxidants, 2: 37–51.
- Zabetakis, I., Leclerc, D., Kajala, P. (2000). *The effect of high hydrostatic pressure on the strawberry anthocyanins*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2749–2754.
- Zakerhamidi, M.S., Ghanadzadeh, A., Moghadam, M. (2012). *Solvent effects on the UV/Visible absorption spectra of some aminoazobenzene dyes*. Chemical Science Transactions, 1: 1–8.
- Zou, D., Brewer, M., García, F. (2005). *Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention*. Nutrition Journal, 4: 25–37.

7. Anexos

7.1. ANEXO 1

Artículo 1

A process of recovery of a natural yellow colourant from *Opuntia* fruits.

Food Technology and Biotechnology 50, 246–251 (2012).

A Process of Recovery of a Natural Yellow Colourant from *Opuntia* Fruits

José A. Fernández-López*, Pedro J. Giménez, José M. Angosto and Juan I. Moreno

Department of Chemical and Environmental Engineering, Technical University of Cartagena (UPCT),
Paseo Alfonso XIII 52, E-30203 Cartagena, Murcia, Spain

Received: June 29, 2011
Accepted: March 2, 2012

Summary

This paper focuses on the development of a processing scheme to obtain a water-soluble natural yellow colourant from *Opuntia* fruits for application in food, paying special attention to the extraction procedure. Edible yellow *Opuntia* fruits grown in Murcia (Spain) were homogenized and extracted with ethanol, water, or ethanol/water (60:40) solvents. Pigment extract was chemically characterized and individual pigments were identified by high-performance liquid chromatography (HPLC), UV-VIS spectrophotometry, and electrospray ionization mass spectroscopy. A sequential extraction procedure was determined as follows: homogenization, stirring, centrifugation, filtration and concentration. The highest betaxanthin content per kg of fresh pulp (0.68 mmol of indicaxanthin) was obtained from the hydroalcoholic extract, and moreover, this solvent minimized the presence of mucilage and pectins, which are substances not desired in dye extracts. A concentrated pigment extract was obtained under rotary evaporation at 35 °C and reduced pressure (6 kPa), with a betaxanthin concentration (expressed as indicaxanthin) of 0.27 g/L, and CIELAB values of $L^*=92.7$, $a^*=-0.8$ and $b^*=68.5$. The individual pigment HPLC analysis with photodiode array and mass spectral detection revealed that proline-betaxanthin (indicaxanthin) was clearly dominant, while all other betalains were present in comparatively low quantities. The pigment stability was checked at 4 and 25 °C. Kinetics analyses indicate that the betaxanthin degradation pattern can be approximated as pseudo-first-order kinetics.

Key words: *Opuntia* sp., betalains, betaxanthins, indicaxanthin, natural food colourant

Introduction

Every food designer knows that consumers judge a product not only by its flavour, but by its appearance as well. Colour mainly defines the aesthetic value of food, predetermines consumer's expectation and modulates appetite (1). One important class of ingredients exists solely to enhance the appearance of what we eat: food colours. Colour is probably the most important factor in the acceptance of food products because it is used as an indicator of quality. In the last years synthetic colourants are increasingly being perceived as undesirable or harmful by consumers (2,3), and there is growing interest in the development of natural colourants for use in the food

industry, which has been encouraged by a strong consumer demand for natural products. Natural colours are commonly used in the food industry and this natural trend has become of increasing importance among consumers. The market for natural food colourants is estimated at US\$ 500 million, and is growing by 10 % per year. Food and drink manufacturers need a full range of natural colours to suit all applications, and this demand provides the opportunity for innovation and research in new sources of natural colourants (4,5).

Cactaceae is considered the most promising family among betalain-bearing plants to be used as a source of betaxanthins. *Opuntia* fruits are widely consumed in Central and Southern America, Australia, South Africa,

*Corresponding author; Phone: ++34 968 325 549; Fax: ++34 968 325 555; E-mail: josea.fernandez@upct.es

and the whole Mediterranean area. These plants may be found as spontaneous vegetation and grow in all of the semiarid countries, although cultivated cactus pears also reach the market (6). The main interest in *Opuntia* fruits is attributed to the betalain pigments due to the strong demand of the food industry for colourants obtained from natural sources (7–9), taking into account the interest of consumers for naturally derived products, associated with an image of health and quality.

Cactus pear fruits offer different colours based on betalains, which cover a wide spectrum from yellow to purple. Betalains are water-soluble, nitrogen-containing plant pigments of the order Caryophyllales. They comprise the yellow betaxanthins, and the red-purple betacyanins, both of which have betalamic acid in their basic structure, whose chromophore is a 1,7-diazaheptamethinium system, while they differ mainly in the radicals bonded to the main structure (10,11). Their colour is due to the conjugation of a substituted aromatic nucleus to the diaza system, which shifts the absorption maximum from around 535 nm in betacyanins to near 480 nm in betaxanthins (10). In cactus pear fruits (*Opuntia* sp.), these pigments are responsible for the purple, red, orange and yellow colours. Betalains are recognized as natural food colourants (12), and in contrast to other natural pigments, their appearance is maintained over a wide pH range (from 4 to 7). This property makes them ideal for colouring low acid foodstuff. Until now, only red beet (*Beta vulgaris*) has been used as a source of betalains, and other sources have not been considered for industrial use, despite the fact that several studies have been made concerning their presence and their stability in *Opuntia* fruits (13–15). Recently, there has been increasing interest in betalains since some studies have pointed to their possible antioxidant effects (16–18). If these investigations are confirmed, the added commercial value of these pigments will be increased due to the growing use of antioxidants in the food industry, not only for their usefulness in preservation but also because of their beneficial effects on human health.

The aim of this work is to establish a sequential process to obtain a concentrated betaxanthin extract from *Opuntia* fruits to be used as natural food colourant. A processing scheme was proposed paying special attention to the extraction procedure and to the chemical characterization and stability of the dye extract.

Materials and Methods

Plant material

Yellow-skinned cactus pear fruits (*Opuntia ficus-indica* L.) were harvested in Murcia (Spain) when the characteristic mature skin colour became manifest. The fruits of similar ripening degree were selected in order to have sample uniformity. The fruits were hand picked, separated into peel and pulp tissues, weighed, homogenized in a T25 basic ULTRA-TURRAX® (Ika-Werke, Staufen, Germany), frozen and stored at –25 °C until use.

Chemicals

Ethanol and acetonitrile were of HPLC grade and were purchased from Labscan (Dublin, Ireland). Water

was purified in a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, MA, USA). All other chemicals employed were of analytical grade.

Pigment extraction

Homogenized pulp was magnetically stirred for 20 min in darkness using a fruit/solvent ratio of 1:5 (by mass per volume). Water, ethanol and ethanol/water (60:40 by volume) were used as solvents. After stirring, the samples were centrifuged at 15 000×g at 10 °C for 10 min in a Z383K Hermle centrifuge (Wehingen, Germany) to remove the vegetal tissue residue. Supernatants were concentrated using a vacuum Büchi Rotavapor R-200 (Flawil, Switzerland). Temperature was controlled at 35 °C and vacuum at 6 kPa. Ethanol was completely removed after the concentration process.

Spectrophotometric analysis

The visible spectra (380–780 nm) of the extracts were recorded using an Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer (Waldbronn, Germany). Betaxanthin content was expressed as indicaxanthin (molar mass $M=308$ g/mol), applying a molar absorption coefficient $\epsilon=48\,000$ L/(mol·cm) (19). Concentration of individual betaxanthins was calculated by multiplying the spectrophotometrically assessed value with the relative chromatogram area of the particular betaxanthin at 470 nm.

Chemical analysis

Soluble solid content (°Brix) was measured using a Carl Zeiss (Tokyo, Japan) refractometer at 20 °C. Acidity was determined by titration with 0.1 M NaOH and expressed as mmol of citric acid per kg. The pH was measured with a Crison micropH 2000 pH meter (Madrid, Spain). Water content was determined using a Karl Fischer titrator DL38, Mettler (Toledo, Spain). All measurements were performed in triplicate.

HPLC analysis

Pigment analyses were performed in a Waters modular liquid chromatographic system (Waters, Milford, MA, USA) equipped with two M510 pumps, a 717 plus autosampler and an M996 photodiode array (PDA) detector. HPLC was run by Millennium 2010 Chromatography Manager data system. An Atlantis dC₁₈ 5 µm, 25 cm×4.6 mm i.d., column (Waters) was used. Elution was carried out following the method previously proposed (20), using a gradient between 175 mM acetic acid in water and 175 mM acetic acid in acetonitrile as mobile phase. The flow rate was 1 mL/min. Betaxanthins were monitored at 470 nm.

Betaxanthin stability

Storage stability studies of the concentrated pigment extract were performed at 25 and 4 °C in the dark. Samples were withdrawn at different time intervals and analyzed spectrophotometrically. Betaxanthin content was determined in triplicate for each sample. Storage stability was expressed in terms of half-life ($t_{1/2}$), the values of which were determined by calculating the ratio of betaxanthin content in the initial sample (B_0) and in the

samples maintained at 4 or 25 °C during a determined period of time (B_t). The natural logarithm of B_0/B_t ratio was plotted against the time (days) of storage. The slope of the graph through the origin obtained by connecting the data points was equated with k , from which the half-life values ($t_{1/2} = \ln 2/k$) were deduced.

Colour measurements

Based on the absorption measurements covering the range from 380 to 780 nm, objective colour (CIELAB) was calculated. The values (L^* , a^* , b^* , C^* and h°) were obtained using standard illuminant D_{65} and a 10° observer angle, according to the following expressions:

$$\begin{aligned} L^* &= 116(Y/Y_n)^{1/3} - 16 & /1/ \\ a^* &= 500[(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}] & /2/ \\ b^* &= 200[(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}] & /3/ \\ C^* &= [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} & /4/ \\ h^\circ &= \arctan(b^*/a^*) & /5/ \end{aligned}$$

where X_n , Y_n and Z_n are the values of X , Y and Z for illuminant D_{65} ($X_n=95.0247$, $Y_n=100.0000$, $Z_n=108.8314$). If any of the ratios X/X_n , Y/Y_n or Z/Z_n was equal to or less than 0.008856, it was replaced by $(77.878 \cdot F + 16)$, where F is X/X_n , Y/Y_n or Z/Z_n as the case may be. Chromaticity (C^*) and hue angle (h°) were calculated from a^* and b^* values. On the chromatic circle, h° values are stepped from 0 to 360° (purplish-red) across a continuously fading hue circle, the other reference values of which are 90° (yellow), 180° (bluish-green) and 270° (or -90°) (blue).

Results and Discussion

The design of a new industrial process requires an appropriate approach to consider the different aspects from which to assess the situation, which is a key factor in achieving success. The first steps of the processing of *Opuntia* fruits include the selection, classification, washing and conditioning (glochid elimination and pulp separation). After that, the plant material is ready for pigment extraction. Initially, the pulp is homogenized at high speed in a blender and before the addition of the solvent, the mixture is magnetically stirred to facilitate pigment extraction to the liquid phase. Three different solvents were used: water, ethanol and ethanol/water 60:40 (by volume). The selection of the most appropriate solvent is very important in order to obtain a highly pigmented extract, minimizing the presence of pectins and mucilage, which are found at high concentrations in cactus pear fruits. By means of centrifugation and subse-

quent filtration, the plant residue, mainly composed of pectins, cellulose and mucilage, is discarded, and a clarified pigment extract is obtained. Table 1 shows the main chemical characteristics of the extracts depending on the solvent used. The pH value was around 7.0 in the three extracts, similar to other pH values (5.3–7.1) reported for *Opuntia ficus-indica* fruits (21), confirming the *Opuntia* fruits as low-acid food. The refractive index, which depends on the presence of sugars, showed low variability among extracts, and density ranged from 0.85 to 1.00, showing the lowest value for the ethanolic extract. As regards the pigment content, the hydroalcoholic solvent extracted the highest level of betaxanthins (0.68 mmol of indicaxanthin per kg of fresh pulp) and therefore was chosen as the most efficient because it can recover the pigments completely from the pulp without co-extracting polysaccharides and other alcohol-insoluble solids. This simplifies further purification of the pigment extract. The level of betaxanthins obtained here is higher than that reported for Italian cactus pear (16), and is similar to the content found in some Mexican cultivars (22).

In order to obtain a highly pigmented betaxanthin extract to be used as commercial food colourant, a 21-fold concentrated extract was obtained under rotary evaporation at 35 °C and reduced pressure (6 kPa). It is important to offer a concentrated product to reduce water activity, thus increasing the stability of the pigments, minimizing the risk of microbial contamination and extending the shelf life of the colourant. Apart from that, transport and storage are made easier. Table 2 summarizes the results of analyses performed on the concentrated betaxanthin extract. It was found that its high colour strength was remarkable, and that the titratable acidity (10.90 mmol of citric acid per kg) is lower than that reported for *Opuntia ficus-indica* concentrated juice, which ranged between 158 and 53 mmol of citric acid per kg (21,23). Density (1.04 g/mL) was lower than previously reported for concentrated juice (1.29 g/mL) (23). These differences could be attributed to the use of ethanol in the extraction solvent, which leads to the reduction of sugars in the extract.

At this point, a natural yellow dye extract from *Opuntia* fruits was obtained. The flow diagram describing the overall extraction process, from the raw material to obtaining the dye extract, is shown in Fig. 1. The extraction process comprises the following stages of fruit conditioning: selection, classification, washing, glochid elimination and pulp separation, after which pigment extraction and concentration are performed.

The by-products from betaxanthin extraction include the ectodermis of *Opuntia* fruits, the pellet resulting from

Table 1. Chemical characteristics of pigment extracts

Extraction solvent	pH	Refractive index	Total soluble solids °Brix	ρ g/mL	Betaxanthins mmol of indicaxanthin
water	6.89±0.03	1.371±0.002	12.1±0.1	1.00±0.01	0.59±0.01
ethanol	7.48±0.04	1.371±0.001	10.8±0.2	0.85±0.02	0.56±0.02
ethanol/water (60:40 by volume)	7.29±0.04	1.363±0.001	12.0±0.2	0.93±0.02	0.68±0.02

Values are expressed as the mean±S.D. of three determinations

Table 2. Chemical characterization of the concentrated betaxanthin extract from *Opuntia* fruits

Parameter	Value
pH	5.83±0.03
Titrateable acidity/(mmol of citric acid per kg)	10.90±2.50
ρ /(g/mL)	1.04±0.04
Total soluble solids/°Brix	37.60±0.90
Colour strength ($A_{480\text{ nm}}$) (1 % by volume solution)	0.18±0.02
γ (betaxanthins)/(g/L)	0.27±0.01

Values are expressed as the mean±standard deviation (S.D.) of three determinations

the centrifugation of pigment extract, and the ethanol-water mixture obtained after the rotary evaporation of the initial pigment extract. The ectodermis constitutes 42–48 % of the whole fruit, and the main compounds in the ectodermis include cellulose, glucose and proteins. The ectodermis presents a potential use as biosorbent, which could serve as a cost effective means of treating the effluents charged with toxic heavy metals (24,25). The pellet resulting from centrifugation represents 10–12 % of the extracted pulp, and it mainly consists of pectins, mucilage and the seeds typical of these fruits. Both the polysaccharides and the seeds might also be used in the food industry. Recently seeds have been used as a source of high quality edible oil (26). The solvent obtained in the concentration process can be recycled in order to minimize the use of ethanol, and thus reduce the volume of disposable waste and decrease waste treatment costs.

The HPLC analysis of the betaxanthin extract (Fig. 2) revealed the presence of a mean peak, with a maximum absorbance at 479 nm and an m/z ratio of $[M+H]^+=309$, which was identified as indicaxanthin (proline-betaxanthin). All other betaxanthins were present in comparatively low quantities. The yellow indicaxanthin is reported in the bibliography as the major betaxanthin of the cactus pear fruits (20,27).

To check the storage stability, two assays were performed at 4 and 25 °C, respectively. The kinetics of degradation of betaxanthin pigments was monitored over the storage period, and rate constants and half-life values of reactions were determined. Fig. 3 shows the behaviour

Fig. 1. Flowchart representing the extraction process

Fig. 2. Chromatogram ($A_{479\text{ nm}}$) obtained from the HPLC analysis of the pigment extract from *Opuntia* fruits and chemical structure of indicaxanthin ($t_R=13.8\text{ min}$)

Fig. 3. Storage stability in the dark of the yellow pigment extract from *Opuntia* fruits

of betaxanthin content during degradation. First order kinetics can be observed, with half-life values ($t_{1/2}$) of 80 and 15 days at 4 and 25 °C, respectively. These data are lower than those of betacyanin extracts under the same storage conditions (13). It must be said that these half-life values correspond to crude extracts, and they can be increased by means of spray drying with encapsulating materials as maltodextrins, which were found to be effective in protecting pigment extracts from oxidation and photodegradation processes (28,29).

With the CIELAB parameters, the colour of plant extracts can be measured precisely, determined unambiguously, and differences to a colour standard can be quantified. Thus, CIELAB colour measurements are used extensively in the food industry to assess chromatic properties, and are gaining greater use as descriptors for colour specification by food manufacturers. The results of the colour measurements (CIELAB parameters) for pigment extracts are shown in Table 3. High lightness in both extracts ($L^*=88.24$ vs. $L^*=92.72$) can be observed, the hue angle was quite similar ($h^\circ=3.04$ vs. $h^\circ=-0.66$), while the chromaticity was higher in the initial pigment extract ($C^*=96.67$) than in the concentrated extract ($C^*=68.49$).

Table 3. Colour analysis of yellow pigment extracts

Colour parameter	Initial pigment extract	Concentrated pigment extract
a^*	5.13	-0.78
b^*	96.54	68.49
L^*	88.24	92.72
C^*	96.67	68.49
h°	3.04	-0.66

Conclusion

Opuntia fruits can be used as a source of betaxanthins, natural water-soluble yellow pigments, which can be used as food colourant. In this paper, a simple and

reliable betaxanthin extraction process was established, which provides a concentrated natural yellow extract of high colour strength. HPLC analysis of the pigment extract revealed only one major betaxanthin identified as indicaxanthin. Although the pigment extract did not exhibit promising results in storage stability, encapsulated concentrated pigment can be an excellent natural colourant for use in the food industry. Therefore, concentrated betaxanthin extract from *Opuntia* fruits, with its pleasant taste and flavour, could offer new opportunities as a natural yellow colourant for the food industry.

References

1. S. Bayarri, C. Calvo, E. Costell, L. Durán, Influence of color on perception of sweetness and fruit flavor of fruit drinks, *Food Sci. Technol. Int.* 7 (2001) 399–404.
2. A. Downham, P. Collins, Colouring our foods in the last and next millennium, *Int. J. Food Sci. Technol.* 35 (2000) 5–22.
3. B.S. Henry: Natural Food Colours. In: *Natural Food Colorants*, G.A.F. Hendry, J.D. Houghton (Eds.), Blackie Academic & Professional, London, UK (1996) pp. 40–79.
4. J.D. Adam-Burrows, Palette of our palates: A brief history of food coloring and its regulation, *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety*, 8 (2009) 394–408.
5. F. Delgado-Vargas, O. Paredes-López: *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2003).
6. E.M. Díaz Medina, E.M. Rodríguez Rodríguez, C. Díaz Romero, Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica* fruits, *Food Chem.* 103 (2007) 38–45.
7. F.C. Stintzing, A. Schieber, R. Carle, Identification of betalains from yellow beet (*Beta vulgaris* L.) and cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.) by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2302–2307.
8. R. Castellar, J.M. Obón, M. Alacid, J.A. Fernández-López, Color properties and stability of betacyanins from *Opuntia* fruits, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2772–2776.
9. F.C. Stintzing, A. Schieber, R. Carle, Phytochemical and nutritional significance of cactus pear, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2001) 396–407.
10. M. Piattelli: Betalains. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Vol. 1, T.W. Goodwin (Ed.), Academic Press, London, UK (1976) pp. 560–596.
11. D.A. Moreno, C. García-Viguera, J.I. Gil, A. Gil-Izquierdo, Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health, *Phytochem. Rev.* 7 (2008) 261–280.
12. U. Wissgott, K. Bortlik, Prospects for new natural food colorants, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (1996) 298–302.
13. R. Castellar, J.M. Obón, J.A. Fernández-López, The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 122–128.
14. C. Sáenz, S. Tapia, J. Chávez, P. Robert, Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*), *Food Chem.* 114 (2009) 616–622.
15. M.R. Moßhammer, M. Rohe, F.C. Stintzing, R. Carle, Stability of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill. cv. 'Gialla') betalains as affected by the juice matrix and selected food additives, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 21–32.
16. D. Butera, L. Tesoriere, F. Di Gaudio, A. Bongiorno, M. Allegra, A.M. Pintaudi *et al.*, Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6895–6901.

17. F. Gandía-Herrero, J. Escribano, F. García-Carmona, Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains, *Planta*, 232 (2010) 449–460.
18. J.A. Fernández-López, L. Almela, J.M. Obón, R. Castellar, Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits, *Plant Foods Hum. Nutr.* 65 (2010) 253–259.
19. F. Kugler, S. Graneis, E.C. Stintzing, R. Carle, Studies on betaxanthin profiles of vegetables and fruits from the Chenopodiaceae and Cactaceae, *Z. Naturforsch.* 62c (2007) 311–318.
20. J.A. Fernández-López, L. Almela, Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the betalain pigments in prickly pear fruits, *J. Chromatogr. A*, 913 (2001) 415–420.
21. C. Sáenz, Processing technologies: An alternative for cactus pear (*Opuntia* spp.) fruits and cladodes, *J. Arid Environ.* 46 (2000) 209–225.
22. E. Castellanos-Santiago, E.M. Yahia, Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 5758–5764.
23. C. Sáenz, A.M. Estévez, E. Sepúlveda, P. Mecklenburg, Cactus pear fruit: A new source for a natural sweetener, *Plant Foods Hum. Nutr.* 52 (1998) 141–149.
24. H. Barrera, F. Ureña-Núñez, B. Bilyeu, C. Barrera-Díaz, Removal of chromium and toxic ions present in mine drainage by ectodermis of *Opuntia*, *J. Hazard Mater. B*, 136 (2006) 846–853.
25. C. Barrera-Díaz, C. Almaraz-Calderón, M.T. Olguín-Gutiérrez, M. Romero-Romo, M. Palomar-Pardavé, Cd(II) and Pb(II) separation from aqueous solution using clinoptilolite and *Opuntia* ectodermis, *Environ. Technol.* 26 (2005) 821–830.
26. I. El Mannoubi, S. Barrek, T. Skanji, H. Casabianca, H. Zarrouk, Characterization of *Opuntia ficus indica* seed oil from Tunisia, *Chem. Nat. Comp.* 45 (2009) 616–620.
27. F. Kugler, E.C. Stintzing, R. Carle, Evaluation of the antioxidant capacity of betalainic fruit and vegetables, *J. Appl. Bot. Food Qual.* 81 (2007) 69–76.
28. J.M. Obón, M.R. Castellar, M. Alacid, J.A. Fernández-López, Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems, *J. Food Eng.* 90 (2009) 471–479.
29. F. Gandía-Herrero, M. Jiménez-Atienzar, J. Cabanes, F. García-Carmona, J. Escribano, Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 10646–10652.

7.2. ANEXO 2

Artículo 2

Betalaínas: colorantes naturales bioactivos.

Investigación y Ciencia 445, 10-12 (2013).

QUÍMICA

Betalaínas: colorantes naturales bioactivos

Debido a su carácter hidrosoluble, estabilidad y actividad antioxidante, estos pigmentos naturales están despertando el interés de la industria alimentaria

Los colorantes alimentarios vienen empleándose desde hace más de 4000 años. En la actualidad, se hallan presentes en la mayor parte de los alimentos industrializados, ya que incrementan su atractivo a ojos del consumidor. Un color estable y llamativo constituye un atributo de alto valor añadido en el competitivo mercado de las industrias elaboradoras de alimentos.

La mayoría de los colorantes alimentarios son de origen sintético. Dadas las altas dosis que llegan a ingerirse, sobre todo en edades infantiles, en los últimos años se ha fijado la atención en sus efectos sobre la salud. La Agencia de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea recomienda minimizar el empleo de colorantes y aditivos en general, limitándolos a los casos en que exista una necesidad vinculada con la conservación, el sabor o la utilidad de los alimentos. Una investigación dirigida por Jim Stevenson, de la Universidad de Southampton, examinó los umbrales de seguridad del consumo diario de seis colorantes alimentarios sintéticos: amarillo de quinoleína (E104), amarillo anaranjado (E110), tartrazina (E102), azorrubina/carmoisina (E122), rojo allura AC (E129) y rojo ponceau 4R

(E124). Los resultados, publicados en 2007 en la revista *The Lancet*, advertían sobre posibles trastornos de atención en niños debidos a la ingesta de estas sustancias. Algunas legislaciones europeas ya obligan a incluir en las etiquetas de los productos eventuales efectos adversos causados por el consumo de las mismas.

Además de las recomendaciones de las autoridades sanitarias, la industria alimentaria tiene en cuenta también el comportamiento de los consumidores, que cada vez más muestran preferencia por los productos naturales. Por todo ello (motivos de seguridad alimentaria y de estrategia comercial), en los últimos años

MOLÉCULAS de cuatro de las betalaínas más comunes, dos betacianinas (púrpura) y dos betaxantinas (amarillo).

el mercado de los colorantes se ha decantado hacia los de origen natural.

Entre los pigmentos naturales destacan clorofilas, carotenoides, antocianos y betalaínas. Estos tres últimos aportan mayoritariamente las tonalidades rojizas en los colorantes alimentarios naturales (precisamente es la gama de los rojos la parte de la paleta de tonos más afectada por las restricciones en el uso de colorantes sintéticos). Carotenoides y antocianos se hallan ampliamente presentes en la naturaleza, y su empleo en la industria se halla muy extendido desde hace años. Las betalaínas son menos conocidas, probablemente por su escasez; su uso como colorante está más restringido. No obstante, constituyen una opción cada vez más interesante para la industria alimentaria. Veamos por qué.

Higo chumbo y remolacha

El interés científico en las betalaínas nació en la segunda mitad del siglo xx. Las primeras publicaciones sobre estos pigmentos se deben a H. Wyler (1963) y M. Piatelli (1964), quienes determinaron la estructura química de la betanina y el indicaxanteno, respectivamente. Sin embargo, hasta hace pocos años no se han retomado las investigaciones sobre estas moléculas. Químicamente son alcaloides derivados de la tirosina. Se dividen en betacianinas (rojo-púrpura) y betaxantinas (amarillo-naranja). Las betacianinas se forman por condensación del ácido betalámico con un residuo de ciclo-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA); las betaxantinas poseen aminoácidos o aminas adicionadas en dicha posición [véase «Flores fluorescentes», por F. García Carmona, G. Gandía Herrero y J. Escribano; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, abril de 2011].

Desde 2004, el empleo de betalaínas como colorantes alimentarios está autorizado por la Comisión del *Codex Alimentarius*, el código de normas alimentarias que elaboran la OMS y la FAO. Se comercializan tanto en EE.UU. como en la Unión Europea con el nombre de rojo remolacha, cuyo pigmento mayoritario es la betanina (betanidina-5-O-β-glucósido).

En el reino vegetal, las betalaínas se hallan sobre todo en las plantas del orden *Cariofilales*, en el cual *Chenopodiaceae*, *Cactaceae*, *Amaranthaceae*, *Aizoaceae*, *Nyctaginaceae* y *Portulacaceae* son las familias más conocidas.

En la naturaleza suelen encontrarse glicosiladas, predominando la betanina y su isómero, la isobetanina. Entre las be-

taxantinas más importantes destacan el vulgaxanteno I (glutamina-betaxantina), mayoritario en la remolacha (*Beta vulgaris*), y el indicaxanteno (prolina-betaxantina), abundante en el higo chumbo (*Opuntia ficus indica*).

De pigmento a colorante

La disponibilidad de preparados comerciales de betalaínas se restringe a concentrados de extracto líquido de remolacha (entre el 60 y el 85 por ciento de sólidos totales) obtenidos por evaporación rotativa de extracto fresco, o al sólido (entre el 0,3 y el 1 por ciento de betanina) producido por atomización o liofilización del líquido concentrado.

El extracto de remolacha se obtiene tras el blanqueado (inactivación de enzimas que puedan degradar el color), troceado, prensado y posterior filtración de las raíces de remolacha. Los preparados comerciales no son puros; difieren en su color según la proporción de betacianinas y betaxantinas. Con frecuencia presentan olores característicos, debidos a la presencia de geosmina y pirazinas, que pueden desmerecer su calidad. El rendimiento de la extracción llega a los 0,5 gramos por kilogramo fresco de raíz procesada. Se trata de un colorante potente: bastan dosis inferiores a los 50 miligramos de betanina por kilogramo de producto final para obtener el tono de color deseado.

Los frutos de *Opuntia* pueden también emplearse como fuente de betalaínas, ya que desde el punto de vista organoléptico son mejores que la remolacha, además de ser más amplia la gama de colores que aportan. En 2012 nuestro grupo de investigación publicó en *Food Technology and Biotechnology* un proceso para la extracción de betaxantinas de frutos de *Opuntia*, basado en la evaporación rotativa a baja presión; permite obtener un extracto amarillo, de indicaxanteno, con una concentración de 0,27 gramos por litro. En especies como *O. stricta*, el rendimiento en la producción de pigmentos supera los 0,5 gramos de betanina por kilogramo de fruto fresco.

Los colorantes amarillos naturales disponibles en el mercado son lipofílicos; las betaxantinas, en cambio, son hidrosolubles, lo que facilita su dispersión en el alimento y una coloración más uniforme del mismo.

Aplicaciones industriales

Un requisito que debe cumplir todo pigmento para convertirse en colorante es ser estable: por un lado, frente a los pro-

educación

ciencia

universidad

comunicación

ética

reflexión

investigación

filosofía

opinión

historia

conocimiento

2.0

blog

diálogo

SciLogs

Ciencia en primera persona

CLAUDI MANS TEIXIDÓ

Ciencia de la vida cotidiana

ÁNGEL GARCIMARTÍN MONTERO

Física y sociedad

ALBERTO RAMOS

Laboratorio de computación

JOSHUA TRISTÁNCHO MARTÍNEZ

Misiones espaciales low-cost

JULIO RODRÍGUEZ LÓPEZ

La bitácora del Beagle

LUIS CARDONA PASCUAL

Ciencia marina

CARMEN AGUSTÍN PAVÓN

Neurobiología

MARC FURIÓ BRUNO

Los fósiles hablan

Y MÁS...

www.investigacionyciencia.es/blogs

Panorama

cesos industriales de elaboración de los alimentos; por otro, frente a las condiciones de pH y la interacción con otros constituyentes.

La estabilidad de las betalainas depende del pH, la luz, el oxígeno y la temperatura. En cuanto al pH, se muestran estables en un ancho rango de valores (entre 3 y 7), lo que las hace especialmente aptas para ser empleadas en un amplio espectro de alimentos de acidez baja y neutra, donde no pueden usarse antocianos. Se degradan en presencia de luz si la atmósfera es aeróbica. En condiciones anaeróbicas, su oxidación es insignificante; al oxidar-

se adquieren tonalidades pardas, lo que puede evitarse en atmósferas modificadas y en presencia de antioxidantes como el ácido ascórbico. La termolabilidad es el factor que más restringe el empleo de las betalainas como colorantes alimentarios: temperaturas superiores a 35 °C aceleran su degradación originando como productos el ácido betalámico (incoloro) y otros compuestos de tonos pardos.

El colorante derivado de las betalainas (E162) se puede emplear en batidos, yogures, helados, gelatinas, cremas, jamón cocido, bebidas refrescantes de frutas, golosinas y productos de confitería.

Este carácter hidrosoluble y estable dota a las betalainas de una clara ventaja técnica frente a otros pigmentos naturales como los carotenoides (hidrofóbicos), puesto que facilita su uso y dosificación. Pero estas no son las únicas virtudes de estos compuestos. Destacan también por su bioactividad.

Actividad antioxidante

La estructura catiónica de las betalainas, con una amina cuaternaria formando parte de un sistema conjugado de dobles enlaces, le confiere una gran actividad reductora (antioxidante). La presencia de estructuras fenólicas aumenta su carácter nucleófilo y las convierte en excelentes donantes de electrones y neutralizadores de radicales libres.

Existe abundante bibliografía sobre la actividad biológica de betacianinas y betaxantinas, en particular sobre su actividad antirradical y antioxidante. Se ha comprobado en humanos que, tanto la betanina como el indicaxanteno, aun siendo moléculas hidrófilas, se asocian a lipoproteínas de baja densidad (LDL), aumentando su resistencia a la oxidación. También se ha demostrado que estos pigmentos se unen a los eritrocitos, evitando su hemólisis oxidativa. Asimismo, experimentos in vitro han revelado que la betanina y la betanidina inhiben la peroxidación de lípidos.

Además de proporcionar un color atractivo a un alimento, parece, pues, que las betalainas resultan beneficiosas para nuestro organismo.

—José A. Fernández López

Pedro J. Giménez

Departamento de ingeniería química
y ambiental
Universidad Politécnica de Cartagena
Murcia

Principales especies vegetales productoras de betalainas

FAMILIA	ESPECIE	BETALAINAS	
		BETACIANINAS	BETAXANTINAS
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Betanina Isobetanina	Vulgaxanteno I Vulgaxanteno II Indicaxanteno
	<i>Chenopodium rubrum</i>	Betanina Celosianina	Vulgaxanteno I Vulgaxanteno II
Cactaceae	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Betanina Isobetanina	Indicaxanteno
	<i>Hylocereus polyrhizus</i>	Betanina Isobetanina Phyllocactina Hylocerenina	
Amaranthaceae	<i>Amaranthus</i> sp.	Amarantina Isoamarantina	Dopaxanteno Vulgaxanteno I Indicaxanteno Miraxanteno V
Aizoaceae	<i>Lamprantus productus</i>	Betanidina	Dopaxanteno
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i> sp.	Gomfrenina I Bougainvilleina V Ésteres cumáricos de la betanina	Dopaxanteno Muscaaurina VII
Portulacaceae	<i>Portulaca grandiflora</i>		Dopaxanteno Vulgaxanteno I Portulacaxanteno II Miraxanteno V Indicaxanteno

7.3. ANEXO 3

Artículo 3

Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants.

Plant Foods for Human Nutrition 68, 11-17 (2013).

Thermal Stability of Selected Natural Red Extracts Used as Food Colorants

José A. Fernández-López · José M. Angosto ·
Pedro J. Giménez · Gerardo León

Published online: 2 February 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract The color degradation of aqueous solutions of six natural red pigment extracts (elderberry, red cabbage, hibiscus, red beet, *Opuntia* fruits and red cochineal) used commercially as food colorants was investigated at temperatures between 50 and 90 °C. Color degradation was studied in respect to both spectral properties and visual color. The remaining absorbance at 535 nm as a function of the incubation time and temperature was used to quantify the degradation process. Red cochineal was the most thermoresistant extract with a remaining absorbance of 95 % after 6 h at 90 °C. Anthocyanin extracts (elderberry, red cabbage, hibiscus) showed remaining absorbance percentages of 63.8, 46.1 and 26.7, respectively. Betacyanin extracts (red beet, *Opuntia* fruits) were the most thermosensitive maintaining only 12.5 and 1.7 %, respectively, of the initial absorbance at 535 nm. Applying a first-order kinetic model to the degradation processes, reaction rate constants (k) and half-life periods ($t_{1/2}$) were calculated. The temperature dependence of the degradation rate constant obeyed the Arrhenius relationship, with activation energies (E_a) ranging between 3.02 and 53.37 kJmol⁻¹. The higher activation energy values indicated greater temperature sensitivity. Changes in visual color attributes corroborated the high thermal stability of the red cochineal extract.

Keywords Color parameters · Food colorants · Natural red extracts · Thermal degradation

Abbreviations

$\lambda_{\max}$	Wavelength of maximum absorption
k	Reaction rate constant
$t_{1/2}$	Half-life period
E_a	Activation energy
ΔE^*	Total color difference

Introduction

For 4,000 years colorants have been added to foods and the color of food products is still one of the major concerns of the food industry [1]. Stable and attractive colors are a highly valued attribute in the competitive food and beverage market, while the use of natural pigments in foodstuffs has been increasing in recent years due to the marketing advantages of using natural ingredients in light of consumer concerns related with the potential harmful effects, due to allergies and intolerance, of synthetic pigments [2, 3]. Moreover, elevation of the functional platform of natural colors from simple colorants to health-promoting ingredients has increased the demand for natural colors both on the part of retailers and consumers. The search on the part of the food industry for new products with appealing features has opened up new research lines aimed at developing attractive food colorants.

The main groups of natural food colorants are carotenoids, chlorophylls, anthocyanins, betacyanins and curcuminoids [4]. The restrictions in the use of certain synthetic colorants have greatly reduced the color palette available to the food industry. Although no color has escaped these restrictions, red is, without doubt, the most affected. The banning of FD&C Red No. 2 (amaranth) in the USA by the U.S. Food and Drug Administration, Scarlet GN and Ponceau GR in France and Orange RN in the United Kingdom has led to an increased request for natural sources of red pigments [5, 6]. Natural red colorants successfully used in

J. A. Fernández-López (✉) · J. M. Angosto · P. J. Giménez ·
G. León
Department of Chemical and Environmental Engineering,
Technical University of Cartagena (UPCT),
Paseo Alfonso XIII 52,
30203 Cartagena, Murcia, Spain
e-mail: josea.fernandez@upct.es

foods include betanin [7, 8], cochineal [9], carotenoids [10] and, especially, anthocyanins [11]. However, the use of any natural colorant in food requires a detailed knowledge of its stability to possible degradation processes and also the understanding of the conditions governing pigment degradation, so that measures can be taken to ensure sufficient stability and to optimize the industrial production and storage of the colored products.

In the present work, the heat stability and color alterations of six natural extracts (elderberry, hibiscus, red cabbage, red beet, *Opuntia* fruit and red cochineal) used as red colorants in the food industry have been compared.

Anthocyanins are the pigments responsible for color in elderberry, hibiscus and red cabbage extracts, which are widely used in beverages, confectionery, jellies and jams. Today, interest in anthocyanin pigments has intensified because of their possible health benefits as dietary antioxidants [12, 13]. In red beet and *Opuntia* fruit extracts, the red color is due to the presence of betacyanins, water-soluble vacuolar pigments which exhibit a red-violet coloration. They can be found in ice creams, powdered drinks, sugar confections, soup, and bacon products. Betacyanins are also antiradical molecules, whose bioactivity has been described in recent years [14, 15]. Cochineal and its derivatives (carminic acid and carmine) are widely used throughout the food industry. Both liquid and powder preparations are used to color beverages, table jellies, sugar confectionery. This colorant is also commonly used in the pharmaceutical industry [9].

There are no studies comparing the thermal stability of anthocyanins, betacyanins and red cochineal, so we consider of great importance to investigate the effects of heat treatment on the colorant properties of these six natural red extracts used as food colorants.

Materials and Methods

Materials

Commercial red pigment extracts from elderberry (*Sambucus nigra* L.), red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*), hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.), and red beet (*Beta vulgaris* L.) powders were provided by Diana Naturals (Antrain, France). Red cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extract was obtained as a powder from Roha Europe SLU (Valencia, Spain). The *Opuntia* fruit red extract was obtained in our laboratory from *Opuntia stricta* fruits as indicated previously [16]. Sodium citrate and sodium phosphate were of analytical grade (Merck, Darmstadt, Germany), and the water was purified through a Milli-Q purification train (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock solutions (500 mg/50 ml) of each colorant extract in 100 mM pH 5.5 citrate-phosphate buffer were prepared,

and successive dilutions were performed to reach an absorbance of 0.700 ± 0.005 at 535 nm in all the extracts. Figure 1 shows a photograph of the diluted colorant extracts. The final solutions were maintained in the dark at 5 °C, and shaken before use within seven days.

Thermal Degradation

Experiments were performed in duplicate in Pobel tubes (100 mm × 14 mm id, Pobel S.A., Madrid, Spain) with screw cap. The samples were thermostated in a waterbath at the desired temperature. The degradation was followed at 50 °C, 70 °C and 90 °C for 6 h. The changes in absorbance were monitored between 400 and 700 nm at intervals of 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. After this time, the tubes were immediately cooled in an ice-bath to stop thermal degradation. An aliquot of each sample was passed through a PTFE filter (0.45 µm, polypropylene, Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA) and analyzed spectrophotometrically in an Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer (Waldbronn, Germany).

Kinetic Data on Color Degradation

Kinetic data on red colorant degradation were calculated using the reaction rate as reported by Van den Broeck and coworkers [17]. Thermal degradation of extracts was assumed to follow a first order rate, indicating a logarithmic order of inactivation, which is mathematically expressed as:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -kt \quad (1)$$

where A represents residual absorbance after treatment, A_0 the initial absorbance, and t and k represent time (h) and reaction rate constant (h^{-1}) at a particular temperature, respectively. Half-life values ($t_{1/2}$) were determined by plotting the natural logarithm of the A_0/A ratio vs. heating period. The slope of the graph through the origin obtained

Fig. 1 Aqueous solutions (pH 5.5) of the selected colorants. The absorbance at 535 nm of all of them is adjusted to 0.700

Table 1 Color properties for the natural red food colorants

	$\lambda_{\max}$ (nm)	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
Elderberry	530±0.3	62.6±0.2	31.5±0.1	11.0±0.2	33.4	70.7
Red cabbage	542±0.2	61.7±0.3	41.3±0.2	-18.8±0.3	45.4	-65.5
Hibiscus	527±0.1	64.5±0.1	31.3±0.2	5.8±0.1	31.8	79.4
Red beet	534±0.1	65.8±0.2	34.8±0.3	5.6±0.2	35.2	80.8
Cochineal	551±0.2	68.0±0.0	61.7±0.1	-4.0±0.1	61.8	-86.3
<i>Opuntia</i>	535±0.2	72.4±0.1	60.6±0.0	-22.4±0.2	64.6	-69.7

Mean ± standard deviation, $n=3$

by connecting the data points was equated with k , from which the half-life values ($t_{1/2}=\ln 2/k$) were deduced.

Dependence of the degradation rate constant on temperature is represented by the Arrhenius equation:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (2)$$

where k is the rate constant, k_0 the frequency factor, E_a is the activation energy (kJmol^{-1}), R is the universal gas constant ($8.314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$) and T the absolute temperature (Kelvin).

Color Measurements

Visual color was monitored from the CIELab parameters. The tristimulus values (X , Y , Z) were calculated from spectral data from 380 to 780 nm every 10 nm [18]. The CIELab parameters (L^* , a^* , b^* , C^* and h°) were obtained using standard illuminant D_{65} and a 10° observer angle. The hue angles (h°) were expressed on a 360° color wheel where $0^\circ/360^\circ$ presents purplish-red, 90° yellow, 180° bluish-green, and 270° blue. Also color differences $\Delta E^*=[(\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^2+(\Delta b^*)^2]^{1/2}$ were calculated between samples.

Fig. 2 Impact of temperature (70 °C) on the visible spectra (400–700 nm) of the colorant extracts. The time interval between the spectra is 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h

Springer

Results and Discussion

Color Analysis of the Initial Solutions

Colors can be described by the wavelength of maximum absorption ($\lambda_{\max}$) in the visible range of the electromagnetic spectrum. CIELab parameters have also been used successfully for the evaluation of color in natural extracts [19–21]. The initial shades of the selected colorants are depicted in Fig. 1. The color characteristics ($\lambda_{\max}$ and CIELab parameters) are shown in Table 1. It can be appreciated that all the colorants showed maximum wavelengths between 527 (hibiscus) and 551 nm (red cochineal). As regards the initial CIELab parameters, lightness (L^*) ranged from $L^*=61.7$ (red cabbage) to $L^*=72.4$ (*Opuntia*). All the samples showed positive a^* values, as expected from their red color. Cochineal and *Opuntia* showed the highest a^* values, $a^*=61.7$ and $a^*=60.6$, respectively. Greater dispersion was observed in the b^* parameter (blueness-yellowness) ranging from the negative $b^*=-22.4$ of *Opuntia* to the positive $b^*=11.0$ of elderberry. Chroma (C^*), which

indicates the brilliance or purity of a color, was higher in *Opuntia*. The hue angle (h°), which expresses the tonality, ranged between $h^\circ = -86.3$ (13.7) in red cochineal and $h^\circ = 79.4$ in hibiscus.

Influence of Thermal Degradation on the Absorption Spectra

The instability of natural extracts to temperature results in structural alterations that affect their absorption spectra and color properties. The degradation pattern depends on both the temperature and time. Most color variation patterns show a direct relationship with the intensity of the thermal treatment. Color degradation increased with increases in temperature, resulting in profound modifications in the absorption spectra (400–700 nm) of the different extracts. Figure 2 shows the incidence of heating at 70 °C on the absorption spectra of the six colorant extracts analyzed. Each graph depicts the spectra at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. The most relevant result of this treatment was the pronounced instability of the betalainic extracts (*Opuntia* fruits and red beet) both of which had lost their red color by the end of the test. This behavior was much more evident when the incubation temperature was increased to 90 °C. Among the anthocyanin extracts, elderberry showed lower degradation than hibiscus and red cabbage, while red cochineal was clearly the most thermoresistant extract, showing very slight changes in its spectra, which almost overlapped.

These results can be visualized quantitatively if the remaining absorbance at 535 nm in the extracts as a function of the incubation time at 50, 70 and 90 °C is analyzed (Fig. 3). As can be seen, the rate of color degradation increased as the temperature rose. In the three tests (50, 70 and 90 °C) the *Opuntia* fruit extract was the most thermolabile, with degradations after 6 h of 58 % at 50 °C, 91 % at 70 °C and higher than 98 % at 90 °C. The red cochineal extract was by far the most stable to temperature of all of them, and even after the harshest treatment (6 h at 90 °C), 95 % of absorbance at 535 nm remained. The anthocyanin extracts were in an intermediate position, with the elderberry extract more resistant to temperature than the red cabbage and hibiscus extracts. After 6 h of incubation at 90 °C, the elderberry extract showed a remaining absorbance of 63.8 %, while only 46.1 and 26.7 %, respectively, was maintained in the red cabbage and hibiscus extracts.

Degradation Kinetics

It is difficult to establish a reaction mechanism and to obtain a kinetic model that describes the global process adequately. Kinetic models are often used for an objective assessment of color degradation in natural extracts [22], and most often, first-order kinetic models have been proposed to estimate

color changes during thermal processing and subsequent storage [23–25].

The type of pigment and the magnitude and duration of heating have the strongest influence on color stability. The degradation reaction rate constants (k), half-life periods ($t_{1/2}$)

Fig. 3 Remaining absorbance at 535 nm in the colorant extracts as a function of the incubation time

and activation energy values (E_a) are shown in Table 2. The k values showed the following descending order for each temperature: *Opuntia*, red beet, hibiscus, red cabbage, elderberry and cochineal. The $t_{1/2}$ values obtained for the temperature range 50–90 °C, confirm that *Opuntia* fruit and red beet extracts were less stable than the anthocyanin and cochineal extracts. For example, at 70 °C the cochineal extract showed a $t_{1/2}$ value 1.3–3.0 times higher than the other colorant extracts. Among the three anthocyanin extracts, the half-life values of elderberry were 1.1–1.3 times higher than those for red cabbage, and 1.3–1.7 times higher than those for hibiscus. In previous studies on anthocyanin extracts from Hibiscus higher $t_{1/2}$ values were registered under comparable temperature conditions [26], however the stability reported in elderberry extract [19] is similar to our data. Betacyanins are commonly known to be heat labile pigments, their stability was observed to considerably decline above 50 °C, in red beet extracts a $t_{1/2}$ value of 3.3 h (50 °C) was reported [26] which agrees with our results, while in *Opuntia* fruit extracts, half-life times of 3.0 h (50 °C), 1.1 h (70 °C) and 0.2 h (90 °C) were obtained [27], in the same order that our findings (Table 2). Plots of $\ln k$ vs. $1/T$ (Eq. 2) gave straight lines for each of the red colorant extracts. Activation energies (E_a), derived from the slopes of these lines, ranged between 3.0 and 53.4 kJ mol⁻¹. Higher E_a values are associated with increased temperature dependence of the degradation rate [28]. The

temperature dependence of the degradation reaction rate constants thus followed the Arrhenius relationship, typical of many deteriorative processes in food materials [29].

Table 2 Kinetic parameters and total color differences (ΔE^*) of the thermal degradation processes for the natural red food colorants

	Temperature (°C)	k (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ ^a (h)	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔE^* (after 6 h)
Elderberry	50	0.01	5.40 (0.99)	15.37	12.3
	70	0.04	4.02 (0.99)		20.4
	90	0.06	3.56 (0.97)		35.7
Red cabbage	50	0.03	4.14 (0.99)	26.50	12.4
	70	0.06	3.58 (0.98)		23.4
	90	0.10	3.05 (0.98)		43.3
Hibiscus	50	0.05	3.63 (0.97)	38.20	11.9
	70	0.09	3.08 (0.97)		24.4
	90	0.26	2.05 (0.94)		50.6
Red beet	50	0.08	3.28 (0.94)	35.37	12.7
	70	0.19	2.34 (0.91)		31.3
	90	0.32	1.84 (0.91)		55.0
Cochineal	50	0.01	5.52 (0.99)	3.02	7.9
	70	0.01	5.30 (0.99)		10.1
	90	0.01	5.40 (0.98)		12.2
<i>Opuntia</i>	50	0.10	2.98 (0.90)	53.37	13.1
	70	0.35	1.75 (0.90)		39.7
	90	0.91	0.79 (0.89)		57.5

^a Correlation coefficient of determination (R^2) shown in parenthesis

Fig. 4 Colorimetric plane (a^* vs. b^*) showing the incidence of the thermal treatments (50, 70 and 90 °C) in the colorant extracts

In general, the difference in stability observed among the red pigment extracts was related to the nature of the pigments. The highest stability corresponded to the cochineal extract and the lowest to the betacyanin extracts (red beet and *Opuntia*), while the anthocyanin extracts (elderberry, red cabbage and hibiscus) were in an intermediate position. The different stabilities among anthocyanin extracts could be related with the chemical structures of the anthocyanins present in the extracts, including the types of aglycones and sugar moieties, the complexity of sugar residues, the presence of acylating structures or even the presence of other phenolic compounds in these extracts [28]. The difference in thermostability between red beet and *Opuntia* extracts might also be mainly attributed to the different chemical structures of the individual betacyanin pigments present in both extracts and even to the presence of additional compounds that would affect stability during heating [30].

Changes in Visual Color Attributes

The changes in visual color were evaluated by the CIELab parameters which can achieve a precise color characterization and are gaining in popularity as descriptors for use in color specification by food manufacturers. It can be observed that thermal processing involves an increase in the lightness (L^*), accompanied by a decrease in the red-green parameter (a^*), particularly in the most thermosensitive extracts, and a slight increase in the blue-yellow parameter (b^*). These effects are similar to those reported for aqueous anthocyanin extracts [23, 28] and also for betacyanin extracts [20, 31]. As seen in Fig. 4, plotting the values in the plane a^* vs. b^* (colorimetric plane) illustrates how redness decreases during the heating period. The greater the dispersion of the points among the same series the more pronounced color degradation. Red cochineal extracts were the only ones to remain grouped after treatment for 6 h at 50, 70 or 90 °C, with color differences (ΔE^*) of 7.9, 10.1 and 12.2, respectively (Table 2). This, corroborates the view that red cochineal is the most thermoresistant extract, while red beet and *Opuntia* extracts showed a pronounced degree of degradation even during heating at moderate temperature (50 °C). The color differences confirmed the greater thermolability of both betacyanin extracts.

Conclusions

The effects of thermal treatment on the color shade of aqueous red pigment extracts from elderberry, red cabbage, hibiscus, red beet, *Opuntia* fruits and red cochineal were investigated. The results from the present study provided detailed information regarding the changes in kinetic stability and visual color. Red cochineal exhibited the highest thermostability among the natural colorants investigated, and even after a severe

treatment of 6 h at 90 °C this extract did not show significant color modifications. Betacyanin extracts (red beet, *Opuntia*) was found to be more temperature-sensitive than anthocyanin extracts (elderberry, red cabbage, hibiscus).

References

- Hutchings J (2006) Talking about color and ethics. *Color Res Appl* 31:87–89
- Downham A, Collins P (2000) Colouring our foods in the last and the next millennium. *Int J Food Sci Technol* 35:5–22
- Mapari SAS, Meyer AS, Thrane U (2006) Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. *J Agric Food Chem* 54:7027–7035
- Delgado-Vargas F, Jiménez-Aparicio A, Paredes-López O (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing and stability. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 40:173–289
- Malien-Aubert C, Amiot-Carlin MJ (2006) Pigments phénoliques: structures, stabilité, marche des colorants naturels et effets sur la santé. In: *Les Polyphénols en Agroalimentaire*, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp 295–339
- Cisse M, Vaillant F, Acosta O, Dhuique-Mayer C, Dornier M (2009) Thermal degradation kinetics of anthocyanins from blood orange, blackberry, and roselle using the Arrhenius, Eyring, and Ball models. *J Agric Food Chem* 57:6285–6291
- Moreno D, García-Viguera C, Gil JJ, Gil-Izquierdo A (2008) Betalains in the era of global agri-food science; technology and nutritional health. *Phytochem Rev* 7:261–280
- Von Elbe JH, Goldman IL (2000) The betalains. In: Lauro GJ, Francis FJ (eds) *Natural food colorants, science and technology*. IFT, Chicago, pp 11–30
- Schul J (2000) Carmine. In: Lauro GJ, Francis FJ (eds) *Natural food colorants, science and technology*. IFT, Chicago, pp 1–10
- Mortensen A (2006) Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl Chem* 78:1477–1491
- Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA (2009) Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem* 4:859–871
- Beattie J, Crozier A, Duthie GG (2005) Potential health benefits of berries. *Curr Nutr Food Sci* 1:71–86
- Paredes-López O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T (2010) Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life—A review. *Plant Foods Hum Nutr* 65:299–308
- Stintzing FC, Carle R (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci Technol* 15:19–38
- Fernández-López JA, Almela L, Obón JM, Castellar R (2010) Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum Nutr* 65:253–259
- Castellar MR, Obón JM, Fernández-López JA (2006) The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits. *J Sci Food Agric* 86:122–128
- Van den Broeck I, Ludikhuyze L, Weemaes C, Loey AV, Hendrickx M (1998) Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *J Agric Food Chem* 46:2001–2006
- Hunt RWG (1987) *Measuring colour*. New York: John Wiley & Sons
- Sadilova E, Carle R, Stintzing FC (2007) Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and *in vitro* antioxidant capacity. *Mol Nutr Food Res* 51:1461–1471

20. Herbach KM, Stintzing FC, Carle R (2004) Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] monitored by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis. *Eur Food Res Technol* 219:377–385
21. Rodríguez-Muñoz E, Herrera-Ruiz G, Pedraza-Aboytes G, Loarca-Piña G (2009) Antioxidant capacity and antimutagenic activity of natural oleoresin from greenhouse grown tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Foods Hum Nutr* 64:46–51
22. Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Technol* 21:3–11
23. Yang Z, Han Y, Gu Z, Fan G, Chen Z (2008) Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Inn Food Sci Emerg Technol* 9:341–347
24. Ibarz A, Pagán J, Garza S (2000) Kinetic models of non-enzymatic browning in apple puree. *J Sci Food Agric* 80:1162–1168
25. Suh HJ, Noh DO, Kang CS, Kim JM, Lee SW (2003) Thermal kinetics of color degradation of mulberry fruit extract. *Nahrung* 47:132–135
26. Pedreño MA, Escribano J (2001) Correlation between antiradical activity and stability of betanine from *Beta vulgaris* L roots under different pH, temperature and light conditions. *J Sci Food Agric* 81:627–631
27. Merin U, Gagel S, Popel G, Bernstein S, Rosenthal I (1987) Thermal degradation kinetics of prickly-pear-fruit red pigment. *J Food Sci* 52:485–486
28. Reyes LF, Cisneros-Zevallos L (2007) Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chem* 100:885–894
29. Gradinaru G, Biliaderis CG, Kallithraka S, Kefalas P, Garcia-Viguera C (2003) Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem* 83:423–436
30. Stintzing FC, Carle R (2007) Betalains—emerging prospects for food scientists. *Trends Food Sci Technol* 18:514–525
31. Herbach KM, Stintzing FC, Carle R (2006) Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J Food Sci* 69:C491–C498

7.4. ANEXO 4

Artículo 4

Comparative thermal degradation patterns of natural yellow colorants
used in foods.

Plant Foods for Human Nutrition (2015).

Publicado on line. DOI: 10.1007/s11130-015-0499-0

Comparative Thermal Degradation Patterns of Natural Yellow Colorants Used in Foods

Pedro J. Giménez¹ · José A. Fernández-López¹ · José M. Angosto¹ · José M. Obón¹

© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract There is a great interest in natural yellow colorants due to warnings issued about certain yellow food colorings of synthetic origin. However, no comparative studies have been reported of their thermal stability. For this reason, the thermal stabilities of six natural yellow colorants used in foods—lutein, riboflavin, curcumin, β -carotene, gardenia yellow and *Opuntia* betaxanthins—were studied in simple solutions over a temperature range 30–90 °C. Spectral properties and visual color were investigated during 6 h of heat treatment. Visual color was monitored from the CIEL*a*b* parameters. The remaining absorbance at maximum wavelength and the total color difference were used to quantify color degradation. The rate of color degradation increased as the temperature rose. The results showed that the thermal degradation of the colorants followed a first-order reaction kinetics. The reaction rate constants and half-life periods were determined as being central to understanding the color degradation kinetics. The temperature-dependent degradation was adequately modeled on the Arrhenius equation. Activation energies ranged from 3.2 kJmol⁻¹ (lutein) to 43.7 kJmol⁻¹ (*Opuntia* betaxanthins). β -carotene and lutein exhibited high thermal stability, while betaxanthins and riboflavin degraded rapidly as temperature increased. Gardenia yellow and curcumin were in an intermediate position.

Keywords Food color · Yellow natural colorants · Thermal degradation · Thermal kinetics

Introduction

Since early civilizations, colorants have been used to give a captivating presentation to human-made products, including foods [1]. Experts have long accepted that color plays a crucial role in the taste and perception of food [2]. Furthermore, in recent years, color in food has not only been regarded as a quality trait, but are also associated with health and safety benefits by consumers. The European Food Safety Agency (EFSA) in Europe, the Food and Drug Administration (FDA) in USA, and many other national authorities around the world, have restricted the use of synthetic colorants in foods and beverages because of their confirmed or suspected association with allergic reactions and toxic effects [3]. In addition, a recently published study reported a possible link between hyperactivity in children and the consumption of some synthetic yellow food colorants [4]. The tendency is therefore, for food manufacturers, going progressively toward the use of natural additives, and natural colors provide the further benefit of generally being more internationally accepted, and also some of them even have nutritional and bioactive effects [5]. Nevertheless, in the case of non-alcoholic beverages with added juices some synthetic colorants are mainly used in order to fortify their visual color [6].

The main natural pigments approved as food and drink coloring agents are: curcuminoids, riboflavins, caramels, carotenoids, chlorophylls, anthocyanins, betalains, cochineal, vegetal carbon and inorganic pigments [7]. Nature yellow hues are mainly due to carotenoids, betaxanthins, flavonoids, curcuminoids and riboflavins [5, 8]. There is a great interest in natural yellow colorants due to warnings issued about certain

✉ José A. Fernández-López
josea.fernandez@upct.es

¹ Department of Chemical and Environmental Engineering, Technical University of Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII 52, E-30203 Cartagena, Murcia, Spain

yellow food colorings of synthetic origin [4]. Nevertheless, there are some disadvantages in the application of natural pigments, mainly related with their stability.

Curcumin (E100) is the bright golden yellow pigment found in turmeric. Rhizomes produced by the turmeric plant *Curcuma longa* are dried and ground to produce the spice that contributes to the yellow distinctive color and flavor of mustards, pickles, and curry powder [5]. Riboflavin (E101) is mainly used to fortify foods but can also provide a yellow green color to food. It is particularly sensitive to light, and one example of riboflavin being used is in cake icing [9]. Lutein (E161b) is a natural yellow food colorant obtained from the extraction of marigold flowers. Like other carotenoids, lutein may provide health benefits due to its strong antioxidant properties. It is permitted in the European Union as a food color additive, but is not yet approved in the USA [10]. β -carotene (E160a) is a naturally-occurring pigment that finds widespread use as a colorant in food and beverages. Its shades range from yellow to orange, depending on concentration. It also functions as a safe source of vitamin A and as an antioxidant that contributes to protecting against the damaging effects of free radicals [11]. Gardenia yellow is a rare natural water-soluble colorant, extracted from gardenia fruit (*Gardenia jasminoides*), that is widely used in Asian countries mainly in colored juice, jelly, candy and noodles. Its chemical structure is postulated as crocetin glycosyl esters [12]. It is not approved as a food colorant in the European Union or in the USA. Betaxanthins are water-soluble vacuolar pigments occurring in plants of most families of the plant order Caryophyllales as *Beta vulgaris* and *Opuntia ficus-indica*. They exhibit a yellow-orange coloration [13] and are considered bioessential dietary colorants since they are antiradical molecules and introduce essential dietary amino acids into foodstuffs [8].

The thermal processing of foods involves heating at high temperature, depending on the pH of the product and the desired shelf life. The incorporation of a natural colorant in food requires a detailed knowledge of its stability against possible degradation processes and it is also necessary to know the conditions that regulate this alteration in order to take appropriate measures to ensure sufficient stability that will allow the production, storage and transport of the colored product to be optimized. There are no reported comparative studies on the thermal stability of yellow food colorants, and therefore the aim of this study was to monitor the color alteration of selected yellow colorants used in foods upon heating at different temperatures. Since accurate knowledge of kinetic parameters is essential to predicting the quality changes that occur during thermal processing, a further objective was to estimate the degradation kinetic parameters during heat treatment.

Materials and Methods

Materials

The commercial food colorants: lutein, β -carotene, riboflavin and curcumin in powder form were provided by Proquimac Food & Pharma (Barcelona, Spain). Gardenia yellow was from B&K Food Manufacturing Group Co. (Xiamen, China). The *Opuntia betaxanthin* extract was obtained in our laboratory from *Opuntia ficus-indica* fruits as indicated previously [13]. All chemicals used were of analytical reagent grade (Merck, Darmstadt, Germany). The deionized water used in this study was prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock solutions (1000 mg/100 mL) of each colorant in ethanol-water (3:2, v/v) were prepared. In the case of β -carotene and lutein, drops of acetone were added to completely dissolve the colorant. Successive dilutions were carried out with the same solvent to reach an absorbance of 0.700 ± 0.05 at the wavelength of maximum absorbance (Table 1) in all the colorant extracts. The final solutions were maintained in the dark at 5 °C, used within 5 days, and shaken before use. Figure 1 shows the yellow shades in the final solutions of the six colorants investigated.

Heat Treatment

The thermal stability was tested at 30 °C, 50 °C, 70 °C and 90 °C in different experiments. The colorant solutions were distributed in 25 mL borosilicate test tubes (Pobel S.A., Madrid, Spain) sealed with screw caps and placed in a water bath for the required heat treatment. The tubes were wrapped with aluminum foil to avoid exposure to light. The changes in absorbance were monitored between 400 and 700 nm at time intervals of 1, 2, 3, 4, 5, and 6 h. At the end of the heat treatment, the samples were put in ice to stop any further degradation reaction. After 5 min equilibration in ice bath, an aliquot of each sample was passed through a PTFE filter (0.45 μ m, Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA) and analyzed in an Agilent 8453 UV-visible photodiode spectrophotometer (Waldbronn, Germany). A non-heat treated sample of each colorant served as control to analyse any color intensity change. The experiments were performed in duplicates.

Color Degradation Kinetics

A general reaction rate expression for the degradation kinetics can be written as:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A]^m \quad (1)$$

where “A” is the quantitative value of the component under consideration, “k” is the reaction rate constant, and “m” is the

Table 1 Color properties in the initial solutions of the selected yellow food colorants

	L^*	a^*	b^*	$\lambda_{\max}$ (nm)
Lutein	94.1±0.2 ^b	-14.8±0.3 ^c	75.1±0.2 ^f	445±0.8 ^c
Riboflavin	97.3±0.4 ^e	-17.4±0.3 ^b	69.1±0.4 ^d	446±0.6 ^c
Curcumin	95.6±0.3 ^c	-19.1±0.1 ^a	53.9±0.2 ^b	429±0.5 ^a
β-Carotene	93.9±0.5 ^b	-14.6±0.3 ^c	70.6±0.4 ^e	448±0.6 ^d
Gardenia yellow	96.5±0.2 ^d	-13.8±0.2 ^d	63.2±0.2 ^c	437±0.4 ^b
<i>Opuntia</i> betaxanthins	88.0±0.4 ^a	-1.3±0.2 ^e	51.2±0.1 ^a	478±0.7 ^e

Mean±SD of three determinations. Mean separation by Tukey's test; values within a column followed by a different letter are significantly different ($P<0.05$)

order of the reaction. The color loss during the thermal treatment of colorant extracts was assumed to follow first order kinetics [14, 15], indicating a logarithmic order of degradation, which is mathematically expressed as:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -kt \quad (2)$$

The Arrhenius equation relates the degradation rate constant and the temperature by:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

where "A" represent residual absorbance after thermal treatment, "A₀" the initial absorbance, "t" heating time (h), "k" reaction rate constant (h⁻¹), "k₀" the frequency factor (h⁻¹), "E_a" is the activation energy (kJmol⁻¹), "R" is the universal gas constant (8.314 Jmol⁻¹ K⁻¹) and "T" the absolute temperature (Kelvin). Half-life values ($t_{1/2}$) were determined by plotting the natural logarithm of the A₀/A ratio vs. heating time (Eq. 2). The slope of the graph through the origin obtained by connecting the data points was equated with k, from which the half-life values ($t_{1/2} = \ln 2/k$) were calculated, and the corresponding correlation coefficients were deduced. According to Eq. (3), E_a values were determined by plotting the natural logarithm of the reaction rate constants (k) vs. 1/T; the slope of

the graph corresponds to E_a/R, from which the E_a of each pigment was deduced.

Color Determinations

Color determinations of the colorants during thermal treatments were made in terms of the CIEL*a*b* parameters L* (lightness), a* (redness to greenness) and b* (blueness to yellowness), using standard illuminant D65 and 10° observed angle, as previously reported [16].

Statistical Analysis

All experiments were done by triplicate. Analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests were performed to determine the significance of differences. The mean values and standard deviations were calculated with Minitab statistic software, version 15.0 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania).

Results and Discussion

Incidence of Temperature on the Spectral Properties

The analysis and characterization of natural pigments is mainly based on UV-vis spectroscopy [8]. Also CIEL*a*b* color space represent a versatile tool commonly used to monitor color properties [17]. The initial solutions of the six natural yellow colorants used in this investigation were characterized monitoring their spectral properties and CIEL*a*b* parameters. Color properties, before and after thermal treatment, were determined by CIEL*a*b* measurements as shown in Table 1. In all colorants, the absorbance at maximum wavelength was adjusted to a value of 0.700; as a result, the lightness (L*) values for all colorants were similar and varied in the range from 88.0 to 97.3. The a* (greenness-redness) values were negative, ranging from -1.3 to -19.1, while the b* (blueness-yellowness) values were all positive, as expected from their yellow color, ranging from 51.2 to 75.1. The absorption maxima ranged from 429 (curcumin) to 478 nm (*Opuntia* betaxanthins) with intermediate values for gardenia yellow (437 nm), lutein (445 nm), riboflavin (446 nm) and β-carotene (448 nm). All these spectral differences are responsible of the different yellow shades as depicted in Fig. 1.

Temperature accelerates most chemical degradation reactions that lead to a change or fading in color overtime. The structural alterations that occur after heat treatment of a colorant affect their spectral properties and visual appearance. It is important for a food manufacturer to know how a thermal treatment influences the stability and visual appearance of a colorant, which will determine the development of effective strategies to prevent these undesirable changes.

Fig. 1 Solutions of the selected food colorants. The absorbance of all of them was adjusted to 0.700 at the wavelength of maximum absorbance

The influence of temperature on the thermal degradation patterns of the selected natural yellow colorants was investigated. Figure 2 shows the remaining absorbance of the colorant solutions as a function of the incubation time at the four temperatures (30, 50, 70 and 90 °C) investigated. It can be appreciated that, in all cases, the rate of color degradation increased as the temperature rose. The carotenoids (β -carotene and lutein) were the most thermoresistant colorants and even after the harshest heat treatment (6 h at 90 °C), 93 % of the initial absorbance remained in the lutein solution and 96 % in

the β -carotene solution, without appreciable alterations in their visual appearance. In an intermediate position were curcumin, gardenia yellow and riboflavin, with remaining absorbances after 6 h at 90 °C, of 83, 67 and 53 %, respectively. In the *Opuntia* extract, only 11 % of its initial absorbance remained after this thermal treatment, revealing the low stability of betaxanthins at higher temperatures, as reported previously in the bibliography [17]. At 30, 50 and 70 °C, also β -carotene and lutein were the colorants showing the highest stability, followed by curcumin, gardenia yellow, riboflavin and

Fig. 2 Effect of the time-temperature binomial on the remaining absorbance of the colorant solutions

Opuntia betaxanthins (Fig. 2). In all cases *Opuntia* betaxanthins showed a high thermolability, their remaining absorbance being 89 % at 30 °C, 67 % at 50 °C and 51 % at 70 °C, at the end of the treatment (6 h).

The higher or lower degree of color stability of the selected colorants can also be visualized by analyzing the changes in their visible absorption spectra during the incubation time. Figure 3 shows the incidence of heating at 90 °C on the absorption spectra (380–600 nm) of the six

natural yellow colorants selected. Each graph depicts the spectra at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. The overlapping of the successive spectra of β -carotene and lutein means that no color degradation occurs in these extracts. The heat treatment resulted in greater color degradation in the gardenia yellow and riboflavin extracts, although the most pronounced color degradation was observed in the *Opuntia* colorant which lost virtually all its yellow color at the end of the treatment.

Fig. 3 Influence of temperature (90 °C) on the visible spectra of the selected colorants. The different lines correspond to the spectra after exposure times at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h. The arrow indicates that successive spectra are placed in that sense

Although there are no reported comparative studies on the thermal stability of natural yellow colorants used in foods, our results confirm the well-known thermoresistance of carotenoids, which can withstand exposure to high temperatures with minimal degradation [18]. The thermal lability of betaxanthins, considered as temperature-sensitive pigments, has also been reported [19].

Degradation Kinetics

Kinetic models are often used for a fast, objective and economic appraisal of food color [14]. The idea of kinetics studies on food color changes in thermal processing is to quantify a color attribute, as a function of heating time, at a certain temperature using temperature-dependent reaction rate constant after the order of reaction is decided. Knowledge of degradation kinetics, including reaction order, rate constant and activation energy is crucial for predicting color loss during thermal process treatments as well as storage of food colorants. Natural pigments degradation under isothermal heating is reported to follow first order kinetics [16, 20, 21]. The degradation kinetics shows the decrease in the residual absorbance vs. incubation time.

The degradation reaction rate constants (k), half-life periods ($t_{1/2}$) and activation energy values (E_a) obtained are given in Table 2, all significant at the 95 % probability level. The degradation constants (k) showed a clear temperature-dependent trend, increasing as the temperature increased, corroborating the idea that the greater the temperature, the greater the colorant degradation. These increases in the degradation constants were higher for the more heat-sensitive colorants (*Opuntia* betaxanthins and riboflavin), whereas for the more thermoresistant colorants (lutein and β -carotene) the increases were much lower. It should also be noted that half-life values ($t_{1/2}$) decreased as the temperature increased. Maximum $t_{1/2}$ values were found for the carotenoid colorants, β -carotene exhibiting the best heat stability. For example, at 90 °C, β -carotene showed a $t_{1/2}$ value of 141.5 h, which is six times higher than the half-life of curcumin, 22 times higher than that of riboflavin, and 69 times higher than in the case of *Opuntia* betaxanthins. At 30 °C β -carotene showed a $t_{1/2}$ of 223.6 h, twice that of curcumin, 3.3 times higher than that of riboflavin, and 5.2 times higher than for *Opuntia* betaxanthins. As temperature was higher the different stability between carotenoids and curcumin, riboflavin, gardenia yellow and betaxanthins became much more evident. In previous studies, high half-life values were also reported for carotenoids whereas the low half-life values of betaxanthins at temperatures higher than 30 °C is well documented [17, 19].

The temperature sensitivity of the rate constants (k) was analyzed using the Arrhenius equation (Eq. 3). The

Table 2 Kinetic parameters for the thermal degradation of the selected yellow food colorants

	Temperature (K)	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	E_a (kJ mol ⁻¹)
Lutein	303	0.45	92.42 (0.94)*	3.2
	323	0.52	79.67 (0.92)	
	343	0.54	77.02 (0.96)	
	363	0.59	74.53 (0.98)	
Riboflavin	303	0.61	68.63 (0.98)	36.4
	323	0.84	49.51 (0.93)	
	343	2.29	18.19 (0.99)	
	363	6.38	6.52 (0.99)	
Curcumin	303	0.39	106.64 (0.92)	23.7
	323	0.65	63.59 (0.94)	
	343	1.19	34.83 (0.95)	
	363	1.80	23.11 (0.94)	
β -Carotene	303	0.19	223.60 (0.98)	6.5
	323	0.23	177.73 (0.97)	
	343	0.25	169.06 (0.94)	
	363	0.29	141.46 (0.95)	
Gardenia yellow	303	0.55	76.17 (0.93)	31.2
	323	0.76	55.01 (0.94)	
	343	2.33	17.82 (0.95)	
	363	3.68	11.31 (0.99)	
<i>Opuntia</i> betaxanthins	303	0.98	42.27 (0.98)	43.7
	323	4.13	10.08 (0.98)	
	343	6.55	6.35 (0.99)	
	363	20.32	2.05 (0.97)	

* Correlation coefficient of determination (R^2) shown in parenthesis

temperature dependence of colorant degradation was verified by the linear behavior of $\ln k$ as a function of the inverse of the temperature ($1/T$). From the slopes of these lines, the activation energies (E_a) were obtained, all with determination coefficients (R^2) higher than 0.97, being therefore efficient in the determination of this parameter. E_a is defined as the minimum energy requirement that must be met for a chemical reaction to occur (energy barrier). When temperature increases, the number of molecules with energy greater than the activation energy is higher, thus improving the rate of reaction. Therefore, E_a is a parameter that indicates the sensitivity of the reaction rate to temperature. Activation energies ranged between 3.2 kJmol⁻¹ (lutein) and 43.7 kJmol⁻¹ (*Opuntia* betaxanthins), for greater E_a the rate of reaction is more sensitive to temperature changes, so a smaller temperature change is sufficient to degrade this colorant more rapidly. These results were consistent with those reported for natural colorants such as red cochineal (3 kJmol⁻¹, 50–90 °C) [16], carotenoids (20 kJmol⁻¹, 70–105 °C) [22], betacyanins (38–53 kJmol⁻¹, 50–120 °C) [15, 16], and anthocyanins (59 kJmol⁻¹, 60–90 °C) [23].

Fig. 4 Colorimetric plane (a^* vs. b^*) showing the impact of the thermal treatments on the visual appearance of the colorant solutions. Each data set represents the evolution of the colorimetric parameters a^* and b^* for each of the heat treatments performed. The closer the series of points remain, the lower the extent of any color degradation

Effect of Heat Treatment on Visual Color

For a more thorough investigation of color degradation in the studied colorants, the incidence of the time-temperature binomial on their visual appearance was assessed by following the evolution of the CIEL*a*b* chromatic parameters. The CIEL*a*b* system is a versatile and reliable method to appraise precise color modifications and is extensively used for routine quality control measurements by food manufacturers [17]. In agreement with previous studies, thermal processing involved a slight increase in lightness (L^*) [15, 24], although more profound modifications could be observed in the colorimetric plane. Changes in the red-green parameter (a^*) and in the blue-yellow parameter (b^*) were much more evident as the heat treatment became more severe, particularly in the case of the most thermosensitive colorants. Figure 4 illustrates the evolution of the colorimetric parameters a^* and b^* for each of the heat treatments carried out. At 30 °C, the whole series of points remained closely grouped, with minimum displacement during the 6 h of thermal treatment, and total color difference less than 3.0. The closer the series of points remained, the lower the extent of any color degradation. As temperature

increased, the dispersion of the points became more pronounced, especially in the case of *Opuntia* betaxanthins, riboflavin and gardenia yellow, confirming that these colorants degrade rapidly, indicating their instability at high temperatures. At 70 and 90 °C, only the points referring to lutein and β-carotene remained grouped, with total color differences lower than 4.0 at the end of the treatment.

Conclusions

Stable and attractive natural yellow colors are highly valued attributes in the competitive food and beverage market. The influence of the time-temperature binomial on color degradation needs to be understood before suitable measures can be taken to ensure sufficient stability. The study described concerning the thermal stability of lutein, riboflavin, curcumin, β-carotene, gardenia yellow and *Opuntia* betaxanthins, reveals that carotenoid colorants (lutein and β-carotene) exhibit the highest thermoresistance, while betaxanthins show the greatest lability in the face of thermal treatment. Nevertheless, *Opuntia* betaxanthins exhibit bright

yellow color characteristics under controlled temperature conditions, and they may become a new source of natural water-soluble yellow colorants for use in food processing at low temperature. The results indicate that the degradation of the studied colorants follows a first-order reaction kinetic. The variations observed in the degradation rate constants with temperature followed the Arrhenius relationship. Further studies are needed with model food systems and real foods since the susceptibility of the colorants to heat treatment might be modified by interactions with the food ingredients.

Acknowledgments This research is part of the QUIMYTEC R&D group. The authors acknowledge the support of the Fundación Séneca (project 08702PI08). We are thankful to José Fresneda for providing food colorants samples from Proquimac Food & Pharma.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interests.

References

- Downham A, Collins P (2000) Colouring our foods in the last and the next millennium. *Int J Food Sci Technol* 35:5–22
- Spence C, Levitan CA, Shankar MU, Zampini M (2010) Does food color influence taste and flavor perception in humans? *Chemosens Percept* 3:68–84
- Martelli G, Folli C, Visai L, Daglia M, Ferrari D (2014) Thermal stability improvement of blue colorant C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochem* 49:154–159
- McCann D, Barret A, Cooper C, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Kitchin E, Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga-Barke E, Warner JO, Stevenson J (2007) Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet* 370:1560–1567
- Wrolstad RE, Culver CA (2012) Alternatives to those artificial FD&C food colorants. *Ann Rev Food Sci Technol* 3:59–77
- García-Falcón MS, Simal-Gándara J (2005) Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up. *Food Control* 16:293–297
- Scotter MJ (2011) Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Food Addit Contam* 28:527–596
- Delgado-Vargas F, Jiménez-Aparicio A, Paredes-López O (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40:173–289
- Dufossé L (2006) Microbial production of food grade pigments. *Food Technol Biotechnol* 44:313–321, <http://www.ftb.com.hr/images/pdfarticles/2006/July-September/44-313.pdf>
- Sowbhagya HB, Sampathu SR, Krishnamurthy N (2004) Natural colorant from marigold-chemistry and technology. *Food Rev Int* 20:33–50
- Mortensen A (2006) Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl Chem* 78:1477–1491
- Ozaki A, Kitano M, Furusawa N, Yamaguchi H, Kuroda K, Endo G (2002) Genotoxicity of gardenia yellow and its components. *Food Chem Technol* 40:1603–1610
- Fernández-López JA, Giménez PJ, Angosto JM, Moreno JJ (2012) A process of recovery of a natural yellow colourant from *Opuntia* fruits. *Food Technol Biotechnol* 50:246–251, <http://ftb.com.hr/images/pdfarticles/2012/April-June/246.pdf>
- Patras A, Brunton NP, O'Donnell C, Tiwari BK (2010) Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends Food Sci Technol* 21:3–11
- Chandran J, Nisha P, Singhal RS, Pandit AB (2014) Degradation of colour in beetroot (*Beta vulgaris* L): a kinetics study. *J Food Sci Technol* 51:2678–2684
- Fernández-López JA, Angosto JM, Giménez PJ, León G (2013) Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Foods Hum Nutr* 68:11–17
- Moßhammer MR, Maier C, Stintzing FC, Carle R (2006) Impact of thermal treatment and storage on color of yellow-orange cactus pear (*Opuntia ficus-indica* [L.] Mill cv 'Gialla') juices. *J Food Sci* 71: C400–C406
- Boon CS, McClements DJ, Weiss J, Decker EA (2010) Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50:515–532
- El Gharras H, Hasib A, Jaouad A, El-Boudadli A, Schoefs B (2008) Stability of vacuolar betaxanthin pigments in juices from Moroccan yellow *Opuntia ficus-indica* fruits. *Int J Food Sci Technol* 43:351–356
- Yang Z, Han Y, Gu Z, Fan G, Chen Z (2008) Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innov Food Sci Emerg Technol* 9:341–347
- Fratiani A, Albanese D, Mignogna R, Cinquanta L, Panfili G, Di Matteo M (2013) Degradation of carotenoids in apricots (*Prunus armeniaca* L.) during drying process. *Plant Foods Hum Nutr* 68: 241–246
- Ahmed J, Shivhare US, Sandhu KS (2002) Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *J Food Sci* 67:2692–2695
- Wang WD, Xu SY (2007) Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *J Food Eng* 82:271–275
- Sadilova E, Carle R, Stintzing FC (2007) Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and *in vitro* antioxidant capacity. *Mol Nutr Food Res* 5:1461–1471