

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

Departamento de Tecnología de Alimentos



Intensificación de la extracción de betanina en remolacha roja mediante ultrasonidos y pulsos eléctricos

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Lucía Menor García

TUTORES: José Javier Benedito Fort
Javier Raso Pueyo

Curso Académico 2018/2019

VALENCIA, MAYO 2019

Título: Intensificación de la extracción de betanina en remolacha roja mediante ultrasonidos y pulsos eléctricos.

Resumen: El creciente interés de los consumidores por los colorantes naturales en los alimentos, se debe a la preocupación por la seguridad de muchos colorantes sintéticos, reforzado por la posible existencia de beneficios para la salud, que presentan los pigmentos naturales. Esto ha dado lugar a un aumento de las investigaciones encaminadas a mejorar el rendimiento en la obtención de estos colorantes.

La finalidad principal de este trabajo fue establecer el efecto de la combinación de pulsos eléctricos y ultrasonidos de potencia sobre la extracción de betanina de la remolacha roja. Se determinaron, además, las cinéticas de extracción sólido-líquido con y sin la aplicación del pretratamiento de pulsos eléctricos, así como el efecto de las variables del proceso (agitación mecánica o ultrasonidos), el tipo de disolvente utilizado (agua o etanol) y la temperatura de extracción.

Generalmente, los mejores rendimientos en la extracción del pigmento se alcanzaron a mayores concentraciones de etanol (EtOH), obteniéndose un incremento del 22,13% (EtOH 10%), del 52,5% (EtOH 30%) y del 54,7% (EtOH 70%) respecto al rendimiento obtenido con agua destilada. Los resultados obtenidos muestran que concentraciones superiores al 30% de etanol no suponen una mejoría notable en el rendimiento de la extracción.

Los efectos del pretratamiento con PEF (1,25 kV/cm; 500 μ s) fueron notables con todos los disolventes empleados, sin embargo, fueron mayores a menor concentración de etanol en el disolvente extractor, obteniéndose un 59,5% más de betanina, en el caso de utilizar únicamente agua como disolvente en agitación mecánica, tras la aplicación del pretratamiento.

El empleo de ultrasonidos hizo que el rendimiento aumentara en promedio un 13% respecto a la agitación mecánica, teniendo un mayor efecto al combinarlo con pulsos eléctricos, llegando a alcanzarse hasta un 83,1% de betanina extraída (EtOH 70%; potencia US del 50% y PEF). En el caso del empleo de agua, disolvente con el que se estudió el efecto de la temperatura, el rendimiento de la extracción aumentó un 28,4% a la temperatura de 45°C respecto a la de 25°C.

La aplicación de 32 pulsos eléctricos (1,25 kV/cm; 800 μ s) condujo a una disminución de hasta un 46% en la fuerza máxima para cortar la remolacha, lo que facilitaría la etapa de reducción de tamaño previa a la extracción.

El elevado coeficiente de determinación R^2 del modelo de Weibull refleja el buen ajuste a los datos experimentales de las extracciones realizadas.

Los resultados del presente trabajo muestran como la combinación de pulsos eléctricos y ultrasonidos permite aumentar significativamente la velocidad en las cinéticas de extracción y mejorar el rendimiento final del proceso, lo que puede llegar a ser una herramienta muy útil con vistas a una aplicación industrial.

Palabras clave: extracción, betanina, modelización, PEF, ultrasonidos, etanol.

Títol: Intensificació de l'extracció de betanina en remolatxa roja mitjançant ultrasons i polsos elèctrics.

Resum: El creixent interès dels consumidors pels colorants naturals en els aliments, es deu a la preocupació per la seguretat de molts colorants sintètics, reforçat per la possible existència de beneficis per a la salut, que presenten els pigments naturals. Açò ha suposat un augment de les investigacions encaminades a millorar el rendiment en l'obtenció d'aquests colorants.

La finalitat principal d'aquest treball va ser establir l'efecte de la combinació de polsos elèctrics i ultrasons de potència sobre l'extracció de betanina de la remolatxa roja. Es van determinar, a més, les cinètiques d'extracció sòlid-líquid amb i sense l'aplicació del pretractament de polsos elèctrics, així com l'efecte de les variables del procés (agitació mecànica o ultrasons), el tipus de dissolvent utilitzat (aigua o etanol) i la temperatura d'extracció.

Generalment, els millors rendiments en l'extracció del pigment es van aconseguir a majors concentracions d'etanol (EtOH), obtenint-se un increment del 22,13% (EtOH 10%), del 52,5% (EtOH 30%) i del 54,7% (EtOH 70%) respecte al rendiment obtingut amb aigua destil·lada. Els resultats obtinguts mostren que concentracions superiors al 30% d'etanol no suposen una millora notable en el rendiment de l'extracció.

Els efectes del pretractament amb PEF (1,25 kV/cm; 500 µs) van ser notables amb tots els dissolvents emprats, no obstant això, van ser majors a menor concentració d'etanol en el dissolvent extractor, obtenint-se un 59,5% més de betanina en el cas d'utilitzar únicament aigua com a dissolvent en agitació mecànica, després de l'aplicació del pretractament.

La utilització d'ultrasons va fer que el rendiment augmentara com a mitjana un 13% respecte a l'agitació mecànica, tenint un major efecte al combinar-ho amb polsos elèctrics, arribant a aconseguir-se fins a un 83,1% de betanina extreta (EtOH 70%; potència US del 50% i PEF). En el cas de la utilització d'aigua, dissolvent amb el que es va estudiar l'efecte de la temperatura, el rendiment de l'extracció va augmentar un 28,4% a la temperatura de 45°C respecte a la de 25°C.

L'aplicació de 32 polsos elèctrics (1,25 kV/cm; 800 µs) va conduir a una disminució de fins a un 46% en la força màxima per a tallar la remolatxa, la qual cosa facilitaria l'etapa de reducció de grandària prèvia a l'extracció.

L'elevat coeficient de determinació R^2 del model de Weibull reflecteix el bon ajust a les dades experimentals de les extraccions realitzades.

Els resultats del present treball mostren com la combinació de polsos elèctrics i ultrasons permet augmentar significativament la velocitat en les cinètiques d'extracció i millorar el rendiment final del procés, la qual cosa pot arribar a ser una ferramenta molt útil amb vista a una aplicació industrial.

Paraules clau: extracció, betanina, modelització, PEF, ultrasons, etanol.

Title: Enhancement of betanin extraction from red beetroot by ultrasounds and pulsed electric fields.

Abstract: Consumers' growing interest in natural food colourants is due to a higher concern in the safety of artificial food colourants, reinforced by the possible health benefits regarding to natural pigments. Consequently, it has led to an increase in the number of studies whose aim is the extraction yield enhancement of these pigments.

The main purpose of this work was to establish the effect of the combination of both electric pulses and ultrasounds in betanin extraction from red beetroot. Solid-liquid extraction kinetics were determined with and without an applied pretreatment of electric pulses, as well as the effect of all process variables (mechanical stirring or ultrasounds), the solvent (water or ethanol) and the extraction temperature.

Generally, better extraction yields were achieved with higher ethanol concentrations (EtOH), resulting in an increase of 22,13% (EtOH 10%), 52,5% (EtOH 30%) and 54,7% (EtOH 70%) compared to using distilled water as a solvent. Performed research shows that concentrations above 30% of ethanol are not considered to have a significant improvement in the extraction yield.

All solvents used in the extraction had noteworthy effects after the PEF treatment (1,25 kV/cm; 500 μ s). Nevertheless, these effects were always higher when using a lower ethanol concentration. As an example, an increase of 59,5% of betanin was obtained with water in the mechanical stirring extraction after the PEF treatment.

Moreover, ultrasounds increased the extraction yield by 13% compared to mechanical stirring, which had a higher effect in combination of electric pulses, obtaining up to 83,1% of betanin (EtOH 70%; 50% US power and PEF treatment). The study of the effect of temperature in the extraction yield, when just water was employed, showed an increase of 28,4% in the extraction yield at 45°C compared to 25°C.

The application of 32 electric pulses (1,25 kV/cm; 800 μ s) led to a reduction from up to 46% in the peak force to cut the beetroot. According to these results, the previous cutting stage for a size reduction would therefore be easier to perform.

The high coefficient of determination R^2 in the Weibull model indicates a good fitting of this normalized model on the data set.

The results concerning this study show how the combination of both electric pulses and ultrasounds can noticeably increase the extraction kinetics speed, as well as improve the extraction yield of the final process, which could be highly useful towards an industrial application.

Key words: extraction, betanin, modelling, PEF, ultrasounds, ethanol.

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. COLORANTES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	2
1.1.1. Colorantes artificiales.....	3
1.1.2. Colorantes naturales	4
1.2. PULSOS ELÉCTRICOS (PEF). APLICACIÓN EN LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN	6
1.2.1. Fenómeno de electroporación.....	7
1.2.2. Aplicaciones de la electroporación	8
1.3. Textura de la remolacha roja	10
1.4. ULTRASONIDOS DE POTENCIA. APLICACIÓN EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	10
1.4.1. Factores que influyen en la velocidad de extracción	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. MATERIA PRIMA	13
3.2. PRETRATAMIENTO CON PULSOS ELÉCTRICOS (PEF)	13
3.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE BETANINA	14
3.3.1. Cuantificación de betanina	14
3.3.2. Determinación de la cantidad máxima de betanina extraíble.....	15
3.3.3. Ultrasonidos (US)	15
3.4. TEXTURA DE LA REMOLACHA ROJA	16
3.5. PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL.....	16
3.6. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1. CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN DE BETANINA SIN PRETRATAMIENTO PEF	18
4.1.1. Influencia de la temperatura en las cinéticas de extracción con y sin USP.....	18
4.1.2. Influencia del disolvente en las cinéticas de extracción con y sin USP.	20
4.2. CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN DE BETANINA CON PRETRATAMIENTO PEF.....	23
4.2.1. Influencia de la temperatura en las cinéticas de extracción con y sin USP.....	23
4.2.2. Influencia del disolvente en las cinéticas de extracción con y sin USP.	25
4.3. EFECTO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO EN LA EXTRACCIÓN DE BETANINA.	27
4.3.1. Extracción S-L en agua a diferentes temperaturas	27
4.3.2. Extracción S-L en agua y etanol a temperatura constante.....	29
4.4. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON PEF SOBRE LA TEXTURA DE LA REMOLACHA ...	31
4.5. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA.....	33
5. CONCLUSIONES.....	34
6. BIBLIOGRAFÍA.....	36

Índice de Figuras

Figura 1 Estructura química de la betanidina 5-O-β-D-glucósido (betanina).....	5
Figura 2 Esquema de la celda de tratamiento del equipo de PEF.....	6
Figura 3 Esquema de la membrana celular sin poros (A), con un poro hidrofóbico (B), con un poro hidrofílico reversible (C) y con un poro hidrofílico irreversible (D).....	7
Figura 4 Vista microscópica del tejido de la remolacha después de una extracción en agua: sin pretratamiento (a) y con pretratamiento de PEF (b).	9
Figura 5 Ilustración de un baño de ultrasonidos. Fuente:(Chemat et al., 2017).	11
Figura 6 Equipo y cámara empleados para el tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje.	13
Figura 7 Equipo generador de ultrasonidos.	15
Figura 8 Montaje baño USP.	15
Figura 9 Esquema del montaje experimental para realizar la extracción con USP.	16
Figura 10 Toma de muestras para realizar la medida de la fuerza de corte y el trabajo de compresión... ..	16
Figura 11 Cinéticas de extracción de betanina para el agua con agitación mecánica a 25, 35 y 45°C. Muestras sin pretratamiento PEF.	19
Figura 12 Cinéticas de extracción de betanina para el agua empleando US con una potencia de 43 W/l a 25, 35 y 45°C. Muestras sin pretratamiento PEF.	20
Figura 13 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el etanol al 10, 30 y 70% con agitación mecánica a 25°C. Muestras sin pretratamiento PEF.	21
Figura 14 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el etanol al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 21 W/l a 25°C. Muestras sin pretratamiento PEF.	22
Figura 15 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el etanol al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 39 W/l a 25°C. Muestras sin pretratamiento PEF.	22
Figura 16 Cinéticas de extracción de betanina para el agua en agitación mecánica a 25, 35 y 45°C. Muestras con pretratamiento PEF.	24
Figura 17 Cinéticas de extracción de betanina para el agua empleando US con una potencia de 43 W/l a 25, 35 y 45°C. Muestras con pretratamiento PEF.	24
Figura 18 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70% con agitación mecánica a 25°C. Muestras con pretratamiento PEF.....	25
Figura 19 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 21 W/l a una temperatura de 25°C. Muestras con pretratamiento PEF.	26
Figura 20 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 39 W/l a una temperatura de 25°C. Muestras con pretratamiento PEF.	26
Figura 21 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada comparando los diferentes métodos de extracción.	28
Figura 22 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada comparando las diferentes temperaturas.	28
Figura 23 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada en función de los tiempos de extracción.	29
Figura 24 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada con o sin la aplicación de PEF.	29
Figura 25 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina comparando diferentes disolventes.	30
Figura 26 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con diferentes disolventes comparando los métodos de extracción.	30
Figura 27 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con diferentes disolventes a los diferentes tiempos de extracción.	31
Figura 28 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con diferentes disolventes comparando la aplicación de tratamiento PEF.	31
Figura 29 Secciones transversales de remolacha: sin pretratamiento de PEF (A) y con tratamiento de PEF de 8 pulsos (B), 20 pulsos (C) y 32 pulsos (D; fuerza de campo de 1,25 kV/cm; duración de pulso de 25 μs y 10 Hz de frecuencia.	32

Figura 30 Valor medio y desviación estándar para el trabajo de compresión de la remolacha a dos velocidades de corte, con diferentes tratamientos PEF.	32
Figura 31 Valor medio y desviación estándar para la fuerza máxima de compresión de la remolacha a dos velocidades de corte, con diferentes tratamientos PEF.	32

Índice de Tablas

Tabla 1 Ejemplos de colorantes sintéticos.	4
Tabla 2 Ejemplo de colorantes naturales.	5
Tabla 3 Planificación experimental empleando agua como disolvente.	17
Tabla 4 Planificación experimental empleando etanol como disolvente; temperatura de extracción 25°C.	17
Tabla 5 Cantidad de betanina extraída (%) mediante los diferentes métodos de extracción, con o sin pretratamiento, para cada disolvente tras 180 minutos de extracción. Media y desviación estándar.	27
Tabla 6 Parámetros obtenidos tras el ajuste de las cinéticas de extracción con el modelo de Weibull y el rendimiento real de la extracción a los 180 minutos de extracción.	34

1. INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria ha realizado un gran esfuerzo de desarrollo tecnológico, por lo que cada vez es posible encontrar en el mercado un mayor abanico de nuevos productos, con mejor calidad microbiológica, más seguros y con mayores tiempos de conservación. A su vez, cabe destacar el atractivo sensorial de estos productos, incluyendo la percepción visual (forma, textura y color), el olor o el sabor.

La diversidad de alimentos en nuestros mercados existe gracias a la globalización de la producción alcanzada en el siglo XXI. Los alimentos procesados suelen recorrer largas distancias hasta llegar al consumidor y, con el fin de mantener la calidad del producto original durante el mayor tiempo posible, se utilizan los llamados aditivos alimentarios. Para regular la utilización de estos aditivos, la FAO y la OMS, mediante la implantación del *Codex Alimentarius*, además de la Unión Europea, establecen las condiciones bajo las que los aditivos pueden ser utilizados en las industrias alimentarias (Martins et al., 2019).

La EFSA (*European Food Safety Authority*) define el término “*aditivo alimentario*” de la siguiente forma: “*sustancia añadida deliberadamente a alimentos y bebidas por razones tecnológicas beneficiosas (por ejemplo, para conservar, dar sabor, color o asegurar una textura determinada).*”

Los aditivos cumplen funciones diversas y por ello se pueden agrupar, según su cometido, en espesantes, gelificantes, estabilizadores, colorantes, edulcorantes, aromas y saborizantes, antioxidantes y conservadores, entre otros.

Los colorantes alimentarios son un tipo de aditivos que proporcionan color a los alimentos, tanto para hacerlos más atractivos para el consumidor, como para devolverle el color perdido durante el procesado, lo que supone un papel muy importante en la presentación del producto. Se ha demostrado en muchas ocasiones que el color de los alimentos influye en la percepción del sabor, así como en la estimulación del apetito (Strugnell, 1997; Spence et al., 2010), ya que el cerebro utiliza esta propiedad para hacer predicciones sobre el sabor basándose en el aspecto visual del producto. Según Spence (2015), el color del alimento puede ser considerado como la señal sensorial intrínseca más importante a la hora de elegir un producto.

Los colorantes pueden obtenerse bien por síntesis química (colorantes artificiales) o mediante procesos de extracción de matrices naturales que los contienen (colorantes naturales). En este último caso, se suele recurrir a procesos de extracción sólido-líquido.

La lixiviación o extracción sólido-líquido (S-L) es una operación básica o unitaria, mediante la cual se extraen uno o varios constituyentes de un sólido, a través de la utilización de un disolvente líquido, que puede ser de carácter orgánico o inorgánico. Si el soluto se encuentra disperso en el sólido de forma uniforme, se disolverá en primer lugar el material más cercano a la superficie. Posteriormente, el disolvente se introduce a través de los poros de la matriz sólida por difusión, para alcanzar el material soluble, siendo cada vez más difícil acceder al soluto situado en las capas más internas y ralentizándose de esta forma la velocidad de extracción.

Generalmente, el proceso se lleva a cabo en tres etapas: en primer lugar, el soluto que se encuentra en la parte más externa del sólido se pone en contacto directo con el disolvente, el cual va penetrando al interior a través de los poros conforme transcurre la extracción; en segundo lugar, se lleva a cabo la difusión del soluto disuelto contenido en los poros hasta la superficie de la partícula sólida y finalmente, la transferencia del soluto desde la superficie de la partícula sólida hacia la masa principal de disolvente.

El principal objetivo de la extracción es obtener el compuesto en cuestión con el máximo rendimiento posible, sin dañar las propiedades que le dan valor y minimizando la extracción de otros componentes (selectividad de la extracción). La extracción sólido-líquido también se puede emplear para eliminar de una matriz sólida un compuesto soluble que lo está contaminando. El método utilizado para realizar una extracción sólido-líquido estará determinado por la proporción de componente soluble presente, su distribución en el sólido, su naturaleza y el tamaño de partícula.

Se ha investigado la extracción de una gran variedad de componentes de los alimentos: aromas, antioxidantes, aceites esenciales, polisacáridos, pigmentos u otros compuestos orgánicos y minerales (Mestdagh et al., 2014; Ferrentino, 2018; Giacometti et al., 2018; Luo et al., 2018). Las principales fuentes de estos componentes son tejidos de animales, microalgas, levaduras, y plantas.

Las técnicas de extracción convencionales como la extracción Soxhlet, la maceración o la destilación Clevenger requieren una gran inversión de capital, un elevado consumo de energía (mecánica y/o térmica) o una excesiva liberación de CO₂ a la atmósfera.

Con el fin de intensificar la extracción y aumentar el rendimiento, se han estudiado nuevos métodos y tecnologías que se pueden utilizar de manera complementaria a las técnicas convencionales, como, por ejemplo: pulsos eléctricos de alto voltaje, ondas microondas, ultrasonidos de potencia, pulsos de luz, calentamiento óhmico, irradiación, calentamiento por radiofrecuencia y altas presiones (Vorobiev & Lebovka, 2010).

Estas nuevas tecnologías reducen la utilización de disolventes tóxicos y, además de acelerar las cinéticas del proceso, aumentan el rendimiento de la extracción y la calidad del extracto. Se denominan, además, técnicas de extracción en frío puesto que el incremento de la temperatura es relativamente bajo y, por lo tanto, se minimiza el efecto sobre la calidad del componente extractado.

Actualmente se sigue estudiando la sustitución de los disolventes orgánicos convencionales por otros más respetuosos con el medio ambiente y más económicos, como por ejemplo los Disolventes Eutécticos Profundos (DES) (Ruesgas-Ramón et al., 2017).

1.1. COLORANTES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los colorantes en la industria alimentaria se pueden clasificar en tres grupos: colorantes naturales, que son aquellos sintetizados de forma natural; los que imitan a los colorantes naturales pero que son sintetizados químicamente en la industria, y por último, los sintéticos o artificiales (Msagati, 2013).

El color es el factor principal a la hora de fijar nuestras expectativas en cuanto al sabor y el olor de un alimento o una bebida y en la mayoría de ocasiones puede suponer la aceptación o rechazo del producto. Es por esto por lo que las empresas se esfuerzan por encontrar los colores más apropiados para sus productos, a pesar de que el empleo de colorantes responde más a exigencias de carácter estético, para satisfacer a los consumidores, que a las propias necesidades del fabricante.

El uso de colorantes en la alimentación se empezó a generalizar a partir de 1900, pero en la actualidad es uno de los factores más importantes en la creación de nuevos productos.

Uno de los ejemplos más significativos es el ácido carmínico (E-120), un colorante que se extrae de la cochinilla y otros insectos. Se lleva utilizando desde la Edad Media en cosméticos y

textiles, pero también en la industria alimentaria como conservas vegetales, mermeladas, productos cárnicos, lácteos, etc. Su empleo está decayendo, siendo sustituido por otros colorantes ya que su obtención es costosa económicamente.

Algunas veces este tipo de aditivos se emplean para resaltar el color natural de los alimentos y para devolver el color perdido durante el procesado y la conservación, como es el caso de algunas verduras en conserva, que pierden su color original tras los tratamientos térmicos de conservación.

Muchos de los alimentos que consumimos, especialmente las frutas y verduras, tienen un color cuyo tono proviene de los pigmentos que los constituyen: los verdes, denominados clorofilas y que se forman mediante la fotosíntesis; los amarillo-rojo-anaranjados o carotenoides; los violeta-azulados o antocianinas y las betaninas, con un tono rojo-violeta.

Los colorantes sintéticos tienen, normalmente, mejores propiedades funcionales y tecnológicas que los naturales, pero la tendencia hacia el consumo de colorantes naturales ha aumentado. En este sentido, se puede comprobar cómo, en estos últimos años, los productos con etiquetas "sin E", han ganado terreno debido a una mayor preocupación por la seguridad de los alimentos, ya que algunos aditivos pueden provocar reacciones de intolerancia o hipersensibilidad a las personas que los ingieren.

Según Carmona (2013), algunos de los factores que influyen en la decisión de utilizar un colorante natural respecto al sintético son: un mayor costo que el de su equivalente sintético; la estabilidad del color y su dependencia de factores como el pH, la temperatura, la exposición a la luz y reacciones de oxidación con otros ingredientes; la uniformidad del color durante el procesado y almacenaje del alimento; la durabilidad del color y la alteración del sabor durante la conservación; la inocuidad y las propiedades beneficiosas que ofrecen algunos de los pigmentos naturales.

En cuanto a la legislación vigente, todos los aditivos (incluidos los colorantes) deben contar con una autorización y cumplir con el Reglamento CE 1331/2008 para ser utilizados. Se les identifica con la letra E seguida de un número, que en el caso de los colorantes se corresponde a los números entre el 100 y el 180. Son regulados en función del tipo de alimentos al que pueden ser añadidos, en qué condiciones y las restricciones de venta de cada uno.

Actualmente, los colorantes son el grupo de aditivos en el que se encuentran las diferencias más notables en cuanto a legislación entre distintos países. En algunos lugares, como ocurre en los países nórdicos, prácticamente no pueden utilizarse, mientras que en Reino Unido se utilizan algunos que no están autorizados en apenas ningún otro país de la Unión Europea (Sánchez Juan, 2013).

1.1.1. Colorantes artificiales

Tecnológicamente, los colorantes sintéticos han resultado tener excelentes propiedades en cuanto a solubilidad, con la posibilidad de obtener una amplia gama de colores, siendo relativamente resistentes a los propios tratamientos de procesado, además de ser significativamente más baratos que los naturales. La solubilidad al agua de este tipo de colorantes se debe a la presencia de ácido sulfónico y son utilizados en forma de sales sódicas, en líquidos y materiales pastosos. También pueden utilizarse en forma insoluble, como lacas, cuando se añaden a productos sólidos, para evitar que destiñan (Sánchez Juan, 2013).

Gracias a una creciente y continua búsqueda, se han creado numerosos colorantes alimentarios sintéticos para mejorar la calidad organoléptica de algunos productos. Sin embargo, con el paso

del tiempo, muchos de ellos han sido prohibidos y retirados del mercado debido a las claras evidencias de sus efectos secundarios, señales de toxicidad a corto y largo plazo, incluyendo posibles efectos carcinogénicos (Carocho et al., 2014; Amchova et al., 2015).

Basados en la Ingesta Diaria Recomendada (IDR), los colorantes con tonalidades azules, amarillas, verdes y blancas, en este orden, son los de menor riesgo (Martins et al., 2016). La Tabla 1 muestra algunos ejemplos de colorantes alimentarios sintéticos y los productos en los que se utilizan.

Los colorantes rojo-naranjas tienen establecidos unos niveles de IDR más bajos, como por ejemplo la Eritrosina (E-127) y el Amaranto (E-123), lo que significa que puede existir cierta toxicidad y efectos secundarios si se ingieren en cantidades elevadas. Algunos de ellos como la Tartracina (E-102), Amarillo de Quinoleína (E-104), Amarillo Ocaso FCF (E-110), Azorrubina o Carmoisina (E-122), Rojo Cochinilla A (E-124) o el Rojo Allura AC (E-129) pueden ocasionar Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención (ADHD) en niños.

Tabla 1 Ejemplos de colorantes sintéticos.

Tartracina	E-102	Refrescos, dulces, helados, especias
Amarillo anaranjado S	E-110	Mermeladas, pastelería, sopas instantáneas
Azorrubina o Carmoisina	E-122	Caramelos, helados, platos preparados
Amaranto	E-123	Caramelos, pastelería, licores
Rojo allura AC	E-129	Golosinas, helados, postres
Marrón HT	E-155	Pescado ahumado, sopa, galletas, salsas
Eritrosina	E-127	Mermeladas, postres, paté de atún/salmón

A pesar de que durante estos últimos años se han ido sustituyendo progresivamente los colorantes sintéticos por sus sustitutos naturales, muchos de estos no han sido estudiados en profundidad y por lo tanto se desconocen sus funciones y beneficios reales. Es por esto por lo que la industria de colorantes alimentarios se considera un campo prometedor en el avance y el desarrollo de alimentos con mejores características funcionales.

1.1.2. Colorantes naturales

La calidad y la diversidad de colorantes provenientes de fuentes naturales ha mejorado de manera visible y su elaboración se ha centrado en la mejora de las propiedades sensoriales y de color durante la vida útil del producto. En muchos casos estas mejoras, además de aumentar la inocuidad del colorante, también otorgan al producto funciones específicas como es el caso de los carotenoides y las antocianinas, que son compuestos conocidos por su actividad antioxidante y por su efecto protector en la prevención de ciertas enfermedades crónico-degenerativas y distintos tipos de cáncer (Carmona, 2013).

Por lo general, los colorantes naturales son menos estables, más caros, se requiere mayor cantidad para alcanzar el color equivalente a uno sintético y en la mayoría de ocasiones tiene un rango bastante limitado de tonalidades (Rodríguez-Amaya, 2016). No obstante, el empleo de colorantes naturales en la industria alimentaria se ha vuelto una tendencia, debido a la preocupación de los consumidores sobre la posible toxicidad de muchos colorantes sintéticos, reforzada por la posible existencia de beneficios para la salud que presentan los pigmentos naturales, demostrando ser tan efectivos como los sintetizados químicamente (Brauch et al., 2016; Almeida et al., 2018; Chen et al., 2019).

La Tabla 2 muestra algunos ejemplos de colorantes alimentarios naturales y los productos en los que suelen ser añadidos.

Tabla 2 Ejemplo de colorantes naturales.

Curcumina	E-100	Queso, productos de pastelería, licores
Cochinilla o ácido carmínico	E-120	Batidos, yogures, golosinas, hamburguesas
Carbón vegetal	E-153	Caramelos, chocolate, galletas
Clorofilas y clorofilinas	E-140	Helados, yogures, conservas vegetales
Antocianinas	E-163	Yogures, dulces, refrescos
Betanina	E-162	Refrescos, caramelos, mermeladas, lácteos
Carotenoides	E-160	Salsas, productos de pescado, postres

Las betalaínas son pigmentos nitrogenados solubles en agua, sintetizados por el aminoácido tirosina en dos grupos estructurales: por un lado, las betacianinas (betanina e isobetanina), que son rojo-violeta y constituyen aproximadamente el 75-95% del total, y por otro lado las betaxantinas, que son amarillo-naranja (Neelwarne, 2012).

La betacianina más importante en la remolacha roja es la betanina y está formada por una betanidina 5-O-β-glucósido (Figura 1) que contiene un grupo fenólico y una amina cíclica, siendo ambos buenos donadores de electrones y, por lo tanto, actuando como antioxidantes (Kanner et al., 2001). Además, el único aditivo que contiene betanina aceptado por la Unión Europea (UE) y por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), es la remolacha roja deshidratada en polvo.

El contenido en betanina de la remolacha roja varía en función de la variedad seleccionada, las condiciones de crecimiento y maduración, el tiempo de cosecha, así como el tiempo y las condiciones de almacenamiento. Según Delgado-Vargas et al. (2000), el contenido medio de pigmento en la remolacha fresca es de aproximadamente 130 mg/100 g de peso fresco, pero en nuevas variedades de remolacha roja se ha llegado a conseguir entre 450 y 500 mg/100 g de peso fresco.

La utilización de betalaínas como colorante alimentario se ha visto reducida considerablemente debido a su escasa estabilidad. Por un lado, esta disminuye con la acción de enzimas degradativas (peroxidasas, polifenoloxidasas, glucosidasas), un nivel bajo de glicosilación y acilación, alta a_w , cationes metálicos, $\text{pH} < 3$ o $\text{pH} > 7$, altas temperaturas, exposición a la luz, al O_2 y al H_2O_2 (Herbach et al., 2004). Por otro lado, Mikova & Kyzlink (1985) observaron una reducción en la degradación del pigmento producida por la enzima glucosa oxidasa, que elimina el oxígeno disuelto en el medio. Asimismo, las betalaínas podrían aumentar su estabilidad por la acción de antioxidantes como el ácido ascórbico, el ácido isoascórbico o el ácido cítrico (Khan, 2016).

Además de las propiedades cromáticas que ofrecen, las betalaínas son conocidas por proteger al organismo contra enfermedades cardiovasculares, cáncer o aquellas relacionadas con la ansiedad. Es posible reducir el número de este tipo de enfermedades cuando la betanina forma

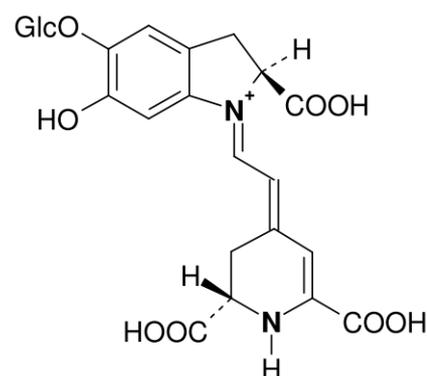


Figura 1 Estructura química de la betanidina 5-O-β-D-glucósido (betanina).

Fuente: (Gliszczyńska-Świgło et al., 2006).

parte de una dieta diaria, debido a su poder inhibidor de la peroxidación lipídica (Kanner et al., 2001) y a la participación activa de las betalaínas en la búsqueda de radicales libres (Esatbeyoglu et al., 2014). Se ha demostrado que las betalaínas son capaces de activar un factor de transcripción (Nrf2) el cual induce mecanismos de defensa celulares endógenos.

Mediante la administración a ratones por vía oral de extractos de *B. vulgaris*, se obtuvo una reducción del 45% en el número de tumores esofágicos, limitando la proliferación celular, la angiogénesis y la inflamación (Lechner et al., 2010). Zhang et al. (2012) realizaron un estudio similar en dos modelos de tumor de pulmón (Vinyl carbamate (A) y Benzo(a)pyrene (B)) inducidos por vía oral en ratones, demostrándose una reducción de un 20-39% en el primer modelo (A) y de un 46-65% en el segundo (B).

Algunos de los alimentos en los que se utiliza la betanina (E-162) como colorante son: snacks, refrescos, caramelos, conservas, mermeladas, gelatinas, lácteos, yogures, queso fresco, algodón de azúcar y productos de pastelería. Además, es empleado en la coloración de carnes y embutidos.

A pesar de que no han sido ampliamente estudiadas hasta ahora, existen alternativas naturales de betalaínas como el cardo suizo (*B. vulgaris* L. ssp. *cicla*), la pitaya roja (*Hylocereus* spp.), el amaranto (*Amaranthus* sp.), el higo chumbo (*Opuntia ficus-indica*) y algunas frutas tropicales, pero los extractos de remolacha roja han sido hasta ahora el único colorante a base de betalaínas explotado comercialmente.

Industrialmente, este colorante se obtiene de las raíces cortadas mediante presión o centrifugación, o mediante extracción acuosa de remolachas trituradas. Este proceso normalmente proporciona entre un 45-70% de betanina, pero para conseguir una extracción completa, se suele añadir una solución de etanol o metanol al 20-50% v/v (Piatelli & Minale, 1981). La extracción de betalaínas con agua, a pesar de que es simple, eficiente y rentable económicamente, presenta una difícil separación de las betalaínas y los componentes proteicos solubles en agua.

En Europa se comercializa principalmente como zumo concentrado a vacío a partir del jugo de remolacha hasta alcanzar un 60-65% de sólidos totales, o en forma de polvo (producido por liofilización o secado en spray), conteniendo un 0,3-1% de pigmento.

En cualquier caso, se continúa estudiando el comportamiento a nivel industrial de la adición de betalaínas a los nuevos productos, lo que supone una línea prometedora en el ámbito de investigación de la tecnología de alimentos.

1.2. PULSOS ELÉCTRICOS (PEF). APLICACIÓN EN LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN

El tratamiento por pulsos eléctricos de alto voltaje consiste en la aplicación de una diferencia de potencial elevada (kV) entre dos electrodos donde se coloca el producto. La diferencia de potencial genera un campo eléctrico cuya intensidad depende del voltaje aplicado y la separación entre los electrodos. El tratamiento se aplica intermitentemente en forma de pulsos de corta duración (ms- μ s). En la Figura 2 aparece un esquema de la celda de tratamiento de un equipo de pulsos eléctricos con el producto a tratar en su interior.

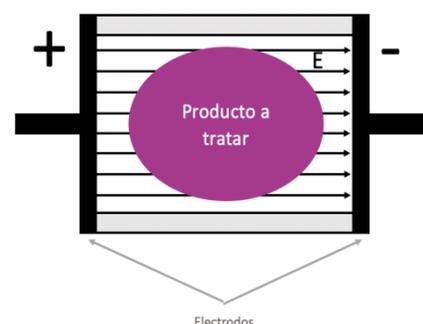


Figura 2 Esquema de la celda de tratamiento del equipo de PEF.

1.2.1. Fenómeno de electroporación

La electroporación o electropermeabilización es un fenómeno que genera poros en las membranas celulares tras la aplicación de campos eléctricos. La formación de estos poros en la membrana de las células vegetales facilita la extracción de distintos componentes de interés en la industria alimentaria (aceites, azúcar, colorantes, etc.), y su formación depende de la energía eléctrica aplicada, además de la diferencia de potencial en la membrana celular. Si esta diferencia de potencial sobrepasa un valor determinado (normalmente 0,5 - 1,5 V), da lugar a una pérdida de membrana semipermeable que puede ser tanto reversible como irreversible.

La diferencia de potencial (o potencial transmembrana) a lo largo de la membrana de la célula dependerá del tamaño y la forma de esta, así como la concentración en la que se encuentren en el tejido vegetal (Barba et al., 2015). En general, la fuerza eléctrica de campo necesaria para la electroporación de tejidos formados por células grandes ($\approx 30\text{-}60\ \mu\text{m}$) es del orden de 500 V/cm (Lebovka et al., 2000) y para células pequeñas ($\approx 1\text{-}10\ \mu\text{m}$) se necesita una fuerza superior a 3 kV/cm (Raso & Heinz, 2006).

La base estructural inicial de la electroporación viene determinada por la presencia de pequeños poros hidrofóbicos fluctuantes en la matriz lipídica (Chernomordik, 1992). Se piensa que estos poros, al encontrarse con estrés eléctrico externo, se transforman en hidrofílicos, debido a una reorientación, en aquellos casos en los que el radio del poro sobrepasa los valores donde la energía en ambas orientaciones coincide. Siempre que este radio sea pequeño, la formación de poros hidrofóbicos será favorable, pero en el rango de 0,5 nm la energía de los poros hidrofílicos e hidrofóbicos se equilibra y puede dar lugar a la inversión del poro (Glaser et al., 1988).

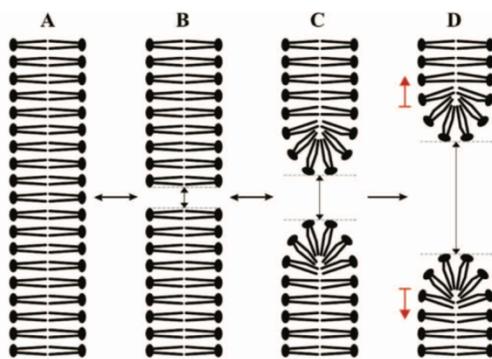


Figura 3 Esquema de la membrana celular sin poros (A), con un poro hidrofóbico (B), con un poro hidrofílico reversible (C) y con un poro hidrofílico irreversible (D).

Fuente: (Kotnik et al., 2012).

Si se utiliza una intensidad de campo lo suficientemente baja, la electroporación será reversible (caso C de la Figura 3) puesto que el sellado de los poros y consiguiente reparación de las membranas tras la aplicación del pulso es rápido. En cambio, a intensidades más elevadas, algunas de las células tratadas no son capaces de sellarse de nuevo como en el caso D de la Figura 3. Esto evidencia la incapacidad de reparación de la membrana.

En la industria biotecnológica y médica se precisa una electroporación reversible, ya que se suele emplear para introducir moléculas dentro de las células, que deben quedar intactas tras el

tratamiento. Por el contrario, en la industria alimentaria, normalmente se requiere la electroporación irreversible.

La eficacia del tratamiento con PEF en la permeabilización irreversible de las membranas celulares depende de los diferentes parámetros del proceso (intensidad de campo eléctrico, tiempo de tratamiento, energía específica, forma y amplitud del pulso, frecuencia, temperatura de tratamiento,...) y de las características del alimento, incluyendo sus propiedades fisicoquímicas (pH, conductividad eléctrica) y las propiedades de la célula (tamaño, forma, membrana y estructura del núcleo) según Miklavčič (2017). Cuanto mayor es la conductividad del medio de tratamiento, menor es la resistencia eléctrica en la celda y menor es la energía

requerida. En cualquier caso, los parámetros más importantes para determinar la eficacia del tratamiento con PEF son la intensidad de campo y el tiempo total de tratamiento.

Existe muy poca información disponible sobre la cinética de permeabilización de la membrana y los cambios estructurales reversibles e irreversibles que se dan en las células de los alimentos durante y después de la aplicación de PEF (Martín-Belloso et al., 2009).

Ben Ammar (2011) estudió el tiempo de tratamiento y la intensidad de campo eléctrico en diferentes tejidos vegetales y obtuvo diferencias significativas en la eficacia de la electroporación en función de la matriz. Estas diferencias pueden basarse en el tamaño de las células, siendo las más grandes dañadas antes que las pequeñas.

1.2.2. Aplicaciones de la electroporación

Inactivación microbiana/conservación de alimentos

En la actualidad es de gran importancia la búsqueda de nuevas tecnologías de inactivación microbiana y conservación de alimentos, pues cada vez el consumidor es más exigente y demanda productos más nutritivos, de mayor calidad organoléptica y con sabores y aromas lo más parecidos posibles al producto sin procesar. También se pretende que estas técnicas sean respetuosas con el medio ambiente. Los pulsos eléctricos de alto voltaje permiten reducir la temperatura necesaria para la destrucción o inactivación microbiana, manteniendo la calidad organoléptica del producto, sin disminuir los niveles de seguridad microbiológica.

Vorobiev & Lebovka (2010) establecieron que, para la destrucción de microorganismos se necesitan entre 15-80 kV/cm con pulsos de entre 1 y 5 μ s. En cambio, para la electroporación de células vegetales y extracción en frío de matrices vegetales es mejor utilizar entre 0,1 y 5 kV/cm, con pulsos eléctricos entre 10 y 1000 μ s. Esta diferencia de intensidades se debe al tamaño de las células, puesto que las más grandes requieren menor intensidad de campo que las más pequeñas.

Por otro lado, cabe destacar la estabilidad de los compuestos de interés en los alimentos tratados con PEF. Por ejemplo, en un estudio realizado por Morales-De la Peña et al. (2010), fue posible retener un 87-90% de vitamina C en una bebida de frutas con leche de soja, después de la aplicación del tratamiento con PEF (35 kV/cm, anchura de pulso de 4 μ s, a 200 Hz, en tiempos de tratamiento entre 800 – 1400 μ s). Estas condiciones de PEF se compararon con un tratamiento térmico (90°C durante 60 s) y el contenido en vitamina C de las muestras tratadas con PEF resultó ser significativamente mayor que las tratadas térmicamente.

Pretratamiento de matrices previo a la extracción de compuestos

La aplicación de PEF a los procesos de extracción se ha centrado principalmente en la intensificación de la operación para la obtención de componentes bioactivos con efectos beneficiosos para la salud de matrices vegetales. Tradicionalmente, estos compuestos se han obtenido mediante equipos de prensado, en los que el jugo extraído es bastante turbio e impuro, de tal forma que resulta necesaria su posterior clarificación.

Algunos de estos componentes son: los flavonoides, que se encuentran en las frutas; el vino; el té verde o la soja (Agcam et al., 2014; Setford et al., 2017); las isoflavonas, que se encuentran en la soja y otras legumbres (Guderjan et al., 2005) y los carotenoides, que se encuentran en el tomate y en la zanahoria (Pataró et al., 2018).

La cantidad de compuestos liberados al medio líquido depende del grado de desintegración que alcance la célula, lo que influye en la eficacia del proceso de extracción. Por ello, para una

extracción más completa, se suele complementar con fragmentación mecánica, calor, prensado o la utilización de mezclas de varios disolventes en el medio extractor (López et al., 2009).

Entre otros campos, se ha estudiado la utilización de los pulsos eléctricos (PEF) para mejorar la extracción fenólica en la elaboración del vino tinto (Raso et al., 2010); para aumentar el rendimiento en la producción de zumos de frutas (Jemai, 2006) o para acelerar la transferencia de agua en las operaciones de secado (Toepfl & Knorr, 2006).

Algunas de las ventajas que ofrece el tratamiento con pulsos eléctricos están relacionadas con una buena efectividad en el prensado, una alta pureza de jugo y una reducción del consumo de energía. Luengo et al. (2013) estudiaron la influencia del tratamiento PEF en la extracción de polifenoles y flavonoides tras el prensado de la piel de la naranja. Tras 30 minutos de prensado con una presión de 5 bares, el rendimiento de la extracción aumentó un 20, 129, 153 y 159% en aquellas muestras pretratadas a 1, 3, 5 y 7 kV/cm (20 pulsos de 3 μ s), respectivamente.

Un estudio realizado en remolacha roja (Donsì et al., 2010), en el que se aplicaron 270 pulsos de 10 μ s de duración a 1 kV/cm (energía específica de 7 kJ/kg), mostró una extracción del 90% del total de betanina tras 60 minutos de extracción; con la muestra sin tratar, se extrajo menos del 5%. En el mismo trabajo, se estudió la aplicación de un campo eléctrico de mayor intensidad (7 kV/cm) y una duración más corta de los pulsos (2 μ s), resultando de la misma forma en una extracción del 90% del total de la betanina después de 300 minutos. En este segundo caso, la energía específica utilizada fue menor (2,5 kJ/kg), puesto que, si se utiliza una fuerza de campo elevada, se puede conseguir un alto grado de permeabilización de la membrana, incluso si el número de pulsos aplicados es menor.

El tratamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje conlleva cambios significativos en las propiedades eléctricas del tejido vegetal, así como la liberación de sustancias iónicas y pigmentos rojos o betanina, en el caso de la remolacha.

Por otro lado, este tratamiento consigue que la temperatura del producto tratado apenas aumente y por lo tanto, las propiedades sensoriales y nutricionales no se ven prácticamente alteradas.

En la Figura 4 se muestra lo que ocurre tras una extracción acuosa: el tejido de remolacha que no ha sido pretratado con PEF (a) contiene algunas células que han permanecido intactas tras la extracción, mientras que el tejido que ha sido pretratado con PEF (b) muestra unas células con colores pálidos, lo que significa que la extracción de la betanina ha sido prácticamente completa.

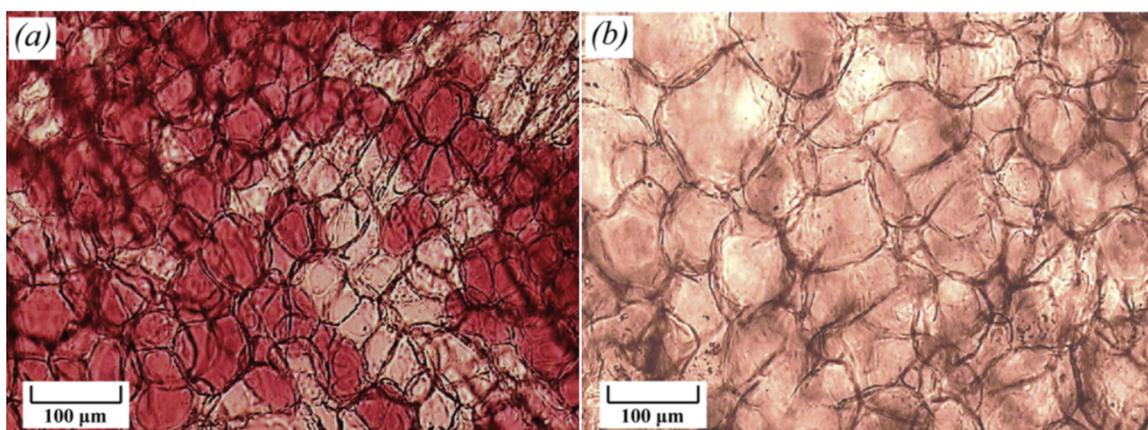


Figura 4 Vista microscópica del tejido de la remolacha después de una extracción en agua: sin pretratamiento (a) y con pretratamiento de PEF (b).

Fuente: (Loginova et al., 2011).

1.3. Textura de la remolacha roja

La calidad de la mayoría de productos hortofrutícolas depende de varios factores como la variedad, las condiciones del clima, la etapa de madurez, así como de las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad relativa y ventilación). Un almacenamiento inadecuado o demasiado prolongado puede originar el deterioro estructural del producto, generando un reblandecimiento, que puede no ser deseado por el consumidor.

El equipo más utilizado en la industria alimentaria para determinar los parámetros requeridos en la textura de un alimento es el texturómetro.

La fuerza máxima de corte hace referencia a la fuerza máxima requerida para comprimir un alimento y su valor es proporcionado por la gráfica del análisis de perfil de textura, siendo éste el punto más alto alcanzado en la curva fuerza-deformación. El área de compresión representa el trabajo necesario para comprimir la muestra.

El corte y/o prensado de alimentos supone una importante inversión de tiempo y de capital, y por ello se han investigado diferentes técnicas para facilitar este proceso, como la aplicación de pretratamientos térmicos, electrotérmicos, químicos y enzimáticos (Beveridge & Harrison, 1986; Wang & Sastry, 2002; Vorobiev & Lebovka, 2006; Almohammed et al., 2015). Sin embargo, estos pretratamientos suelen suponer un incremento incontrolado de temperatura y, por consiguiente, una disminución considerable de la calidad del producto final. Así pues, una alternativa interesante es el uso de PEF.

En función de las condiciones de PEF aplicadas, el comportamiento de un alimento frente al tratamiento es diferente, generando variaciones en las fuerzas de corte necesarias. En un estudio realizado por Wiktor et al. (2018) sobre las propiedades mecánicas de la zanahoria tratada con PEF y ultrasonidos de potencia (USP), se alcanzó una reducción del 40% en la fuerza de corte (con un esfuerzo del 30%) respecto a la muestra sin tratamiento con pulsos eléctricos y una reducción del 27% en las tratadas con USP. El material sometido a un tratamiento PEF más fuerte hace que sea más susceptible a la compresión, debido a la ruptura de su estructura interna. Este comportamiento está relacionado, a su vez, con un aumento en la extracción del líquido intracelular tras el tratamiento de PEF, tal y como establecen Bobinaité et al. (2015) en su estudio sobre la extracción de compuestos bioactivos del arándano y sucedáneos.

Además de la relevancia industrial que puede tener la reducción de la fuerza de corte con el tratamiento de pulsos eléctricos, Leong et al. (2014) también hacen referencia a la importancia que puede tener la precisión en el corte del tejido, concretamente en la zanahoria.

En el caso del presente trabajo, cuyo objetivo principal es obtener la máxima extracción de colorante, el reblandecimiento de los tejidos que conlleva un tratamiento de PEF es positivo, puesto que, a nivel industrial, sería necesario un triturado de la remolacha. Si se consigue un mayor reblandecimiento del tejido, su trituración es más sencilla y el consumo energético, menor.

1.4. ULTRASONIDOS DE POTENCIA. APLICACIÓN EN PROCESOS DE EXTRACCIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Los ultrasonidos de potencia presentan un gran potencial en los procesos de extracción en la industria alimentaria. Las principales variables a considerar en los tratamientos mediante USP son la frecuencia, la intensidad acústica, el tiempo y la temperatura de extracción, la interacción muestra-solvente (tamaño/forma de partícula y disolvente utilizado) y las características del reactor. Además de ser una herramienta útil para la extracción de componentes naturales de los alimentos, lo que representa el objetivo del presente trabajo, los

USP también se han utilizado para mejorar las operaciones de cortado, para la inactivación de microorganismos y enzimas o para procesos de congelación, entre otros (Yildiz et al. 2016; ; Xu et al., 2017; Inguglia et al, 2018).

Uno de los ejemplos de aplicación de ultrasonidos que ha tenido mayor trascendencia en la industria alimentaria es la deshidratación de alimentos. Este sistema de conservación de alimentos se puede llevar a cabo mediante aire caliente o liofilización. El primer método conlleva el deterioro del alimento y el segundo, a pesar de que mantiene la calidad del alimento, tiene un coste muy elevado. En cambio, aplicando energía ultrasónica es posible aumentar la tasa de evaporación mediante variaciones de presión y disminuir la capa límite de difusión, lo que da lugar a una intensificación del proceso de secado, con la consiguiente reducción de tiempos, tal y como argumentan García-Pérez et al. (2007) en su estudio sobre la intensificación de la transferencia de masas mediante USP en el secado de alimentos.

Por otra parte, los USP también pueden mejorar las operaciones de extracción sólido-líquido, reduciendo el consumo de disolvente, simplificando la manipulación, proporcionando alta pureza al producto final, reduciendo el agua residuo tras el tratamiento y consumiendo solamente una fracción de la energía que normalmente se utiliza en un método de extracción convencional, como la extracción Soxhlet, la maceración o la destilación Clevenger (Chemat et al., 2017).

Algunos estudios han demostrado que la intensificación de las operaciones de extracción con USP aumenta el rendimiento respecto a la extracción convencional, puesto que se obtiene una mayor cantidad de compuestos bioactivos, en menor tiempo. Según Esclapez et al. (2011), dependiendo de la potencia aplicada, se pueden conseguir diferentes efectos: con intensidades bajas, la resistencia interna y externa a la transferencia de materia se ve afectada, pero la estructura del producto no sufre prácticamente ningún cambio; las intensidades intermedias puede que afecten la estructura del producto, aumentando de esta forma los efectos en la resistencia interna de transferencia de masa. Sin embargo, si se sigue aumentando la potencia, puede dar lugar a la desintegración celular.

En un estudio llevado a cabo por Sivakumar et al. (2009) se estudió el rendimiento de la extracción de betanina procedente de remolacha roja a 45°C, utilizando como disolvente una mezcla de 1:1 etanol-agua durante 3 h de extracción. Se comparó la eficacia de la aplicación de USP a 80 W de potencia respecto al empleo de agitación mecánica, obteniéndose una mejora del 8% con USP.

De la misma manera Prakash et al. (2016) determinaron las condiciones óptimas de extracción de betanina de la remolacha roja. En este estudio se utilizaron entre 60 y 120 W de potencia y temperaturas entre 40 y 60°C. El máximo rendimiento con estas condiciones se alcanzó a 53°C, 89 W de potencia de US, durante 35 minutos de extracción.

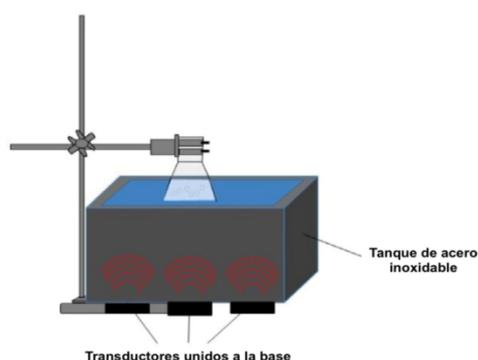


Figura 5 Ilustración de un baño de ultrasonidos.
Fuente:(Chemat et al., 2017).

El baño de ultrasonidos es el sistema de USP más empleado para los tratamientos y consiste en un tanque de acero con uno o varios transductores en su base (Figura 5). Estos baños normalmente trabajan a una frecuencia de aproximadamente 30-40 kHz.

En el campo de los ultrasonidos, la cavitación acústica se refiere normalmente a la formación, el crecimiento y la implosión de burbujas que

ocurren durante la propagación de una onda US en un medio líquido. Las moléculas que constituyen el medio líquido se atraen unas a otras debido a las fuerzas de atracción. La propagación de una onda de US a través de un medio elástico induce una cadena de fases de compresión y rarefacción, las cuales dan lugar a un desplazamiento longitudinal de esas moléculas. Las moléculas de la fase líquida cambian de posición durante la fase de compresión y pueden colisionar con las moléculas que se encuentran a su alrededor. Durante las fases de rarefacción la presión es negativa haciendo que las moléculas se separen. Si la intensidad de onda es lo suficientemente alta, durante la fase de rarefacción puede que las fuerzas de atracción entre las moléculas sean excedidas, generando cavidades en el líquido, siendo estas las llamadas burbujas de cavitación (Chemat et al., 2017).

Mason et al. (2014) consideran que los ultrasonidos aumentan la eficacia de la extracción sólido-líquido debido a cuatro mecanismos interrelacionados: en primer lugar, se forman microinyecciones que aumentan la permeabilidad del tejido vegetal por la implosión de las burbujas de cavitación y, por lo tanto, se reduce el tamaño de partícula, aumentando de esta manera la superficie sólida en contacto directo con el disolvente extractor. En segundo lugar, la temperatura aumenta ligeramente por la energía que se libera en la implosión, lo que provoca un aumento de la solubilidad del soluto. En tercer lugar, se produce una mejora de la penetración del disolvente en la matriz del soluto, pues la presión aumenta considerablemente en puntos localizados, fomentando la entrada del disolvente en el interior de la célula. Por último, también mejora la transferencia de materia debido a que se generan unas microcorrientes que favorecen la continua renovación de la capa límite que está en contacto con la matriz.

1.4.1. Factores que influyen en la velocidad de extracción

Según Coulson & Richardson (2003) existen cuatro factores importantes a considerar:

Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas afecta a la velocidad de extracción de diversas maneras. Cuanto más pequeño, más rápida es la transferencia de materia, ya que la distancia que tiene que recorrer el soluto por el interior del sólido para llegar al exterior de la partícula es menor. Sin embargo, la superficie puede no ser utilizada de una forma totalmente eficaz si el material es demasiado pequeño, ya que los poros se obstruyen más fácilmente, complicándose así el proceso de extracción.

Tipo de disolvente

El disolvente elegido tiene que solubilizar al componente que se desea extraer, pero el resto de componentes deben ser poco solubles en él. La elección del tipo de disolvente varía en función de la solubilidad, la viscosidad y la tensión superficial. Es recomendable que la viscosidad sea baja para que pueda circular con facilidad tanto por la parte interna, a través de los poros de la partícula, como por el lecho del fluido.

Al inicio de la extracción el disolvente es relativamente puro, pero a medida que la extracción va teniendo lugar, la concentración de soluto aumenta y la velocidad de extracción disminuye progresivamente, debido, tanto a la disminución del gradiente de concentración, como al aumento de la viscosidad de la disolución.

Temperatura

Un aumento de la temperatura favorece la solubilidad y consecuentemente, aumenta los coeficientes de transferencia de materia. Los límites de temperatura durante la extracción se

fijarán atendiendo a criterios de calidad del producto, criterios económicos y de seguridad respecto al disolvente.

Agitación soluto – disolvente

La agitación del fluido favorece la transferencia de materia desde la superficie de las partículas hacia la masa de la disolución, debido a un aumento de los coeficientes de transferencia de materia en la interfase. Además, se evita la sedimentación de pequeñas partículas y esto hace que la superficie de contacto se aproveche de forma más eficaz.

2. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo general establecer el efecto de la combinación de pulsos eléctricos y ultrasonidos de potencia sobre la extracción de betanina de la remolacha roja.

Para la consecución del objetivo general del trabajo se plantearon los siguientes objetivos particulares: estudiar las cinéticas de extracción de betanina con y sin la aplicación del pretratamiento PEF y estudiar el efecto de las variables del proceso en la extracción sólido-líquido del pigmento, tanto en agitación mecánica como mediante USP.

Como objetivos secundarios se pretende determinar el efecto del disolvente utilizado (agua o etanol al 10, 30 y 70%) y la temperatura de extracción. Adicionalmente, se planteó el estudio de los cambios texturales producidos en la remolacha roja, en función de las condiciones de pretratamiento PEF aplicadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

La remolacha roja (*Beta vulgaris L.*) fue adquirida en un comercio local en Valencia (España) y almacenada a 6°C hasta su utilización.

3.2. PRETRATAMIENTO CON PULSOS ELÉCTRICOS (PEF)

En aquellos casos en los que se quería estudiar el efecto del pretratamiento, tras la eliminación del tallo y las hojas de la remolacha se introdujo la misma en la celda, dentro de la cámara de tratamiento y se añadió agua como medio de tratamiento. La celda de tratamiento consistía en una estructura rectangular de plástico compuesta por dos electrodos de 8x9 cm colocados de forma paralela, con una distancia entre ambos de 8 cm. La conductividad del agua, medida mediante un conductímetro (COND7+ XS, LabProcess, Barcelona, España), fue de 0,13 mS/cm (23°C). El tratamiento se realizó con un equipo de pulsos eléctricos (EPULSUS-PM1-10; Energy Pulse Systems, Lda, Lisboa, Portugal) y consistió en una secuencia de 20 pulsos eléctricos, una fuerza de campo de 1,25 kV/cm, una duración de pulso de 25 μ s y 10 Hz de frecuencia, siendo la energía específica empleada de 0,94 kJ/kg. Tras ser tratada, la remolacha se retiró lo más rápidamente posible de la celda, con el fin de evitar pérdidas de betanina en el interior. Posteriormente, se procedió a la preparación de la muestra tal y como se indica en el apartado 3.3. La Figura 6 muestra el equipo de pulsos eléctricos, junto con la cámara de tratamiento.



Figura 6 Equipo y cámara empleados para el tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje.

3.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE BETANINA

Para aquellas muestras no tratadas con PEF, se eliminó tanto el tallo como las hojas de la remolacha. Para las experiencias de extracción, tanto de muestras tratadas como no tratadas con PEF, se realizaron láminas con un cuchillo en dirección perpendicular al eje de la remolacha y con ayuda de un sacabocados se extrajeron cilindros de 7,5 mm de diámetro y 8 mm de altura. Se pesaron cilindros hasta conseguir aproximadamente 7,5 g de muestra, que se introdujeron en un Erlenmeyer de 200 ml. A continuación, se añadieron 150 ml de disolvente (agua destilada o etanol al 10, 30 o 70%) y se introdujeron en el baño a una temperatura de 25°C (25, 35 y 45°C en el caso de que el disolvente fuese agua). En el caso del etanol, se utilizó una temperatura constante de 25°C, puesto que es un compuesto muy volátil. Las diferentes concentraciones de etanol se prepararon mezclando etanol al 96% y agua destilada.

La extracción se llevó a cabo durante 180 minutos, tomando muestras de 1,5 ml en tubos Eppendorf de 2 ml a los 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 y 180 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se detuvo el experimento.

Cada experimento se llevó a cabo como mínimo por triplicado.

La utilización de métodos intensivos de agitación mecánica supone la disrupción de las células más externas del material vegetal, lo que da lugar a la liberación de componentes de la célula como celulosa o pectina, haciendo que se produzca un ligero enturbiamiento en la fase líquida. Para evitar que esto supusiese un problema a la hora de tomar la medida de la absorbancia, por la existencia de partículas en suspensión, se centrifugaron todas las muestras a 6.000 rpm y 25°C durante 5 minutos en una centrífuga (5415 R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

3.3.1. Cuantificación de betanina

La concentración de betanina en el medio de extracción se determinó según Nilsson (1970). Una muestra de 1,5 ml del líquido extraído se centrifugó a 6.000 rpm durante 5 minutos a 25°C. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de la absorbancia a longitudes de onda de 537 y 600 nm, en cubetas de 2,5 cm. Se calculó la absorbancia de la betanina con los valores obtenidos en el espectrofotómetro mediante la Ecuación 1.

$$A_{\text{betanina}} = 1,095 \cdot (A_{537} - A_{600}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Posteriormente, se utilizó la ley de Lambert-Beer (Ecuación 2) para calcular la concentración de betanina de la remolacha extraída. El coeficiente de extinción molar de la betanina en agua es $\epsilon^{-1\text{cm}}_{1\%} = 1120$ (Henry, 1992).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (\text{Ecuación 2})$$

Siendo A la absorbancia; ϵ el coeficiente de extinción molar; l el paso de luz (cm) y C la concentración molar del soluto (M).

Para calcular el rendimiento (Rto) de la extracción, se utilizó la Ecuación 3.

$$\text{Rto} (\%) = \frac{C_t}{C_{M_b}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Siendo C_t la concentración de betanina extraída tras un tiempo t y C_{M_b} , la concentración máxima de betanina extraíble, calculada según el apartado 3.3.2.

3.3.2. Determinación de la cantidad máxima de betanina extraíble

Para determinar la cantidad máxima de betanina extraíble (CMb) en cada experiencia, se introdujeron 7,5 g de remolacha en un Erlenmeyer de 200 ml y se añadieron 300 ml de agua destilada. Con ayuda de un Ultraturrax (Yellow line DI 25 basic, Staufen, Alemania) se trituró la muestra de manera homogénea y se introdujo en un baño con agitación (RZR 1, Heidolph, Schwabach, Alemania) a 45°C durante 10 minutos. La trituración de la muestra sólida se llevó a cabo para que todo el material soluble estuviese expuesto al disolvente y el coeficiente de transferencia de materia aumentase. Transcurridos los 10 minutos, se filtró con papel de filtro (Ø150 mm Folded Filter PRAT DUMAS, Couze-St-Front, Francia) y se introdujo 1,5 ml en un Eppendorf de 2 ml. Se centrifugó en una centrífuga (5415 R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 6.000 rpm, 25°C, durante 5 minutos y se procedió a la lectura de la absorbancia a 537 y 600 nm mediante el espectrofotómetro (Spectronic Helios UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) para obtener la concentración de betanina extraída según lo descrito en el apartado 3.3.1.

3.3.3. Ultrasonidos (US)

Para la extracción asistida por US de este estudio, se utilizó un baño de 36 x 20 x 20 cm con un generador de ultrasonidos (ATU Ultrasonidos, G.A.T-1500, Manises, España) como el que se muestra en la Figura 7. Este equipo tiene una onda de frecuencia programada de fábrica (40 kHz) y dispone de un sistema con barrido de frecuencias. Este sistema facilita el paso de las ondas ultrasónicas de manera más homogénea a través de todo el fluido de forma perpendicular a la base, lo que hace que aumente la eficacia durante la extracción. Los



Figura 7 Equipo generador de ultrasonidos.

Erlenmeyer se colocaron a una altura de 8 cm desde la base del baño tal y como se muestra en la Figura 8.

En este estudio se utilizaron tres niveles de potencia de ultrasonidos, 50%, 90% y 100% de la capacidad eléctrica máxima del equipo. Para medir la potencia real del equipo de US se utilizó un medidor de energía (WR210 DIGITAL POWER METER, Yokogawa, Japón) siendo ésta de 250 W (50%), 415 W (90%) y 623 W (100%).

Para mantener la temperatura controlada durante las extracciones, se utilizó un baño de recirculación con control digital de temperatura (240V, VWR INTERNATIONAL, Radnor, EE. UU.). El líquido anticongelante utilizado en este baño fue etilenglicol al 45%. La Figura 9 muestra un esquema de las partes que componen el montaje para realizar la extracción con USP y el control de temperatura.

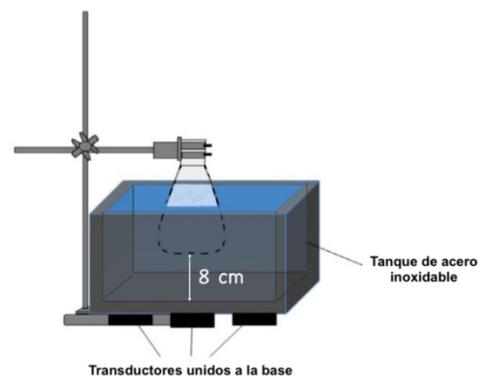


Figura 8 Montaje baño USP.

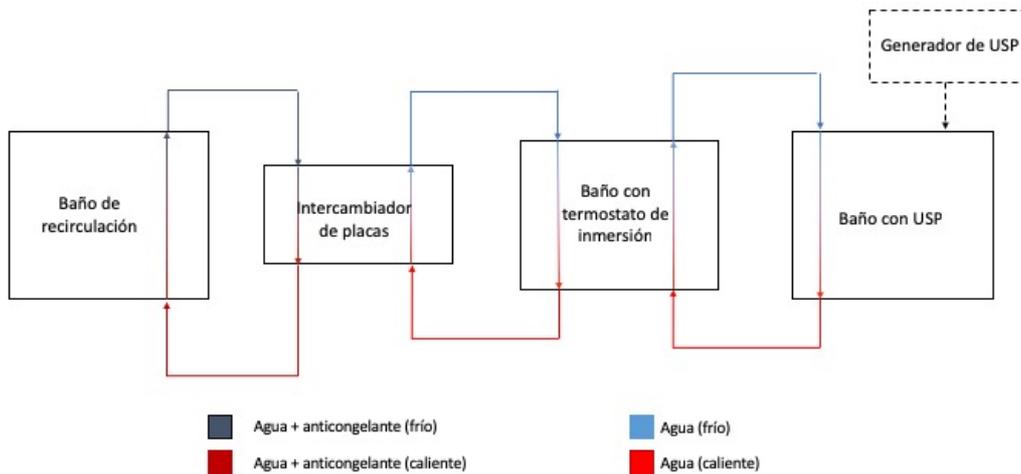


Figura 9 Esquema del montaje experimental para realizar la extracción con USP.

3.4. TEXTURA DE LA REMOLACHA ROJA

En esta parte del trabajo se estudió el efecto de diferentes tratamientos mediante PEF sobre las propiedades texturales de la remolacha. Para ello, los cambios en las propiedades texturales se analizaron mediante un ensayo de corte. Las medidas de la fuerza de corte se realizaron en un texturómetro (Texture Analyser TA-XT2i, Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido), a temperatura ambiente ($\approx 25^{\circ}\text{C}$), mediante una sonda de corte. Las condiciones de pretratamiento PEF utilizadas fueron: 8, 10 y 32 pulsos; $25\ \mu\text{s}$ de anchura de pulso, $1,25\ \text{KV/cm}$ y $10\ \text{Hz}$ de frecuencia, que corresponde a una energía específica de $0,38\ \text{kJ/kg}$ (8 pulsos), $0,94\ \text{kJ/kg}$ (20 pulsos) y $1,5\ \text{kJ/kg}$ (32 pulsos). Se utilizó una muestra control (sin tratar) para observar las diferencias respecto a las muestras tratadas con PEF.

Se tomaron tres muestras cilíndricas de tres partes paralelas al eje de la remolacha con la ayuda de un sacabocados de $7,5\ \text{mm}$ de diámetro interior (Figura 10). La medida de la fuerza de corte se realizó en tres puntos diferentes del cilindro tal y como se muestra en la Figura 10.

Además, se emplearon dos velocidades de corte diferentes, 1 y $5\ \text{mm/s}$, con el fin de ver las posibles diferencias en los valores texturales obtenidos: la fuerza máxima de corte (N) y el trabajo de compresión (N·mm).

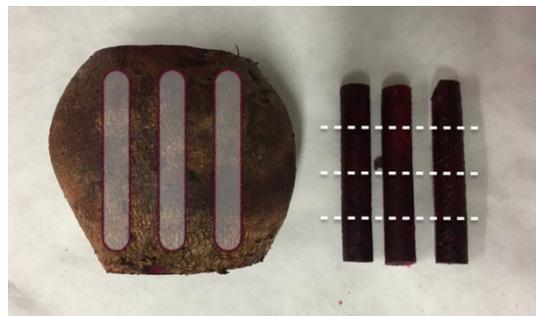


Figura 10 Toma de muestras para realizar la medida de la fuerza de corte y el trabajo de compresión.

3.5. PLANIFICACIÓN EXPERIMENTAL

Durante el proceso inicial de diseño experimental, se estudió la posibilidad de, además de considerar el agua y el etanol, añadir un tercer disolvente para la extracción, el tampón McIlvaine ajustado a pH 3,5. Este disolvente está formado parcialmente por fosfato disódico anhidro, el cual resulta ser un producto bastante peligroso y contaminante. A nivel industrial, si no se tiene precaución en su manipulación, puede causar irritación, enrojecimiento y dolor en la piel y en los ojos. De esta forma, al tratarse de la obtención de un colorante alimentario y por tanto, destinado a ser ingerido, se llegó a la conclusión de que no era el medio más apropiado para realizar la extracción. Finalmente, se decidió emplear solamente etanol puesto que es un disolvente que se utiliza ampliamente en la industria para realizar extracciones en matrices vegetales.

La Tabla 3 muestra la planificación experimental para realizar la extracción de betanina con agua destilada como disolvente, donde se estudió el efecto del método de extracción (agitación mecánica o USP a la potencia máxima del equipo, 43 W/l), el empleo de PEF y la temperatura (25, 35 y 45°C).

La Tabla 4 muestra la planificación experimental para realizar la extracción de la betanina con etanol como disolvente. En este caso, además de estudiarse el efecto del método de extracción (agitación mecánica o USP) y la aplicación de PEF, también se utilizaron diferentes proporciones de etanol (EtOH 10, 30 y 70%) y dos niveles de USP (50 y 90% de la potencia máxima del equipo, 21 y 39 W/l, respectivamente). En este último caso todas las extracciones se hicieron a una temperatura de 25°C debido a la alta volatilidad del etanol.

Tabla 4 Planificación experimental empleando agua como disolvente.

AGUA	Agitación	25°C
		35°C
		45°C
	USP	25°C
		35°C
		45°C
	PEF + Agitación	25°C
		35°C
		45°C
	PEF + USP	25°C
		35°C
		45°C

Tabla 3 Planificación experimental empleando etanol como disolvente; temperatura de extracción 25°C.

ETANOL	Agitación	EtOH 10%	
		EtOH 30%	
		EtOH 70%	
	USP	EtOH 10%	Potencia 50%
			Potencia 90%
		EtOH 30%	Potencia 50%
			Potencia 90%
		EtOH 70%	Potencia 50%
			Potencia 90%
	PEF + Agitación	EtOH 10%	
		EtOH 30%	
		EtOH 70%	
	PEF + USP	EtOH 10%	Potencia 50%
			Potencia 90%
		EtOH 30%	Potencia 50%
Potencia 90%			
EtOH 70%		Potencia 50%	
		Potencia 90%	

3.6. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La modelización matemática y el análisis estadístico constituyen herramientas de gran utilidad para la optimización, el control, la simulación y el diseño de procesos agroalimentarios, ya que permiten predecir y describir el comportamiento de un sistema según las condiciones de operación. Con el planteamiento matemático del modelo se determinan las variables que intervienen en el proceso para posteriormente establecer relaciones matemáticas entre las mismas y definir ecuaciones que nos permitan aportar un significado a los parámetros cinéticos del sistema.

Dado que las curvas de extracción obtenidas difieren de la forma lineal, el ajuste se realizó a un modelo matemático no-lineal, el modelo empírico de Weibull (Ecuación 4). Este modelo está basado en una función probabilística que se utiliza para predecir el comportamiento de sistemas complejos. Concretamente, en el campo de tecnología de alimentos, este modelo ha

sido extensamente utilizado para describir procesos de degradación, inactivación enzimática, crecimiento y supervivencia de microorganismos, secado o deshidratación de alimentos, digestión in vitro y degradación química de las propiedades de un producto (Fernández et al., 1999; Corzo & Bracho, 2009; Huang et al., 2014; Dalmau et al., 2017; Wang et al., 2018).

$$Y = \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{\beta}\right)^\alpha}\right) \cdot Y_\infty \quad (\text{Ecuación 4})$$

Siendo: α , el parámetro de escala; β , el parámetro de forma; Y , el rendimiento de la extracción después de un tiempo (t) e Y_∞ , el rendimiento de la extracción después de un tiempo infinito (t_∞).

La obtención de los parámetros del modelo se realizó mediante el planteamiento de un problema de optimización. Para ello, se minimizó el sumatorio de las diferencias al cuadrado entre los datos experimentales y los valores obtenidos en el modelo. Este cálculo se llevó a cabo mediante el método del Gradiente Reducido Generalizado (GRG), que se encuentra en la herramienta “*Solver*” de Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, EE. UU.). Se calculó también el coeficiente de regresión (R^2) y la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) para estimar la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales.

El efecto de los diferentes factores estudiados en el proceso de extracción de betanina de remolacha: tratamiento PEF; método de extracción (US con niveles de potencia del 50 y 90% o agitación mecánica); tipo de disolvente utilizado (agua o etanol al 10, 30 y 70%) y temperatura de extracción (25, 35 y 45°C), se evaluó mediante análisis multifactorial de la varianza (ANOVA), utilizando el programa informático STATGRAPHICS Centurion XVIII. Asimismo, se empleó un ANOVA de un solo factor para determinar el efecto de la intensidad del tratamiento PEF, sobre la textura de la remolacha.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado, por primera vez, la combinación del pretratamiento PEF con la extracción asistida mediante USP de betanina de la remolacha roja. Además, se ha determinado el efecto que tiene el empleo de agua o etanol como disolventes, la temperatura y el método de extracción. Por otra parte, se ha establecido la influencia de diferentes condiciones de pretratamiento con PEF en la fuerza necesaria para cortar la remolacha.

4.1. CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN DE BETANINA SIN PRETRATAMIENTO PEF

4.1.1. Influencia de la temperatura en las cinéticas de extracción con y sin USP.

La temperatura de extracción es un factor determinante, puesto que, a mayor temperatura, la densidad y la viscosidad, tanto del material vegetal como del disolvente disminuyen, lo que provoca una mejora de la transferencia de masa, y por tanto una mayor efectividad en la extracción. Además, la temperatura también afecta a la fluidez y la estabilidad de la membrana celular.

Para estudiar el efecto de la temperatura se utilizó únicamente agua como disolvente, debido a la alta volatilidad del etanol. Las pruebas descritas en este apartado se realizaron sin tratamiento PEF, a tres temperaturas diferentes (25, 35 y 45°C), tanto en agitación mecánica como asistida por ultrasonidos.

Agitación mecánica

El efecto de la temperatura sobre la extracción de betanina se muestra en la Figura 11. Tras una extracción de 180 minutos se obtiene un 22,2% de betanina a 25°C, un 29,3% a 35°C y un 39,8% si la temperatura alcanza los 45°C. Estos resultados confirman el efecto que suele tener la temperatura en los procesos extractivos: a mayor temperatura, mayor rendimiento de extracción.

Por otro lado, se puede observar que, durante los primeros 10 minutos, la cinética de extracción es muy similar a las tres temperaturas utilizadas. Esto se debe a que, al inicio de la extracción, la temperatura no tiene efectos significativos, al encontrarse en la fase donde la mayor parte del soluto extraído se encuentra en la superficie de los cilindros de remolacha.

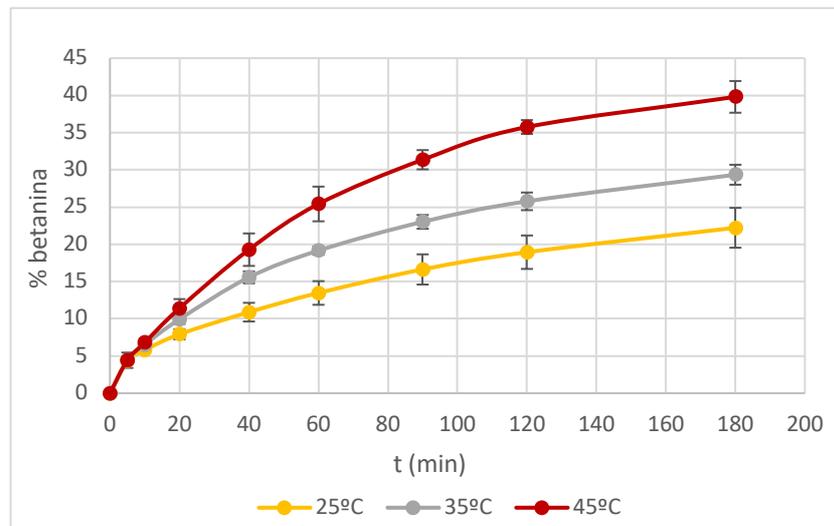


Figura 11 Cinéticas de extracción de betanina para el agua con agitación mecánica a 25, 35 y 45°C. Muestras sin pretratamiento PEF.

La ratio de extracción de betanina siempre fue mayor durante los primeros 20 minutos y después disminuyó exponencialmente. Este comportamiento en las cinéticas de extracción, que se repite para todas las cinéticas estudiadas en el presente trabajo, se debe a dos razones fundamentales. Por una parte, inicialmente se produce la extracción de la betanina más accesible, la que se localiza en la parte externa del cilindro de remolacha, para posteriormente comenzar el proceso de extracción de la betanina contenida en el interior de los cilindros de remolacha. La extracción de betanina de la parte más externa se produce por transferencia convectiva de masas. Sin embargo, la betanina que se encuentra en la parte interior es extraída por difusión a través de los poros del material vegetal, fenómeno donde la velocidad es mucho menor (Hemwimol et al., 2006). Por otra parte, la caída en la velocidad de extracción se ve reforzada por la disminución en el gradiente de concentración de betanina entre el disolvente y los cilindros de remolacha, conforme pasa el tiempo de extracción y la betanina pasa de la remolacha al disolvente.

Ultrasonidos de potencia (USP)

La Figura 12 muestra las cinéticas de extracción de betanina para el agua empleando US con una potencia de 43 W/l, que corresponde a la máxima potencia que el equipo empleado es capaz de generar.

En este caso, se observa una mayor diferencia en la proporción extraída de betanina al realizar la extracción a una temperatura de 45°C, obteniendo un 55,6%, respecto a las temperaturas de 25°C y 35°C, donde se extrae menos del 20% del colorante (8,5 y 17,6% respectivamente).

A los 20 minutos de extracción ya se puede observar una gran diferencia en las cinéticas de extracción entre la prueba realizada a 45°C, obteniéndose un 18,5% de betanina, y las realizadas a 25 y 35°C, en las que se obtiene menos de la mitad. Esto podría deberse a que, a temperaturas elevadas, la membrana celular es más vulnerable a la implosión de las burbujas de cavitación producidas por las ondas de US, lo que aumenta la transferencia de masa, facilitando una mayor penetración del disolvente y un mayor rendimiento de la extracción.

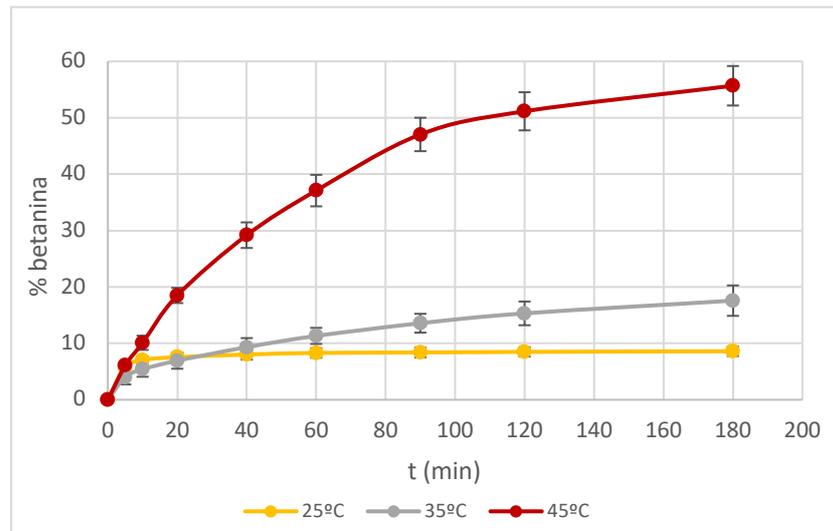


Figura 12 Cinéticas de extracción de betanina para el agua empleando US con una potencia de 43 W/l a 25, 35 y 45°C. Muestras sin pretratamiento PEF.

4.1.2. Influencia del disolvente en las cinéticas de extracción con y sin USP.

Las extracciones de componentes bioactivos (carotenoides, flavonoides, tioles...) en la industria alimentaria se han llevado a cabo tradicionalmente con disolventes orgánicos. Sin embargo, algunos de éstos son tóxicos (como por ejemplo el metanol) y, por lo tanto, deben extremarse las condiciones de seguridad en la extracción.

En este apartado, las experiencias se realizaron sin pretratamiento con PEF y se utilizó tanto agua destilada como etanol (EtOH) para realizar la extracción, puesto que no son disolventes perjudiciales para la salud y están más aceptados en la industria alimentaria.

A pesar de que un aumento en la temperatura de trabajo favorece la extracción, según lo descrito en el apartado 4.1.1., en las pruebas realizadas con etanol se mantuvo una temperatura constante de 25°C, puesto que es un compuesto volátil a temperaturas elevadas. Además, la temperatura es un factor decisivo para la descomposición de las betalaínas, intensificándose su degradación si la extracción se realiza a altas temperaturas.

Dado que la aplicación de USP conlleva a un aumento de temperatura, tal y como se comentó en el apartado de materiales y métodos, ésta se controló externamente mediante la recirculación de agua fría durante la extracción.

Agitación mecánica

En la Figura 13 se comparan las cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70%, en agitación, a una temperatura de 25°C y sin pretratamiento PEF. Tras 180 minutos

de extracción se obtuvo un 22,2% de betanina en el caso del agua, un 40,0% en el caso del EtOH 10%, un 66,4% en el caso del EtOH 30% y un 62,9% en el caso del EtOH 70%.

Observando las diferencias entre un disolvente y otro, se puede afirmar que la mínima proporción de EtOH utilizada (10%) es suficiente para generar un importante aumento en el rendimiento de la extracción.

De la misma forma, se puede observar una gran similitud en las cinéticas de extracción del EtOH 30% y del EtOH 70%, es decir que a partir de un 30% de etanol ya no es posible extraer mayor cantidad de betanina, bajo las condiciones de extracción ensayadas. Por lo tanto, a nivel de proceso industrial, no valdría la pena superar un umbral de 30% de etanol en la extracción de este colorante.

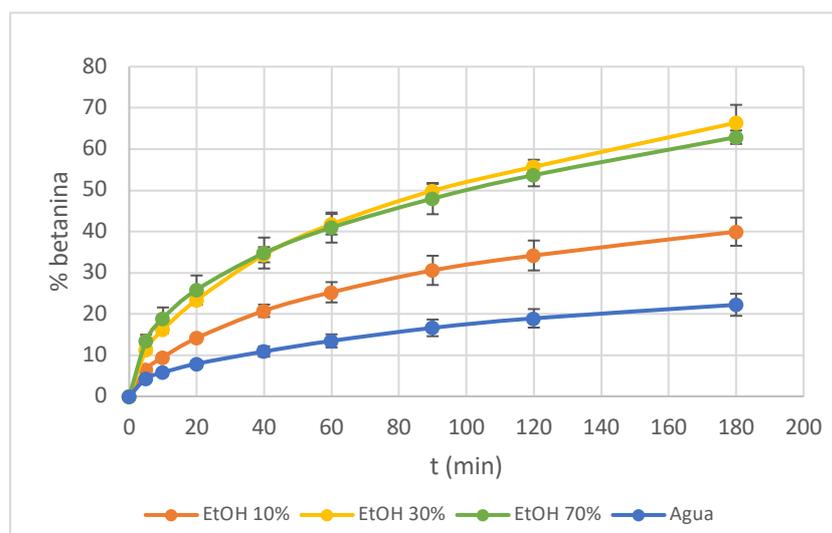


Figura 13 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el etanol al 10, 30 y 70% con agitación mecánica a 25°C. Muestras sin pretratamiento PEF.

Ultrasonidos de potencia (USP)

Algo similar ocurre al aplicar USP durante el proceso de extracción. En las Figuras 14 y 15 se comparan las cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70%, a una temperatura de 25°C, con una potencia de ultrasonidos de 21 W/l (Figura 14), que corresponde al 50% de la capacidad máxima del equipo y una potencia de 39 W/l (Figura 15), que corresponde al 90% de la capacidad máxima del equipo.

En el caso de aplicar una potencia de 21 W/l, se obtiene un 5,8% de betanina a los 180 min si el disolvente es agua destilada, un 24,5% si es EtOH 10%, un 64,6% si es EtOH 30% y un 73,0% si es EtOH 70%. Si la potencia aumenta a 39 W/l, la cantidad de betanina obtenida es del 9,0% si el disolvente es agua destilada, 39,2% si es EtOH 10%, 69,6% si es EtOH 30% y 64,7% si se trata de EtOH 70%.

Con los resultados obtenidos, se puede observar una vez más que las diferencias entre el empleo de EtOH 30% y EtOH 70% son mínimas, tanto si se aplica una potencia de US de 21 W/l como si es de 39 W/l. En el caso del EtOH 10% se puede ver un aumento de aproximadamente un 15% en el rendimiento de la extracción al utilizar una potencia de US de 90% respecto de la de 50%.

Sin embargo, al utilizar agua como disolvente no se aprecia una gran influencia de la aplicación de USP, pues tanto al 50% como al 90% de la potencia máxima del equipo no se alcanza el 10% de extracción de betanina de la remolacha roja.

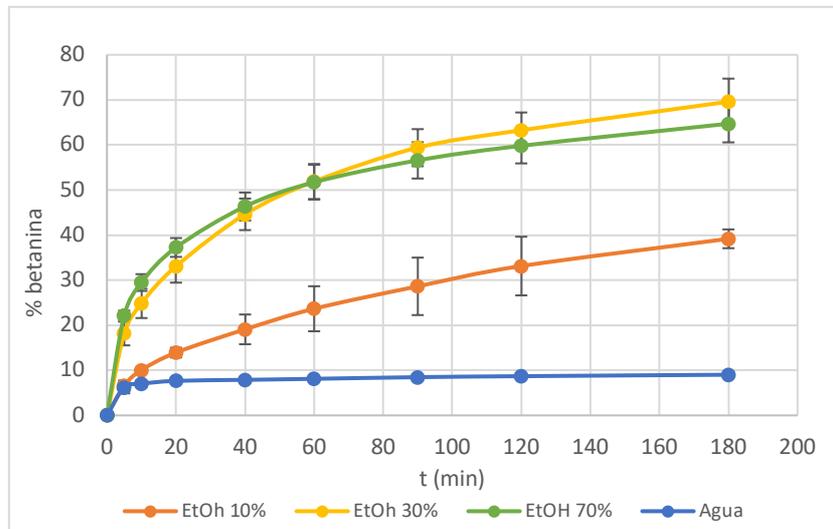


Figura 14 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el etanol al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 21 W/l a 25°C. Muestras sin pretratamiento PEF.

Existen numerosos estudios sobre la extracción de componentes bioactivos de productos hortofrutícolas. Un ejemplo es el llevado a cabo por Li et al. (2006), sobre la extracción de compuestos fenólicos de la piel de los cítricos, en el que se utilizó agua y etanol al 20, 50, 72, 85 y 95%, llegando a la máxima extracción entre el 72 y 85% de etanol.

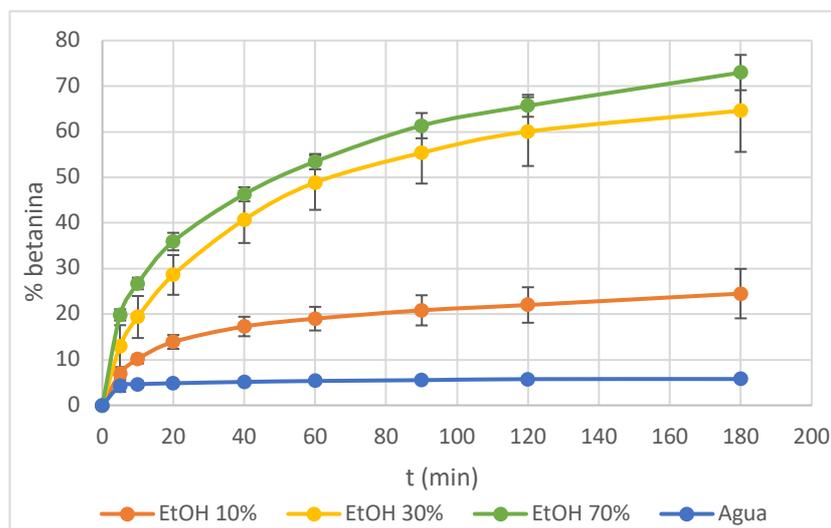


Figura 15 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el etanol al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 39 W/l a 25°C. Muestras sin pretratamiento PEF.

Ravichandran et al. (2013), investigaron la influencia de varias técnicas de procesado de alimentos (microondas, cocción, horneado y vacío) en la cantidad de betalaínas extraídas, así como la actividad antioxidante de la remolacha roja. Utilizaron diferentes concentraciones de etanol para realizar la extracción, y los resultados obtenidos mostraron que la concentración

óptima era del 50% de etanol. Por otro lado, con el empleo de un 30% de etanol se alcanzaba la mayor estabilidad de betalaínas, en comparación con otras concentraciones. Delgado-Vargas et al. (2000), recomendaron entre un 20 y un 50% de etanol para una extracción completa de betalaínas.

Así pues, los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que se ha demostrado que la concentración de etanol óptima para realizar la extracción a temperatura ambiente es del 30%, ya que se obtienen resultados similares al 70%, está en la línea de lo encontrado en bibliografía.

Otros de los posibles disolventes para la extracción de betanina son, disoluciones de ácido cítrico, puesto que mejora la estabilidad de la betacianina (Pasch & Von Elbe, 1979; Han et al., 1998) o de ácido isoascórbico (Herbach et al., 2006).

4.2. CINÉTICAS DE EXTRACCIÓN DE BETANINA CON PRETRATAMIENTO PEF

Generalmente, el tratamiento PEF ha supuesto una importante mejora en el rendimiento de la extracción de betanina de la remolacha roja, debido a los cambios estructurales de la matriz vegetal.

Todas las pruebas descritas en este apartado se llevaron a cabo a partir de un pretratamiento PEF, para observar el efecto de la temperatura, el tipo de disolvente y el uso de ultrasonidos en las cinéticas de extracción.

4.2.1. Influencia de la temperatura en las cinéticas de extracción con y sin USP.

En este caso, la extracción se realizó con agua destilada a las temperaturas de 25, 35 y 45°C, tanto en agitación, como en presencia de ultrasonidos. Dado que la aplicación de USP conlleva a un aumento de temperatura, esta se controló externamente mediante la recirculación de agua fría durante la extracción.

Agitación mecánica

La Figura 16 muestra las cinéticas de extracción de betanina para el agua en agitación a 25, 35 y 45°C. La cantidad de betanina obtenida tras 180 minutos de extracción es del 54,7% a una temperatura de 25°C, del 56,0% a 35°C y del 52,0% a 45°C.

Las mínimas diferencias entre las cinéticas de extracción a las tres temperaturas pueden deberse al fenómeno de electroporación que produce el tratamiento PEF. Este pretratamiento consigue que aumente el rendimiento de la extracción, sin que el factor temperatura tenga la misma influencia que cuando no se aplica el pretratamiento.

En la aplicación del pretratamiento PEF a nivel industrial, es muy interesante la independencia del rendimiento de la extracción de betanina de la temperatura, puesto que sería posible llevar a cabo la extracción a temperatura ambiente, obteniendo resultados semejantes a los de temperaturas superiores.

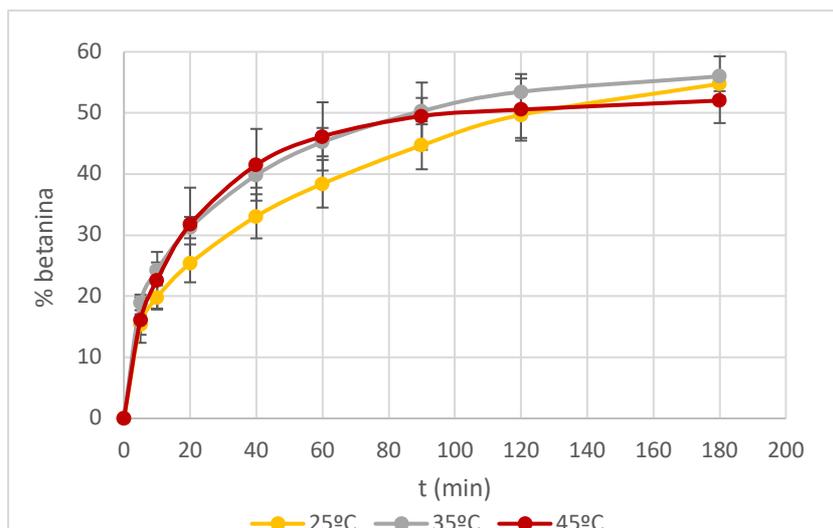


Figura 16 Cinéticas de extracción de betanina para el agua en agitación mecánica a 25, 35 y 45°C. Muestras con pretratamiento PEF.

Ultrasonidos de potencia

La Figura 17 muestra las cinéticas de extracción de betanina para el agua, empleando US con una potencia de 43 W/l, que corresponde al máximo de la potencia del equipo. Los valores de betanina obtenidos a los 180 min son: un 69,4% a una temperatura de 25°C, un 61,7% a 35°C y 63,3% a 45°C.

Al comparar las Figuras 16 y 17, se puede observar que el rendimiento de la extracción es mayor con la aplicación de USP. Tras 90 minutos de extracción se aprecia como en el caso del empleo de USP (Figura 17) la proporción de pigmento es prácticamente la misma a las tres temperaturas utilizadas (alrededor de 60%) siendo un 10% mayor que en la agitación convencional. A pesar de que el rendimiento general aumenta con la aplicación de USP, sigue sin observarse una dependencia de la temperatura en las cinéticas de extracción.

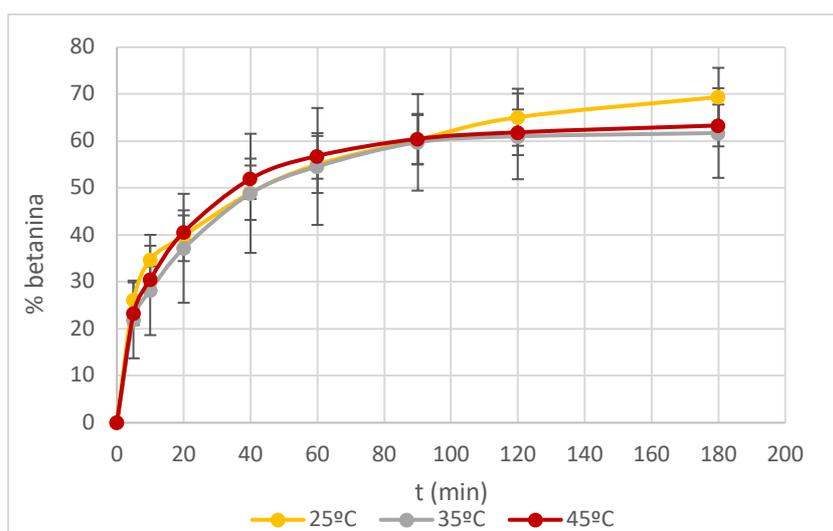


Figura 17 Cinéticas de extracción de betanina para el agua empleando US con una potencia de 43 W/l a 25, 35 y 45°C. Muestras con pretratamiento PEF.

4.2.2. Influencia del disolvente en las cinéticas de extracción con y sin USP.

Debido a la alta volatilidad del etanol, se decidió mantener una temperatura constante de 25°C durante todo el proceso de extracción. Desde el punto de vista de su aplicación industrial, esta temperatura supondría un menor gasto de energía y, por tanto, un mayor ahorro económico. Para determinar el efecto del disolvente sobre la extracción, tras un pretratamiento PEF, se estudió el proceso de extracción mediante agitación convencional y mediante USP.

4.2.2.1. Agitación mecánica

Tras la aplicación de pulsos eléctricos, las cinéticas de extracción son muy similares tanto para el agua como para las tres concentraciones de EtOH en agitación, tal y como se puede ver en la Figura 18. Tras 180 minutos de extracción, se consiguió un 54,7% de betanina utilizando agua como disolvente, un 57,9% con EtOH 10%, un 64,7% con EtOH 30% y un 64,5% con EtOH 70%.

En este caso, las diferencias entre el empleo de agua o etanol al 30 o 70% se ven reducidas y, en cualquier caso, el empleo de concentraciones mayores al 30% no suponen mejoría en la extracción de betanina de la remolacha roja.

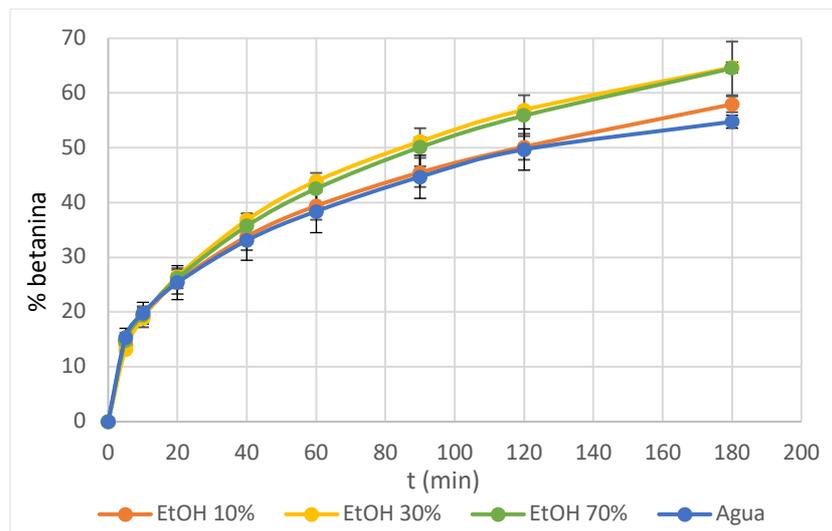


Figura 18 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70% con agitación mecánica a 25°C. Muestras con pretratamiento PEF.

4.2.2.2. Ultrasonidos de potencia

La combinación de pretratamiento PEF y US de potencia a 21 W/l y a 39 W/l se puede observar en las Figuras 19 y 20, respectivamente.

En el primer caso (Figura 19), tras 180 minutos de extracción, se obtiene un 40,5% de betanina si el disolvente es agua, un 70,5% si se trata de EtOH 10%, un 78,6% si se trata de EtOH 30% y un 83,1% si se utiliza EtOH 70%.

En la Figura 20 se observa que con el EtOH 70% se obtiene menos pigmento que con el EtOH 10 y 30%. Esto puede ser debido a una interacción negativa entre el tipo de solvente y la aplicación de ultrasonidos a elevadas potencias, dificultándose el fenómeno de cavitación por las características de densidad y viscosidad del EtOH 70%.

Por lo general, la combinación de PEF y USP produce una importante mejora en el rendimiento de la extracción de betanina de la remolacha roja, respecto al empleo de agitación mecánica, en el caso de que el disolvente sea etanol, llegándose a obtener más del 80% del pigmento.

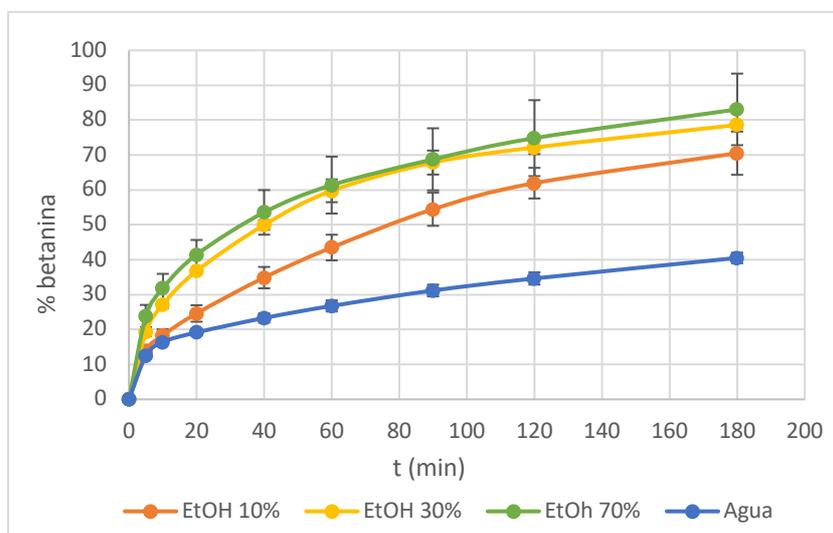


Figura 19 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 21 W/l a una temperatura de 25°C. Muestras con pretratamiento PEF.

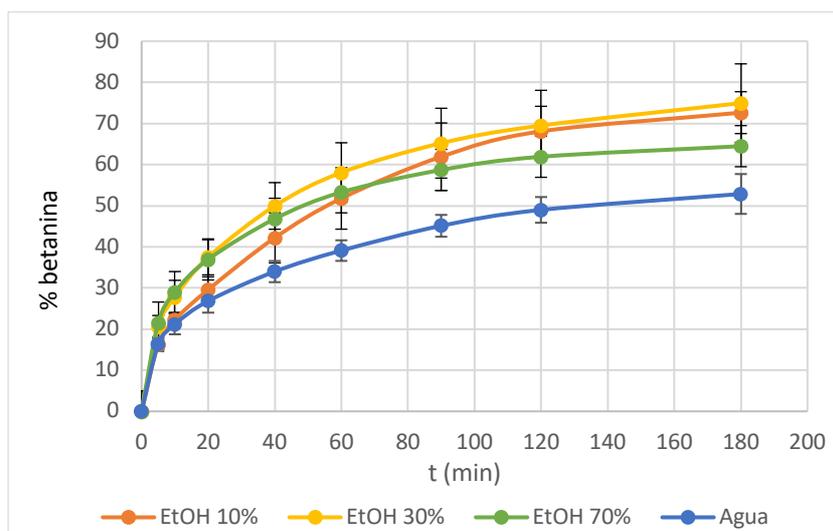


Figura 20 Cinéticas de extracción de betanina para el agua y el EtOH al 10, 30 y 70% empleando US con una potencia de 39 W/l a una temperatura de 25°C. Muestras con pretratamiento PEF.

Normalmente el rendimiento de la extracción es mayor cuando se aumenta la potencia de US, a veces incluso de forma lineal, como observaron Zou et al. (2010) en su trabajo sobre la extracción de melanina de *Auricularia auricula*.

La Tabla 5 es una recopilación de las cantidades de betanina extraída (%) para el agua y EtOH al 10, 30 y 70%, a los 180 min, a una temperatura constante de 25°C mediante los diferentes métodos de extracción con y sin tratamiento PEF. En ella se puede ver claramente como la cantidad de pigmento extraído aumenta considerablemente al utilizar un disolvente con una proporción de etanol superior al 30%, pudiendo verse sus efectos incluso a la mínima

concentración estudiada, la de 10% de etanol. De la misma manera, se puede observar que con la aplicación de US al 90% de potencia solamente se consiguen resultados favorables respecto a la potencia de 50% tanto en el agua como en el EtOH 10%, pero en el caso del EtOH 30 y 70% no supone ninguna mejoría. El pretratamiento PEF, a pesar de que muestra un aumento generalizado del rendimiento de la extracción, sus efectos son más visibles en el caso del agua y del EtOH 10%.

Tabla 5 Cantidad de betanina extraída (%) mediante los diferentes métodos de extracción, con o sin pretratamiento, para cada disolvente tras 180 minutos de extracción. Media y desviación estándar.

	Disolvente	SIN PEF (%)	CON PEF (%)
Agitación	Agua	22,2 ± 3	54,8 ± 1
	EtOH 10%	40,0 ± 3	57,9 ± 1
	EtOH 30%	66,4 ± 4	64,7 ± 1
	EtOH 70%	62,9 ± 2	64,5 ± 5
US 50%	Agua	5,8 ± 1	40,5 ± 2
	EtOH 10%	24,5 ± 5	70,5 ± 6
	EtOH 30%	64,6 ± 9	78,6 ± 1
	EtOH 70%	73,0 ± 4	83,1 ± 10
US 90%	Agua	9,0 ± 1	52,9 ± 5
	EtOH 10%	39,2 ± 2	72,6 ± 5
	EtOH 30%	69,6 ± 5	75,0 ± 10
	EtOH 70%	64,7 ± 4	64,5 ± 2

4.3. EFECTO DE LAS VARIABLES DEL PROCESO EN LA EXTRACCIÓN DE BETANINA.

Para mejorar la difusión de betanina al medio de extracción, existen diversos métodos entre los que destacan la fragmentación mecánica, la aplicación de calor, la utilización de uno o varios medios extractores, la aplicación de ultrasonidos, así como el prensado del sólido, entre otros. Estos métodos deben de tenerse en cuenta durante el proceso de extracción, ya que el colorante se puede ver afectado por la temperatura, la luz, el pH, el oxígeno, etc. En el presente estudio se decidió cuantificar el efecto de la temperatura, tipo de disolvente, pretratamiento PEF y uso de USP sobre la extracción de la betanina de la remolacha roja.

4.3.1. Extracción S-L en agua a diferentes temperaturas

En el caso de utilizar agua destilada como disolvente, el análisis estadístico se realizó estudiando los factores pretratamiento, método de extracción, temperatura y tiempo.

El método empleado para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Los resultados mostraron que los cuatro factores mencionados anteriormente presentaron un valor-P menor de 0,05, lo que significa que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de betanina obtenida en los análisis, con un nivel del 95,0 % de confianza.

De esta forma, en la Figura 21 se puede observar que no existen diferencias significativas entre la aplicación del 50% de la potencia máxima del equipo, 21 W/l, y la aplicación del 90% de la potencia máxima, 39 W/l. Por otra parte, aplicando el 100% de la potencia del equipo se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) de la betanina extraída, respecto al proceso de agitación mecánica. Potencias menores no permiten una mejora del proceso mediante USP. Asimismo, destacar que no existieron interacciones de dos factores en el modelo.

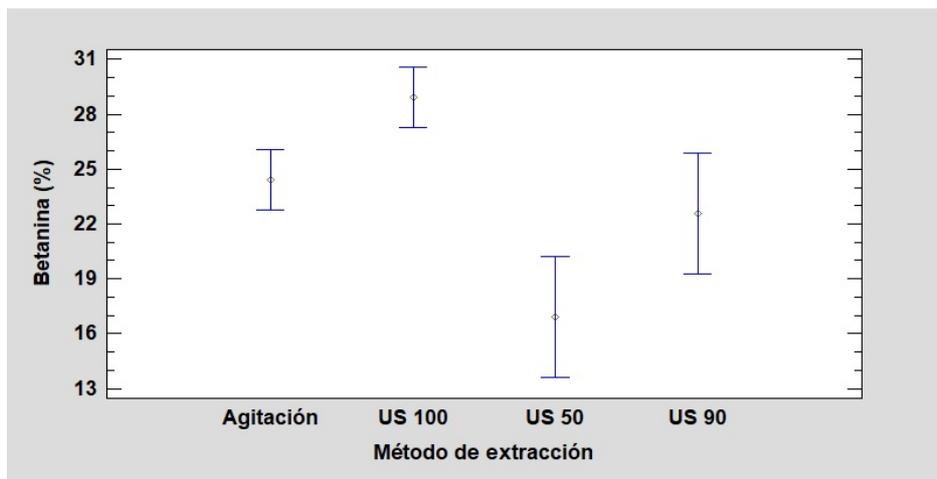


Figura 21 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada comparando los diferentes métodos de extracción.

En cuanto a la extracción a diferentes temperaturas, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la temperatura de 45°C respecto a las otras dos, 25 y 35°C. Estas comparaciones se pueden observar en la Figura 22 donde se muestran los gráficos del test de Fisher LSD.

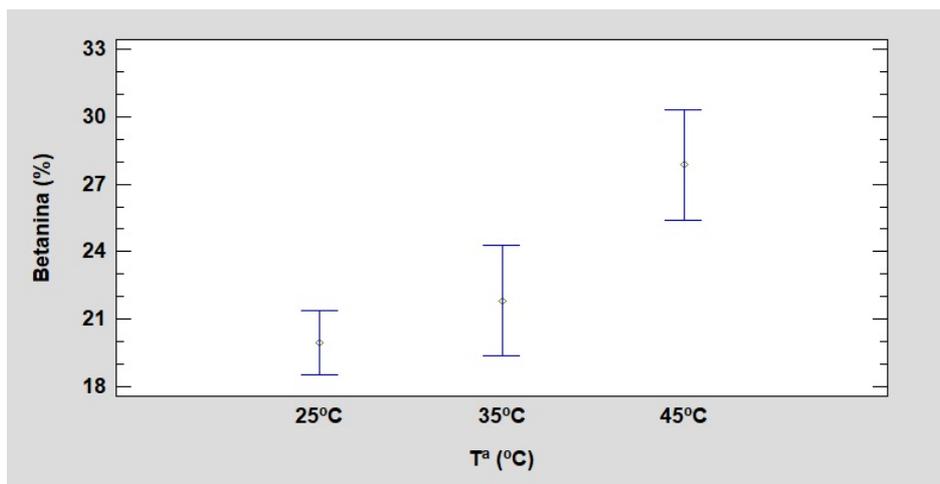


Figura 22 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada comparando las diferentes temperaturas.

En cuanto al tiempo de extracción (Figura 23), se observa que es un factor significativo y que, tal y como se comentó en el apartado de cinéticas, a partir de 60 min las diferencias en la cantidad extraída son cada vez menores.

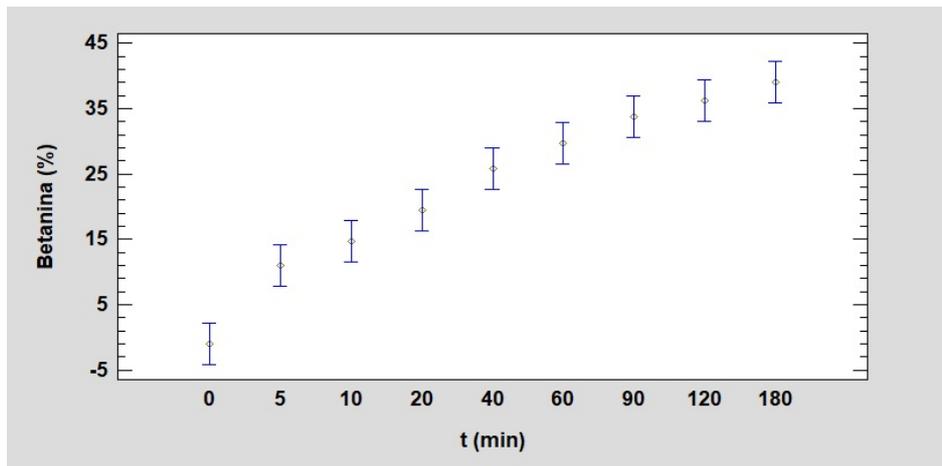


Figura 24 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada en función de los tiempos de extracción.

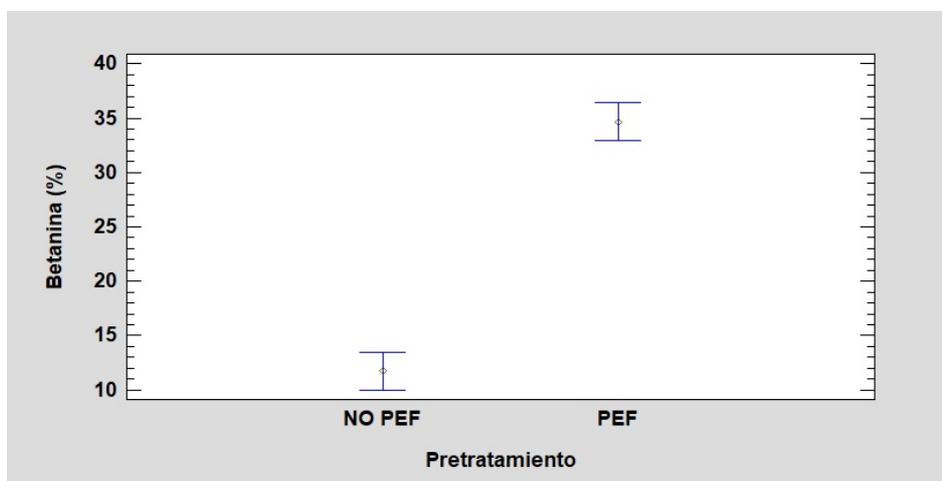


Figura 23 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con agua destilada con o sin la aplicación de PEF.

La Figura 24 muestra claramente las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la betanina obtenida con y sin la aplicación de PEF, en el caso de que el disolvente sea agua destilada.

4.3.2. Extracción S-L en agua y etanol a temperatura constante

En el caso de utilizar etanol a diferentes concentraciones y agua destilada, a una temperatura constante de 25°C, el análisis estadístico se realizó con los factores pretratamiento, método de extracción, disolvente y tiempo. Puesto que en todos los casos el valor-P fue menor de 0,05, estos cuatro factores presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre la extracción de betanina, con un 95,0 % de nivel de confianza.

Al realizar el ANOVA multifactorial, y considerando el tipo de disolvente, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) si se compara la utilización de agua con la utilización de etanol (a cualquiera de las concentraciones). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 25) entre el uso de EtOH 30% y EtOH 70%. Estos resultados confirman lo comentado anteriormente en los apartados de cinéticas, ya que, en general, superar el 30% de etanol no permite mejoras significativas en la extracción y por lo tanto no sería recomendable a nivel industrial.

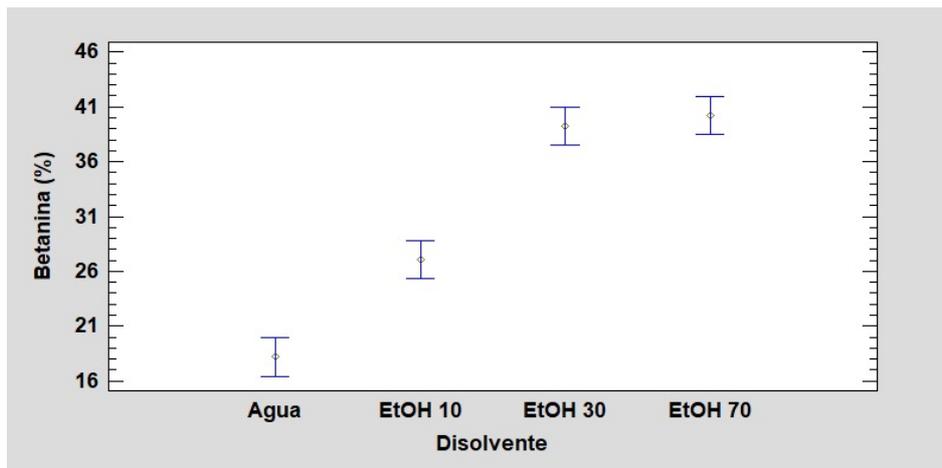


Figura 25 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina comparando diferentes disolventes.

En cuanto al método de extracción, las diferencias que existen son significativas ($p < 0,05$) si se compara la extracción en agitación o mediante ultrasonidos, pero son no significativas ($p > 0,05$) entre los dos niveles de potencia de US (Figura 26).

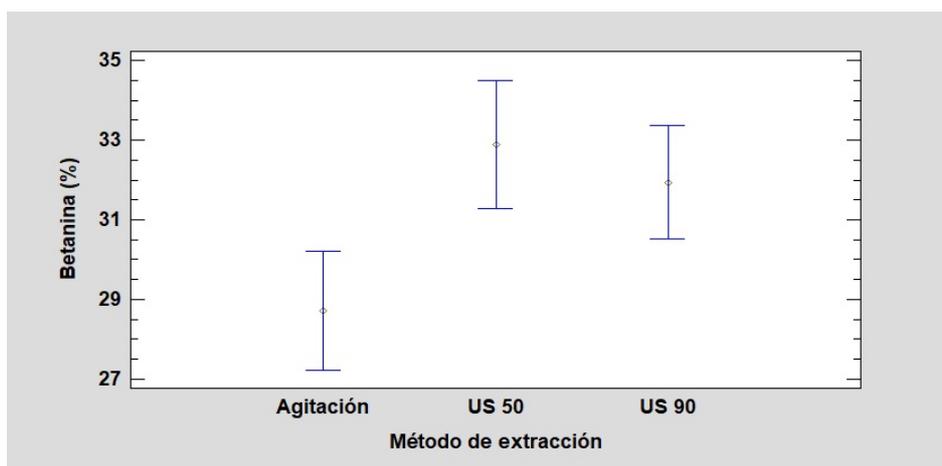


Figura 26 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con diferentes disolventes comparando los métodos de extracción.

Al comparar las Figuras 21 y 26, se puede observar como en la primera, la extracción con USP no supone mejoría respecto al empleo de agitación mecánica. Sin embargo, en la Figura 26, la extracción mediante USP sí que produce efectos favorables respecto a la agitación. Esto puede deberse a que, en el caso del empleo de etanol como disolvente, sí que existe interacción entre el método de extracción y el tipo de disolvente y, por tanto, el efecto de los USP es mucho mayor.

El estudio de la betanina obtenida a los diferentes tiempos estudiados mostró un aumento significativo ($p < 0,05$) de la cantidad extraída con el tiempo de extracción (Figura 27).

La aplicación de un tratamiento de pulsos eléctricos antes de la extracción de betanina genera diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de pigmento obtenido, respecto a la extracción sin pretratamiento, puesto que tras el pretratamiento los valores son notablemente mayores, tal y como se puede observar en la Figura 28.

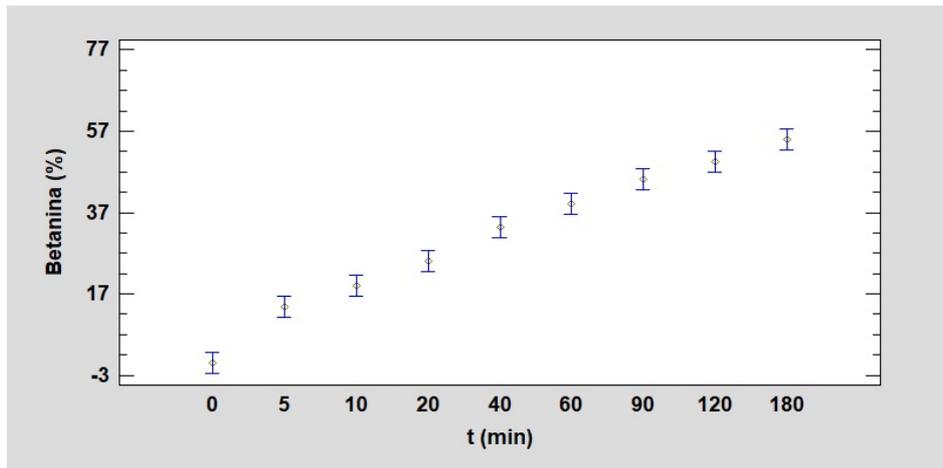


Figura 27 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con diferentes disolventes a los diferentes tiempos de extracción.

Dada la posibilidad de combinar los factores pretratamiento PEF y USP, cabe destacar la interacción entre ambos, ya que se ha podido observar como en las muestras pretratadas con PEF, el efecto de los USP es mayor que en las no tratadas, consiguiéndose una cantidad de pigmento considerablemente superior.

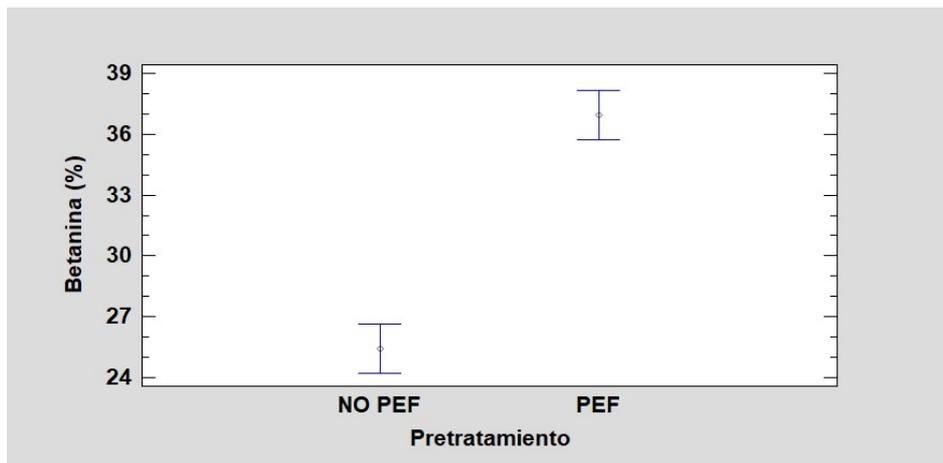


Figura 28 Test de Fisher (LSD) para la extracción de betanina con diferentes disolventes comparando la aplicación de tratamiento PEF.

4.4. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON PEF SOBRE LA TEXTURA DE LA REMOLACHA

De forma complementaria a la extracción de betanina, se realizó un estudio para determinar la influencia de la intensidad del tratamiento PEF (mediante la aplicación de un número variable de pulsos de igual amplitud y duración) sobre la textura final del tejido tratado. La Figura 29 muestra la apariencia externa de la remolacha roja tras los distintos tratamientos de PEF. Así pues, con el aumento del número de pulsos se puede ver claramente como aumenta el fenómeno de exudación, como consecuencia de los diferentes niveles de electroporación celular.

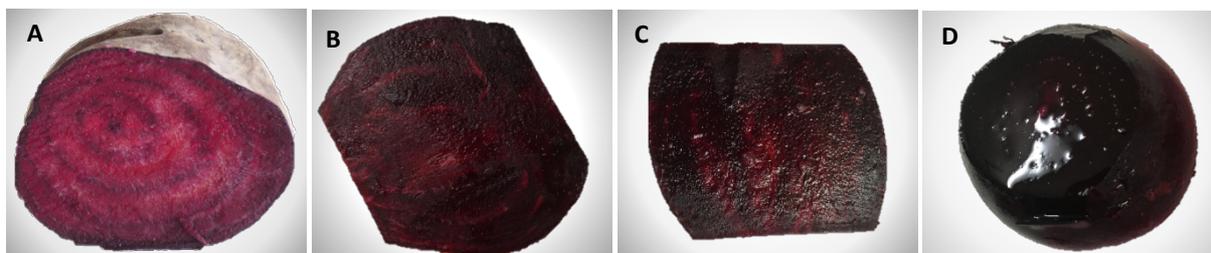


Figura 29 Secciones transversales de remolacha: sin pretratamiento de PEF (A) y con tratamiento de PEF de 8 pulsos (B), 20 pulsos (C) y 32 pulsos (D); fuerza de campo de 1,25 kV/cm; duración de pulso de 25 μ s y 10 Hz de frecuencia.

Mediante la curva fuerza–deformación, se calcularon la fuerza máxima de corte y el trabajo de compresión. Los resultados de este análisis se muestran en las Figuras 30 y 31, expresados como valores de media y desviación estándar para ambas velocidades de corte (1 y 5 mm/s). Mediante el estudio del ANOVA Multifactorial, se observó que la velocidad de corte no fue un factor significativo ($p > 0,05$) en el análisis. Sin embargo, sí se encontró un efecto significativo ($p < 0,05$) del tipo de tratamiento aplicado sobre los dos parámetros texturales.

Mediante el estudio de los intervalos LSD, se observó que no existían diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la remolacha sin pretratamiento y la de 8 pulsos, así como entre la tratada con 8 pulsos y la de 20 pulsos. No obstante, el pretratamiento de 32 pulsos sí que mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al resto de pretratamientos, tanto para el trabajo de compresión como para la fuerza máxima de corte.

A partir de los valores obtenidos en las Figuras 30 y 31, se puede observar que, cuanto mayor es el número de pulsos aplicados, la fuerza máxima de corte y el trabajo de compresión disminuyen, lo que indica un reblandecimiento de los tejidos celulares de la remolacha. Si se compara el promedio de la fuerza máxima de corte para las dos velocidades estudiadas (5 y 1 mm/s), se observa que se requieren alrededor de 26 N para la muestra sin tratar, mientras que, para la tratada con 32 pulsos, únicamente son necesarios 15 N, es decir, un poco más de la mitad.

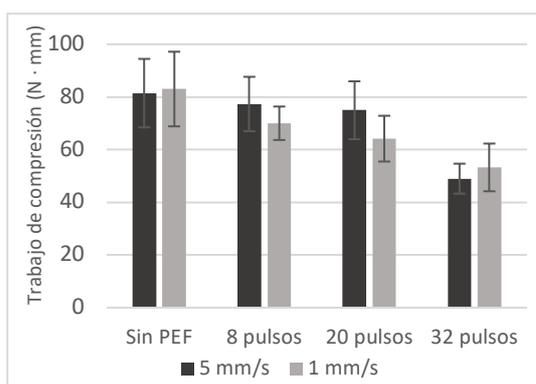


Figura 31 Valor medio y desviación estándar para el trabajo de compresión de la remolacha a dos velocidades de corte, con diferentes tratamientos PEF.

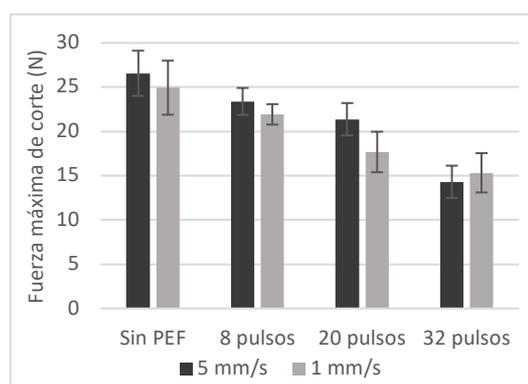


Figura 30 Valor medio y desviación estándar para la fuerza máxima de compresión de la remolacha a dos velocidades de corte, con diferentes tratamientos PEF.

El trabajo de compresión es muy similar, tanto para la muestra sin tratar, como para los tratamientos de 8 y 20 pulsos a ambas velocidades de corte, requiriéndose entre 65 y 80 N·mm. Sin embargo, si en el tratamiento se aplican 32 pulsos eléctricos, el trabajo de compresión se reduce a un promedio de 50 N·mm para ambas velocidades.

Otros estudios que también han descrito el reblandecimiento de tejidos vegetales son los llevados a cabo por Fincan & Dejmek (2003) y Lebovka et al. (2004).

Fincan & Dejmek (2003) estudiaron el efecto de los PEF sobre las propiedades viscoelásticas de la piel de la patata. En su trabajo, establecieron intensidades de pulso entre 0,5 y 1,5 kV/cm; duraciones de tratamiento de 10, 100 y 1000 μ s; 1, 9 y 90 pulsos eléctricos y un espacio entre pulso y pulso de 10 ms. Los resultados obtenidos dieron lugar a un mayor reblandecimiento del tejido con la aplicación de un número elevado de pulsos de corta duración en cualquiera de las intensidades de pulso utilizadas.

Lebovka et al. (2004) estudiaron el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos en combinación con PEF en las propiedades texturales de la carlota, la patata y la manzana. Las muestras fueron calentadas a 45-65°C y posteriormente fueron tratadas con PEF a intensidades entre 560 y 1100 V/cm, una duración de pulso de 10 μ s y un espacio entre pulsos de 10 ms. Se demostró que el tratamiento PEF ayuda a alcanzar un elevado reblandecimiento de la textura de los alimentos en cuestión, pero no es completamente efectivo si no es acompañado por un pretratamiento térmico.

La aplicación de una alta intensidad de campo eléctrico puede dañar notablemente la membrana celular, eliminar la turgencia del tejido vegetal y ejercer una influencia destacable en las propiedades viscoelásticas del tejido mismo. De esta forma, es posible reducir la energía que se necesita para cortar el material vegetal, lo que redundaría en un beneficio económico en la operación de reducción de tamaño, etapa previa a la extracción de la betanina de la remolacha roja.

4.5. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA

Para proceder a la modelización matemática de los procesos de extracción sólido-líquido se puede recurrir a modelos teóricos, empíricos o semi-empíricos. En muchas ocasiones, por razones prácticas, se utilizan modelos empíricos como la ecuación de Higuchi, la ley potencial o la ecuación de Weibull. La ventaja de este tipo de modelos es que suelen ser fácilmente ajustables a los datos experimentales (Farr et al., 2012).

En la Tabla 6 se presentan los valores calculados de los parámetros de escala (α) y de forma (β), el rendimiento de la extracción después de un tiempo infinito (Y_{∞}) así como el coeficiente de determinación (R^2) del modelo de Weibull (Ecuación 1) para las diferentes condiciones experimentales ensayadas (pretratamiento y condiciones de extracción). En la Tabla 6 también se muestra el valor del rendimiento máximo real (Y_{exp}) encontrado en cada tratamiento.

El coeficiente de determinación R^2 fue en todos los casos superior a 0,99 lo que refleja el buen ajuste del modelo a los datos experimentales de las extracciones realizadas.

Tabla 6 Parámetros obtenidos tras el ajuste de las cinéticas de extracción con el modelo de Weibull y el rendimiento real de la extracción a los 180 minutos de extracción.

Condiciones de extracción	α	β	Y_{exp}	Y_{∞}	R^2
Agit. EtOH 10%	0,641	147,295	39,962	58,79	0,9999
Agit. EtOH 30%	0,625	161,442	66,395	100,00	0,9994
Agit. EtOH 70%	0,537	192,342	62,891	100,00	0,9990
US50 EtOH 10%	0,545	39,003	24,496	26,68	0,9963
US50 EtOH 30%	0,717	48,008	64,607	70,06	0,9997
US50 EtOH 70%	0,509	89,988	72,973	96,16	0,9998
US90 EtOH 10%	0,551	640,592	39,176	100,00	0,9994
US90 EtOH 30%	0,562	65,003	69,580	84,00	0,9995
US90 EtOH 70%	0,479	43,226	64,705	74,77	0,9998
PEF + Agit. EtOH 10%	0,485	248,594	57,940	100,00	0,9998
PEF + Agit. EtOH 30%	0,577	127,405	64,671	91,77	1,0000
PEF + Agit. EtOH 70%	0,541	174,596	64,499	100,00	0,9988
PEF + US50 EtOH 10%	0,644	133,714	70,537	100,00	0,9942
PEF + US50 EtOH 30%	0,614	54,228	78,632	90,08	0,9991
PEF + US50 EtOH 70%	0,521	64,807	83,084	100,00	0,9991
PEF + US90 EtOH 10%	0,637	76,245	72,628	90,12	0,9951
PEF + US90 EtOH 30%	0,581	49,325	74,951	85,49	0,9995
PEF + US90 EtOH 70%	0,544	33,508	64,477	70,98	0,9991

5. CONCLUSIONES

La cantidad total de betanina extraída de la remolacha roja se ve notablemente afectada por el tipo y la concentración de disolvente utilizado, la temperatura, el tiempo de extracción, y el método de extracción.

El análisis del rendimiento de la extracción (con agua como disolvente), demostró que el rendimiento aumentaba con el aumento de la temperatura, como suele ocurrir habitualmente en los procesos de extracción. El uso de USP supuso un incremento en el rendimiento a la temperatura de 45°C. En cambio, al aplicar un pretratamiento PEF, se minimizó el efecto de la temperatura, puesto que este pretratamiento consigue que aumente de forma general el rendimiento de la extracción, sin que el factor temperatura tenga la misma influencia que cuando no se aplica. Esto permitiría trabajar a nivel industrial a temperaturas más bajas, reduciendo el consumo energético y mejorando la calidad de los extractos.

Con relación al tipo de disolvente, se alcanzaron rendimientos similares con el empleo de etanol al 30 y al 70%, tanto en agitación, como en presencia de USP (potencias del 50 y 90% de la capacidad máxima del equipo). Por tanto, a nivel de proceso industrial, no valdría la pena superar un umbral de 30% de etanol en la extracción de betanina.

El uso de USP en el proceso de extracción resultó en un notable incremento del rendimiento en el caso de emplear etanol, incluso a la concentración mínima estudiada. Sin embargo, al utilizar agua como disolvente no se aprecia una gran influencia de la aplicación de USP.

Generalmente, la aplicación de un pretratamiento de pulsos eléctricos hizo que se mejorase notablemente la eficacia del proceso, debido a la electroporación de las células de la remolacha roja. A pesar de que se pudo observar un aumento generalizado del rendimiento de la

extracción, tanto en agitación como en extracción asistida mediante USP, los efectos más visibles se encontraron en el caso del agua y del EtOH 10%.

Las cinéticas de extracción, que se ajustaron adecuadamente mediante el modelo de Weibull, mostraron una mayor velocidad en la obtención de colorante durante los primeros 20 minutos, para posteriormente reducir la velocidad hasta llegar al valor máximo de la extracción (plateau).

Los pulsos eléctricos también originaron cambios en la textura, ya que, tras el tratamiento, el tejido vegetal se reblandeció significativamente, siendo mayor el reblandecimiento cuanto mayor fue la intensidad del tratamiento PEF.

Así pues, el uso de tratamiento PEF sería muy positivo a nivel industrial, ya que facilitaría en gran medida el triturado de la remolacha y aumentaría el rendimiento de la extracción. Adicionalmente el uso de USP permitiría mejorar la velocidad y el rendimiento final de los extractos obtenidos de muestras tratadas con PEF.

Dada la rapidez de tratamiento, la posibilidad de trabajar en continuo, la reducción en el consumo de disolvente y la facilidad de implantación en líneas de procesado ya existentes, el sistema de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) en combinación con USP podría llegar a ser una herramienta muy útil con vistas a una aplicación industrial.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AGCAM, E.; AKYILDIZ, A. & EVRENDILEK, G. A. (2014). Comparison of phenolic compounds of orange juice processed by pulsed electric fields (PEF) and conventional thermal pasteurisation. *Food Chemistry*, 143, 354-361.
- ALMEIDA, H. H.; BARROS, L.; BARREIRA, J. C.; CALHELHA, R. C.; HELENO, S. A.; SAYER, C.; MIRANDA, C. G.; LEIMANN, F. V.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. (2018). Bioactive evaluation and application of different formulations of the natural colorant curcumin (E100) in a hydrophilic matrix (yogurt). *Food Chemistry*, 261, 224-232.
- ALMOHAMMED, F.; MHEMDI, H.; GRIMI, N. & VOROBIEV, E. (2015). Alkaline Pressing of Electroporated Sugar Beet Tissue: Process Behavior and Qualitative Characteristics of Raw Juice. *Food and Bioprocess Technology*, 8(9), 1947-1957.
- AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H. & RUDA-KUCEROVA, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. 73, 914-922.
- BARBA, F.; PARNIAKOV, O.; PEREIRA, S.; WIKTOR, A.; GRIMI, N.; BOUSSETTA, N.; SARAIVA, J. A.; RASO, J.; MARTIN-BELLOSO, O.; WITROWA-RAJCHERT, D.; LEOVKA, N. & VOROBIEV, E. (2015). Current applications and new opportunities for use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77, 773-798.
- BEN AMMAR, J. (2011). *Etude de l'effet des champs electriques pulses sur la congelation des produits vegetaux*. Université de Technologie de Compiègne.
- BEVERIDGE, T. & HARRISON, J. E. (1986). Pear Juice Production from Heated Pear Mash. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 19(1), 12-16.
- BOBINAITÉ, R.; PATARO, G.; LAMANAUSKAS, N.; ŠATKAUSKAS, S.; VIŠKELIS, P. & FERRARI, G. (2015). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5898-5905.
- BRAUCH, J. E.; ZAPATA-PORRAS, S. P.; BUCHWEITZ, M.; ASCHOFF, J. K. & CARLE, R. (2016). Jagua blue derived from *Genipa americana* L. fruit: A natural alternative to commonly used blue food colorants? *Food Research International*, 81(1), 391-398.
- CARMONA, I. (2013). *De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), Fundación para la Innovación Agraria.
- CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P. & FERREIRA, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377-399.
- CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S. & ABERT-VIAN, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- CHEN, X.; DING, Y.; FORREST, B.; OH, J.; BOUSSERT, S. M. & HAMANN, M. T. (2019). Lemon yellow #15 a new highly stable, water soluble food colorant from the peel of Citrus limon. *Food Chemistry*, 270, 251-256.
- CHERNOMORDIK, L. V. (1992). Electropores in lipid bilayers and cell membranes. En D. Chang, B. Chassy, J. Saunders, & A. Sowers, *Guide to Electroporation and Electrofusion*. San Diego.
- CORZO, O. & BRACHO, N. (2009). Aplicación del modelo de Weibull normalizado en la deshidratación osmótica de láminas de sardina. *Revista Científica*, 19(4), 400-407.
- COULSON, J. M. & RICHARDSON, J. F. (2003). *Ingeniería Química: operaciones básicas*, 482-483.
- DALMAU, M. E.; BORNHORST, G. M.; EIM, V.; ROSSELLÓ, C. & SIMAL, S. (2017). Effects of freezing, freeze drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples. *Food Chemistry*, 215, 7-16.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ-APARICIO, A. R. & PAREDES-LÓPEZ, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains - Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.

- DONSÌ, F.; FERRARI, G. & PATARO, G. (2010). Applications of Pulsed Electric Field Treatments for the Enhancement of Mass Transfer from Vegetable Tissue. *Food Engineering Reviews*, 2(2), 109-130.
- ESATBEYOGLU, T.; WAGNER, A.; MOTAFAKKERAZAD, R.; NAKAJIMA, Y.; MATSUGO, S. & RIMBACH, G. (2014). Free radical scavenging and antioxidant activity of betanin: Electron spin resonance spectroscopy studies and studies in cultured cells. *Food and Chemical Toxicology*, 73, 119-126.
- ESCLAPEZ, M. D.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; MULET, A. & CÁRCEL, J. A. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120.
- FARR, R. S.; GOH, S. M. & YONG, F. Y. (2012). Use of the Weibull equation to approximate diffusive release from particles in a closed system. *Computers and Chemical Engineering*, 39, 33-40.
- FERNÁNDEZ, A.; SALMERÓN, C.; FERNÁNDEZ, P. S. & MARTÍNEZ, A. (1999). Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 158-162.
- FERRENTINO, G.; MOROZOVA, K.; MOSIBO, O. K.; RAMEZANI, M. & SCAMPICCHIO, M. (2018). Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction. *Journal of Cleaner Production*, 186, 253-261.
- FINCAN, M. & DEJMEK, P. (2003). Effect of osmotic pre-treatment and pulsed electric field on the viscoelastic properties of potato tissue. *Journal of Food Engineering*, 59(2-3), 169-175.
- GARCÍA-PÉREZ, J. V.; CÁRCEL, J. A.; BENEDITO, J. & MULET, A. (2007). Power Ultrasound Mass Transfer Enhancement in Food Drying. *Food and Bioprocesses Processing*, 85(3), 247-254.
- GIACOMETTI, J.; KOVAČEVIĆ, D. B.; PUTNIK, P.; GABRIC, D.; BILUŠIĆ, T.; KREŠIĆ, G.; STULIĆ, V.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. & JAMBRAK, A. R. (2018). Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. *Food Research International*, 113, 245-262.
- GLASER, R. W.; LEIKIN, S. L.; CHERNOMORDIK, L. V.; PASTUSHENKO, V. F. & SOKIRKO, A. L. (1988). Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica Biophysica Acta*, 940(2), 275-287.
- GLISZCZYŃSKA-SWIGLO, A.; SZYMUSIAK, H. & MALINOWSKA, P. (2006). Betanin, the main pigment of red beet - molecular origin of its exceptionally high free radical scavenging activity. *Food Additives and Contaminants*, 23(11), 1079-1087.
- GUDERJAN, M.; TÖPFL, S.; ANGERSBACH, A. & KNORR, D. (2005). Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Food Engineering*, 67, 281-287.
- HAN, D.; KIM, S. J.; KIM, S. H. & KIM, D. M. (1998). Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. *Journal of Food Science*, 63(1), 69-72.
- HEMWIMOL, S.; PAVASANT, P. & SHOTIPRUK, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*(13), 543-548.
- HENRY, B. S. (1992). *Natural food colours*. (J. D. Houghton, Ed.) Glasgow and London.
- HERBACH, K. M.; ROHE, M.; STINTZING, F. C. & CARLE, R. (2006). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 39(6), 667-677.
- HERBACH, K. M.; STINTZING, F. & CARLE, R. (2004). The impact of heating at 85°C during 8 h on overall color and. *Journal of Food Science*, 69(6), C491-C498.
- HUANG, K.; YU, L.; WANG, W.; GAI, L. & WANG, J. (2014). Comparing the pulsed electric field resistance of the microorganisms in grape juice: Application of the Weibull model. *Food Control*, 35(1), 241-251.
- INGUGLIA, E. S.; TIWARI, B. K.; KERRY, J. P.; & BURGESS, C. M. (2018). Effects of high intensity ultrasound on the inactivation profiles of *Escherichia coli* K12 and *Listeria innocua* with salt and salt replacers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 492-498.

- JEMAI, A. B. (2006). Pulsed electric field assisted pressing of sugar beet slices: Towards a novel process of cold juice extraction. *Biosystems Engineering*, 93(1), 57-68.
- KANNER, J.; HAREL, S. & GRANIT, R. (2001). Betalains - A new class of dietary cationized antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5178 - 5185.
- KHAN, M. (2016). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, 197, 1280-1285.
- KOTNIK, T.; KRAMAR, P.; PUCIHAR, G. & MIKLAVČIČ, D. (2012). Cell Membrane Electroporation - Part 1: The Phenomenon. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, 28(5), 14-23.
- LEBOVKA, N. I.; BAZHAL, M. I. & VOROBIEV, E. (2000). Simulation and experimental investigation of food material breakage using pulsed electric field treatment. *Journal of Food Engineering*, 44, 213-223.
- LEBOVKA, N.; PRAPORSIC, I. & VOROBIEV, E. (2004). Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatment on textural properties of carrots, potatoes and apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 9-16.
- LECHNER, J.; WANG, L.; ROCHA, C.; LARUE, B.; HENRY, C.; MCINTYRE, C.; RIEDL, K.M.; SCHWARTZ, S.J. & STONER, G. (2010). Drinking water with red beetroot food color antagonizes esophageal carcinogenesis in N-nitrosomethylbenzylamine-treated rats. *Journal of Medicinal Food*, 13(3), 733-739.
- LEONG, S. Y.; RICHTER, L.; KNORR, D. & OEY, I. (2014). Feasibility of using pulsed electric field processing to inactivate enzymes and reduce the cutting force of carrot (*Daucus carota* var. Nantes). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 26, 159-167.
- LI, B. B.; SMITH, B. & HOSSAIN, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels; I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188.
- LOGINOVA, K.; LEBOVKA, N. & VOROBIEV, E. (2011). Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet. *Journal of Food Engineering*, 106, 127-133.
- LUO, Y.; PENG, B.; LIU, Y.; WU, Y. & WU, Z. (2018). Ultrasound extraction of polysaccharides from guava leaves and their antioxidant and antiglycation activity. *Process Biochemistry*, 73, 228-234.
- LÓPEZ, N.; PUÉRTOLAS, E.; CONDÓN, S.; RASO, J. & ÁLVAREZ, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 90, 60-66.
- MARTÍN-BELLOSO, O.; KNORR, D.; BALASA, A. & SOLIVA-FORTUNY, R. (2009). Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20(11-12), 544-556.
- MARTINS, F.; SENTANIN, M. & DE SOUZA, D. (2019). Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry*, 272, 732-750.
- MARTINS, N.; LOBO RORIZ, C.; MORALES, P.; BARROS, L. & FERREIRA, I. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agroindustries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1-15.
- MASON, T. J.; CHEMAT, F. & ASHOKKUMAR, M. (2014). *Power ultrasonics for food processing*.
- MESTDAGH, F.; DAVIDEK, T.; CHAUMONTEUIL, M.; FOLMER, B. & BLANK, I. (2014). The kinetics of coffee aroma extraction. *Food Research International*, 63, 271-274.
- MIKLAVČIČ, D. (2017). Pulsed Electric Field Treatment for Fruit and Vegetable Processing. *Handbook of Electroporation*, 1-4.
- MIKOVA, K. & KYZLINK, V. (1985). Effect of glucose oxidase on the color stability of red beet concentrate. *Chemical Technology*, 58, 9-15.
- MORALES-DE LA PEÑA, M.; SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, M. & MARTIN-BELLOSO, O. (2010). Isoflavone profile of a high intensity pulsed electric field or thermally treated fruit juice-soymilk beverage stored under refrigeration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 604-610.
- MSAGATI, T. A. (2013). *Chemistry of Food Additives and Preservatives*. Wiley-Blackwell.
- NEELWARNE, B. (2012). *Red beet biotechnology: Food and pharmaceutical applications*.

- NILSSON, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rubra* L.). *Lantbrukshoegskolans Annaler*, 179-219.
- PASCH, J. H. & VON ELBE, J. H. (1979). Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. *Journal of Food Science*, 44(1), 72-75.
- PATARÓ, G.; CARULLO, D.; BAKAR SIDDIQUE, A. B.; FALCONE, M.; DONSI, F. & FERRARI, G. (2018). Improved extractability of carotenoids from tomato peels as side benefits of PEF treatment of tomato fruit for more energy-efficient steam-assisted peeling. *Food Engineering*, 233, 65-73.
- PIATELLI, M. & MINALE, L. (1981). The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *Academic Press*, 17, 557-575.
- PRAKASH MARAN, J. & PRIYA, B. (2016). Multivariate statistical analysis and optimization of ultrasound-assisted extraction of natural pigments from waste red beet stalks. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 792-799.
- RASO, J. & HEINZ, V. (2006). *Pulsed electric field technology for the food industry*. Springer.
- RASO, J.; LUENGO, E. & ÁLVAREZ, I. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric field. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 79-84.
- RASO, J.; PUÉRTOLAS, E. & ALVAREZ, I. (2010). Los pulsos eléctricos de alto voltaje: una alternativa para mejorar la extracción fenólica en la elaboración del vino tinto. *Acenología*, 118.
- RAVICHANDRAN, K.; THAW SAW, N.; MOHDALY, A.; GABR, A.; KASTELL, A.; RIEDEL, H.; CAI, Z.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International*, 50, 670-675.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20-26.
- RUESGAS-RAMÓN, M.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C. & DURAND, E. (2017). Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3591-3601.
- SÁNCHEZ JUAN, R. (2013). La química del color en los alimentos. *Química Viva*, 12(3), 234-246.
- SETFORD, P. C.; JEFFERY, D. W.; GRBIN, P. R. & MUHLACK, R. A. (2017). Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 106-117.
- SIVAKUMAR, V.; LAKSHMI, J.; VIJAYESWARRI, J. & SWAMINATHAN, G. (2009). Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 782-789.
- SPENCE, C. (2015). On the psychological impact of food colour. *Spence Flavour*, 4(1), 4-21.
- SPENCE, C.; LEVITAN, C. A.; SHANKAR, M. U. & ZAMPINI, M. (2010). Does Food Color Influence Taste and Flavor Perception in Humans? *Chemosensory Perception*, 3, 68-84.
- STRUGNELL, C. (1997). Colour and its role in sweetness perception. *Appetite*, 28-85.
- TOEPFL, S. & KNORR, D. (2006). Pulsed electric fields as a pretreatment technique in drying processes. *Stewart Postharvest Review*, 2(4), 1-6.
- UE. (2008). *Reglamento EC 1333/2008*.
- VOROBIEV, E. & LBOVKA, N. (2010). Enhanced Extraction from Solid Foods and Biosuspensions by Pulsed Electrical Energy. *Food Engineering Reviews*, 2(2), 95-108.
- VOROBIEV, E. & LBOVKA, N. I. (2006). Extraction of Intercellular Components by Pulsed Electric Fields. Ed. J. Raso, & H. Volker, *Pulsed Electric Field Technology for the Food Industry. Fundamentals and Applications*, 153-194.
- WANG, J.; YANG, X.; MUJUMDAR, A. S.; FANG, X.; ZHANG, Q.; ZHENG, Z.; GAO, Z.; XIAO, H. (2018). Effects of high-humidity hot air impingement blanching (HHAIB) pretreatment on the change of antioxidant capacity, the degradation kinetics of red pigment, ascorbic acid in dehydrated red peppers during storage. *Food Chemistry*, 259, 65-72.

- WANG, W. & SASTRY, S. K. (2002). Effects of moderate electrothermal treatments on juice yield from cellular tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(4), 371-377.
- WIKTOR, A.; GONDEK, E.; JAKUBCZYK, E.; DADAN, M.; NOWACKA, M.; RYBAK, K. & WITROWA-RAJCHERT, D. (2018). Acoustic and mechanical properties of carrot tissue treated by pulsed electric field, ultrasound and combination of both. *Journal of Food Engineering*, 238, 12-21.
- XU, B.; ZHANG, M. & MA, H. (2017). Food Freezing Assisted With Ultrasound. En D. Bermudez Aguirre, *Ultrasound. Advanced in food processing and preservation*. Academic Press. 293-321.
- YILDIZ, G.; RABABAH, T. M. & FENG, H. (2016). Ultrasound-assisted cutting of cheddar, mozzarella and Swiss cheeses - Effects on quality attributes during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 1-9.
- ZHANG, Q.; PAN, J.; WANG, Y.; LUBET, R. & YOU, M. (2012). Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate- and benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Molecular carcinogenesis*, 52(9), 686-691.
- ZOU, Y.; XIE, C.; FAN, G.; GU, Z. & HAN, Y. (2010). Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 611-615.