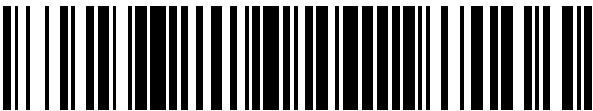


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 137**

21 Número de solicitud: 202430760

51 Int. Cl.:

A23L 5/43 (2006.01)
C09B 61/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:
25.09.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:
28.11.2024

71 Solicitantes:
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)
Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:
**MORALES GÓMEZ, Patricia;
NIÑO VEGA, Erika Maryori;
FERNÁNDEZ RUIZ, Virginia y
CÁMARA HURTADO, María De La Montaña**

54 Título: **Composición colorante basada en antocianinas procedentes de frutos silvestres, método de preparación y usos**

57 Resumen:
Composición colorante basada en antocianinas procedentes de frutos silvestres, método de preparación y usos.
La presente invención se refiere a una composición colorante basada en antocianinas que comprende un extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L., así como al método de preparación de composiciones colorantes basadas en antocianinas, y a la composición colorante obtenida mediante dicho método. Adicionalmente, la presente invención se refiere a los usos de dicha composición colorante como colorante alimentario, y opcionalmente también como agente conservante y como agente antioxidante, así como a productos alimentarios que comprenden dicha composición colorante.

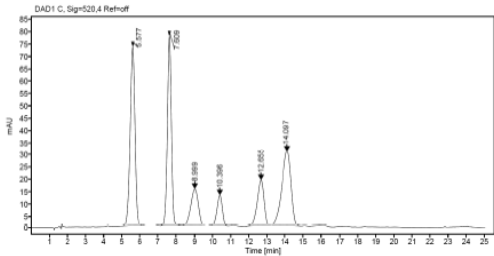


Figura 1

DESCRIPCIÓN

Composición colorante basada en antocianinas procedentes de frutos silvestres, método de preparación y usos

5

Campo técnico

La presente invención se engloba dentro del campo técnico de los colorantes, en particular de los colorantes alimentarios, así como también, por las posibles aplicaciones de las composiciones colorantes de la presente invención, dentro del campo técnico de los conservantes y antioxidantes alimentarios.

10

Antecedentes de la invención

En la industria alimentaria es común el uso de diferentes aditivos alimentarios - en su mayoría de origen sintético - en la formulación de alimentos con el objeto de garantizar unas propiedades organolépticas adecuadas y conforme a los estándares de los consumidores (*e.g.*, colorantes), garantizar la calidad higiénico-sanitaria (*e.g.*, conservantes con propiedades antimicrobianas), evitar alteraciones debidas a procesos de oxidación (*e.g.*, antioxidantes), etc. a lo largo de toda la vida útil de dichos alimentos, además de intentar prolongar dicha vida útil lo máximo posible para reducir el desperdicio alimentario.

20

Todos los aditivos alimentarios autorizados que figuran en la lista positiva de aditivos del Reglamento (UE) n° 1129/2011 son seguros, siempre y cuando se utilicen conforme a la normativa vigente, y se someten a reevaluaciones periódicas por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Sin embargo, numerosos aditivos sintéticos presentan cierta controversia, como es el caso de los colorantes azoicos y de algunos conservantes y antioxidantes sintéticos.

25

Los colorantes azoicos han sido objeto de muchos estudios, siendo uno de los más controvertidos el denominado "The Southampton Study", en el cual se administró a un grupo de niños, de 3 a 9 años, una combinación de colorantes alimentarios y benzoato sódico mezclados con la comida. Cuando se compararon los patrones de comportamiento de esos niños frente a un grupo placebo, se encontraron evidencias claras de síntomas asociados al déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en el grupo de niños que habían consumido dichos colorantes. Tal es la repercusión para la salud que pueden tener el consumo de estos colorantes en niños, que en el 2008 el Parlamento Europeo aprobó el Reglamento (CE) n° 1333/2008 señalando que se deberá indicar claramente los posibles efectos negativos sobre la actividad y atención de las niños en el etiquetado, junto al nombre o número E de cada colorante listado en dicho Reglamento, entre las que se incluyen las siguientes: tartrazina (E-102); amarillo de quinoleína (E- 104); amarillo anaranjado (E-110); camoisina (E-122); Ponceau 4R, rojo de cochinilla A (E-124); rojo Allura AC (E-129).

30

35

40

Son muchos los efectos adversos y/o contraindicaciones conocidas derivados del uso de estos colorantes alimentarios. Por ejemplo, la tartrazina (*i.e.*, E-102; ingesta diaria admitida (IDA) de 7,5 mg/kg peso corporal), conocida en Estados Unidos como "FD & C Yellow N° 5", se ha relacionado con casos de urticaria, lesiones purpúricas, anafilaxia, etc. El colorante amarillo anaranjado (*i.e.*, E-110; IDA de 2,5 mg/kg peso corporal), conocido en Estados Unidos como "FD & C Yellow N° 6", también se ha relacionado con la genotoxicidad en modelos murinos, con déficit de aprendizaje en la descendencia, así como con efectos inmunomoduladores y xenoestrogénicos. El rojo Allura AC (*i.e.*, E-129; IDA de 7 mg/kg peso corporal), conocido en Estados Unidos como "FD & C Red No. 40", ha sido reevaluado en la Unión Europea dos veces,

45

50

concluyendo que existe la posibilidad de que pueda ser genotóxico a dosis elevadas. La carmoisina (*i.e.*, E-122; IDA de 4 mg/kg peso corporal) es un colorante cuyo uso está prohibido en los Estados Unidos.

- 5 Por otro lado, la eritrosina (*i.e.*, E-127; IDA de 0,1 mg/kg peso corporal), que es un colorante sintético poliyodado de xanteno conocido en Estados Unidos como “FD & C Red No. 3”, y que se obtiene por yodación de la fluoresceína - un colorante prohibido en la Unión Europea -, se ha relacionado con alteraciones en el comportamiento infantil y la función tiroidea debido al alto contenido de yodo.

10 También existen otros colorantes ampliamente utilizados en alimentos de uso infantil pertenecientes al grupo de las colorantes azules derivados del triarilmetano, tales como azul patente V (*i.e.*, E-131; IDA de 1 mg/kg peso corporal), azul brillante FCF (*i.e.*, E-133; IDA de 6 mg/kg peso corporal), conocido en los Estados Unidos como “FD & C Blue No. 1”, verde S (*i.e.*,
15 E-142; IDA 5 mg/kg peso corporal), verde rápido (*i.e.*, E-143; IDA de 12,5 mg/kg peso corporal), o brillante negro (*i.e.*, E-151; IDA de 1 mg/kg peso corporal), que se utilizan ampliamente en la elaboración de golosinas, confituras, mermeladas, jaleas y helados y requieren un control especial debido a los posibles efectos adversos que pueden causar en la población, en particular, en la población infantil.

20 Otros ejemplos de aditivos que están sujetos a control son los aditivos antioxidantes BHA (*i.e.*, E-320) o BHT (*i.e.*, E-321), ambos aditivos antioxidantes sintéticos. El BHA es un antioxidante compuesto por dos isómeros (2-tert-butil-4-hidroxianisol y 3-tert-butil-4- hidroxianisol) que se puede utilizar en muchos alimentos, cuya IDA es de 1 mg/kg peso corporal. El BHT es un
25 antioxidante liposoluble que se puede utilizar solo o en combinación con el BHA, y presenta una IDA de 0,5 mg/kg peso corporal. La EFSA estableció dichos valores de IDA en base a estudios realizados en roedores que ponían de manifiesto que el consumo de elevadas concentraciones de estos compuestos podía dar lugar a hiperplasia del preestómago, retraso del crecimiento, el aumento de la mortalidad y ciertos efectos en el comportamiento de las crías de rata.

30 También existen ciertas limitaciones de cantidad de aditivos conservantes en alimentos, como es el caso del ácido sórbico y sus sorbatos (*e.g.*, E-200), cuyo potencial tóxico radica no tanto en el compuesto como tal, sino en sus productos de transformación una vez se ha incorporado en el alimento (*e.g.*, reacción entre ácido sórbico y nitritos y/o sulfitos, dando compuestos con
35 actividad mutagénica). Por otro lado, las cantidades de ácido benzoico y benzoatos (*i.e.*, E-210) también están limitadas a una IDA de 5 mg/kg, teniendo en cuenta que pueden favorecer la presencia de compuestos bencénicos. Por último, los sulfitos (*i.e.*, E-220 a E-228) son aditivos ampliamente utilizados en la industria alimentaria, pero se encuentran en la lista de alérgenos de obligada declaración en el etiquetado de los alimentos, debido a que pueden ocasionar
40 problemas en personas sensibles, asmáticas, etc.

En este contexto, resulta evidente la necesidad de proporcionar nuevos aditivos o composiciones colorantes de origen natural que no supongan un riesgo para la salud, sin detrimento de la calidad organoléptica e higiénico-sanitaria de los alimentos. Además, existe una demanda creciente en
45 la sociedad de alimentos cada vez más naturales, que no contengan aditivos alimentarios tales como colorantes, conservantes y antioxidantes o bien, en caso de contenerlos, que estos sean de origen natural.

Además, la industria alimentaria ha de recurrir al uso de dos o más aditivos alimentarios en la
50 formulación de muchos alimentos para garantizar su calidad higiénico-sanitaria (uso de antimicrobianos), calidad organoléptica (uso de colorantes alimentarios y de aditivos antioxidantes) y poder comercializar alimentos duraderos, seguros y apetecibles para el

consumidor. Hoy en día, existen en el mercado diferentes aditivos alimentarios de origen natural que se podrían incorporar en la formulación de alimentos, como es el caso de antioxidantes (e.g., ácido ascórbico, tocoferoles, extracto de romero), antimicrobianos (e.g., niacina) o colorantes con tonalidades rojas - violáceas (e.g., E-120 - Carmín, E-163 - antocianinas), aunque su uso no está autorizado para ser incorporado en todos los alimentos ni tampoco en cualquier concentración.

Sin embargo, no existe ningún ingrediente que pueda suplir por sí solo la función de los aditivos colorantes, antioxidantes y conservantes. Por otro lado, también es importante resaltar que hoy día la industria alimentaria a día de hoy no ha conseguido formular alimentos con coloración magenta - morada sin el uso de colorantes artificiales, especialmente en alimentos con un rango de pH donde las antocianinas (E 163) presentan coloración rojiza (e.g. pH 3 - 4). Esto supone un hándicap importante para la industria alimentaria, ya que hoy en día los consumidores reclaman alimentos más naturales y por lo tanto carentes de colorantes artificiales en su formulación. La presente invención comprende la obtención y aplicación de una composición natural, no descrita con anterioridad, donde su composición química y propiedades físico-químicas le confiere sin recurrir al uso de los colorantes tipo azoicos, autorizados según la normativa vigente, conseguir en alimentos con pH ácidos (pH 3 - 4) unas características cromáticas actualmente disponible en el mercado, en lo referente a la gama de los morados- magentas.

Hasta la fecha se han investigado diferentes frutos en búsqueda de la obtención de posibles fuentes colorantes, como ha sido el caso de frutos como *Crataegus monogyna* Jacq., *Sorbus aria* L., *Prunus avium* L., *Fragaria vesca* L. y *Vaccinium myrtillus* L., habiéndose reportado su perfil antociánico, sus características de color y algunas de sus propiedades bioactivas como antioxidante, antibacteriano y antifúngico, evidenciando el potencial de estos frutos para ser usados como fuentes de colorantes naturales en el desarrollo de productos alimenticios más saludables (Dias *et al.*, *Food & Function* **2016**, 7, 4523; Vega *et al.*, *Food Chemistry* **2023**, 414, 135669; Tamayo-Vives *et al.*, *Foods* **2023**, 12, 2427.).

Respecto a *Barberis vulgaris* L., hoy en día se le conoce por el uso de la berberina, un alcaloide natural presente en altas cantidades en esta planta, especialmente en sus tallos y raíces, que ha mostrado tener un amplio uso en el tratamiento de estrés oxidativo hepático, Alzheimer, infertilidad idiopática por factor masculino, pérdida de peso, prevención de diabetes y problemas cardiovasculares (Fatehi-Hassanabad *et al.*, *Journal of ethnopharmacology* **2005**, 102(1), 46-52; Fatehi *et al.*, *An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* **2005**, 19(3), 222-225; Abd El-Wahab *et al.*, *BMC complementary and alternative medicine* **2013**, 13, 1-12). EP2007429 también describe composiciones para administración oral con efectos beneficiosos a nivel cardiovascular, que comprenden berberina o extractos que la contienen, entre otros ingredientes. Lo mismo sucede con EP3406144, basada en composiciones que contienen cloruro de berberina, entre otros ingredientes, en forma oral, para el uso en el control de la hiperlipidemia y de los factores de riesgo cardiovasculares. Sin embargo, este alcaloide carece de actividad colorante, por lo que no resulta adecuado para reemplazar a los colorantes sintéticos arriba mencionados. Por otro lado, en la patente WO2010109286A1, se describe un preparado cristalino no higroscópico rico en compuestos fenólicos coloreados obtenidos a partir de plantas para su uso en bebidas, en el cual se menciona una serie de especies botánicas entre las que se encuentra *Berberis* spp. Sin embargo, no se menciona la combinación de estas especies entre sí para la obtención del preparado ni se incluye la especie botánica de *Myrtus* spp. en la descripción de la invención.

Por otro lado, se conoce la composición de la planta de *Myrtus communis* L. en términos de compuestos bioactivos (Messaoud y Boussaid, *Chemistry & biodiversity* **2011**, 8(2), 300-310) y antocianinas (Maldini, *Phytochemical Analysis* **2011**, 27(5), 249-256), así como su uso en el tratamiento de distintas enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales, dermatológicas o neurológicas, a través de varios estudios centrados principalmente en aceites esenciales

extraídos de la planta, en su mayoría de sus hojas. En particular, existen diferentes publicaciones referentes a la mircetina, presente principalmente en las hojas y raíces de las plantas pertenecientes a la familia *Myrtus*, con gran potencial terapéutico contra el cáncer, lesiones hepáticas, enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes y osteoporosis (Imran *et al. Food science & nutrition* **2021**, 9(10), 5854-5868). Sin embargo, la mircetina también es un alcaloide que carece de actividad colorante, por lo que tampoco resulta de interés para reemplazar a los colorantes sintéticos existentes. Por último, mencionar que en las patentes US2013281548A1 y US2008255226A1, se describe una composición de extractos de antocianinas de origen vegetal, en la cual se emplea almidón como vehículo comestible, o se emplea la cisteína para mejorar su biodisponibilidad, respectivamente. Si bien presentan una lista de posibles frutos a usar para la obtención de las antocianinas, como *Myrtus communis* L., no se incluyen en los ejemplos ni en las reivindicaciones, ni el uso combinado de *Myrtus communis* junto con *Berberis vulgaris*.

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto, se proporciona una composición colorante basada en antocianinas que comprende un extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L.

La expresión “basada en antocianinas”, referida a las composiciones colorantes de la invención, significa que dichas composiciones colorantes comprenden antocianinas, preferiblemente antocianinas de origen natural.

La expresión “fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L.”, en el contexto de la presente invención, se refiere al fruto maduro sin semillas de *Berberis vulgaris* L. Se entiende por “fruto maduro de *Berberis vulgaris* L.” aquel fruto de *Berberis vulgaris* L. en un estado óptimo de maduración, es decir, aquel fruto que presenta un valor de grados Brix (°Brix) comprendido entre 9 y 20° Brix, preferiblemente entre 11 y 18° Brix, en donde estos valores de la escala Brix se pueden determinar mediante cualquier método conocido, aunque, preferiblemente, se determinan utilizando un refractómetro Atago a 20 °C según el método oficial 932.14C, AOAC, 2005. En el contexto de la presente invención, se utilizan las expresiones “fruto desprovisto de semillas” y “fruto sin semillas” de forma totalmente intercambiable. Además, en el contexto de la presente invención, se considera que el término “fruto” incluye uno o más frutos.

La expresión “piel del fruto de *Myrtus communis* L.”, en el contexto de la presente invención, se refiere a la piel del fruto maduro de *Myrtus communis* L. Se entiende por “fruto maduro de *Myrtus communis* L.” aquel fruto de *Myrtus communis* L. en un estado óptimo de maduración, es decir, aquel fruto que presenta un valor de grados Brix (°Brix) comprendido entre 5 y 11° Brix, preferiblemente entre 6 y 9° Brix, en donde estos valores de la escala Brix se pueden determinar mediante cualquier método conocido, aunque, preferiblemente, se determinan utilizando un refractómetro Atago a 20 °C según el método oficial 932.14C, AOAC, 2005.

Como ya se ha indicado, en la actualidad no existe ningún ingrediente que pueda suplir por sí solo la función de los aditivos colorantes, antioxidantes y conservantes. Este es un problema existente en el estado de la técnica que han conseguido solucionar los inventores mediante las composiciones colorantes basada en antocianinas de la presente invención procedente de los efectos inesperados derivados de la combinación de extractos específicos de estas plantas. Estas composiciones, que comprenden extractos de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y piel del fruto de *Myrtus communis* L. son, además, particularmente adecuadas para uso alimentario y consiguen evitar de forma satisfactoria la necesidad de utilizar múltiples aditivos sintéticos en los productos alimentarios, puesto que presentan capacidad colorante y, además, también capacidad conservante (e.g., antimicrobiana y antifúngica) y antioxidante. Respecto a la

capacidad antimicrobiana, estas composiciones inhiben de forma significativa el crecimiento de bacterias patógenas de transmisión alimentaria (e.g. *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, entre otras) y hongos tipo *Aspergillus*. Respecto a la capacidad antioxidante, las composiciones de la presente invención inhiben significativamente los procesos oxidativos en el alimento a través de diferentes mecanismos de acción, e.g. secuestrando de radicales libres, inhibiendo su generación o propagación (estrés oxidativo) o inhibiendo enzimas generadoras de radicales libres (como, por ejemplo, la polifenoloxidasas o la lipooxigenasa).

Por otro lado, respecto a la capacidad colorante, las composiciones de la presente invención aportan de manera ventajosa, coloración con tonalidades desde el rojo hasta el magenta, con un perfil cromático característico y reconocible, debido al efecto sinérgico de ambos extractos, a la vez que presentan un perfil de seguridad apto para su uso como colorante alimentario, incluso para colorante alimentario en productos alimentarios destinados a poblaciones especialmente sensibles a los problemas conocidos derivados del uso de colorantes artificiales, tales como la población infantil. Además, de manera particular, las composiciones colorantes de la presente invención consiguen aportar una tonalidad magenta o morada estable cuando se utilizan en entornos con un pH de entre 3,0 y 6,0, más particularmente, de 3,0 - 3,5 o 5,5 - 6,0, tal como una matriz alimenticia con un pH comprendido dentro de esos rangos, que soluciona el vacío existente en el mercado en cuanto a aditivos colorantes naturales que puedan aportar esta coloración específica, propia de los frutos del bosque, sin requerir el uso de colorantes sintéticos. Es decir, de forma particularmente ventajosa, las composiciones colorantes basadas en antocianinas de la presente invención presentan una capacidad colorante que se mantiene estable dentro de un rango de pH superior al proporcionado por los colorantes comerciales disponibles actualmente, y suponen una alternativa natural para el uso en formulaciones de alimentos, que permite obtener la gama de color deseada sin necesidad de recurrir al uso de colorantes artificiales tales como los colorantes azoicos.

Berberis vulgaris L. es un arbusto espinoso con madera y flores amarillas, cuyos frutos son pequeñas bayas oblongas que se tornan rojizas al madurar. Los extractos del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. empleados en el contexto de la presente invención típicamente incluyen una pluralidad de antocianinas que pueden estar seleccionadas, de forma no limitativa, entre dos o más de delfinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-glucósido, pelargonidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-glucósido y malvidina-O-deoxihexosil-pentósido.

Myrtus communis L. es un arbusto con hojas aromáticas y flores blancas y sus frutos presentan habitualmente un tamaño de hasta 1 cm y un color negro azulado. Los extractos de frutos sin semillas de *Myrtus communis* L. empleados en el contexto de la presente invención típicamente incluyen una pluralidad de antocianinas que pueden estar seleccionadas, de forma no limitativa, entre dos o más de delfinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-glucósido, malvidina-O-dihexósido, malvidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-pentosido y malvidina-O-deoxihexosil-pentósido.

Estas especies botánicas son dos especies silvestres endémicas de la península ibérica. Para la presente invención, se recogieron muestras de *Berberis vulgaris* L. en la Serranía de Cuenca (Carrascosa, Cuenca) y Beteta (Cuenca), y de *Myrtus communis* L. en el Parque Natural de l'Albufera (Valencia) y Paratge Natural Municipal de la Sierra de la Murta (Alcira). Para acceder a estos recursos fitogenéticos se obtuvo, en un primer momento, permiso de acceso a recursos fitogenéticos con fines de investigación no comercial (referencias PN-NC_032021 y PN-NC_022022, que se corresponden con ABSCH-IRCC-ES-257749-1 y ABSCH-IRCC-ES-262067-1, respectivamente) y posteriormente, permiso de acceso con fines comerciales previa firma de sendos acuerdos para obtener el consentimiento previo informado y establecer las

condiciones mutuamente acordadas con la Generalitat Valenciana y con el Gobierno de Castilla-La Mancha.

En una realización, la composición colorante puede comprender una cantidad del extracto de frutos sin semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición, más preferiblemente, una cantidad del extracto de fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 45 % y un 55 % en peso, respecto al peso total de la composición. En otra realización, la composición colorante puede comprender una cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición, más preferiblemente, una cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 45 % y un 55 % en peso, respecto al peso total de la composición. En particular, la composición colorante puede comprender una cantidad del extracto del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición y/o una cantidad de dicho extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición. Resulta evidente, además, que la suma de las cantidades en peso de los extractos del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. y de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendidas por una cualquiera de estas composiciones colorantes de la invención no superara en ningún caso el 100 % en peso respecto al peso total de la composición colorante.

La composición colorante puede estar en forma líquida (e.g., en forma de solución hidroalcohólica) o en forma de polvo liofilizado. En una realización preferida, la composición colorante puede estar en forma de polvo liofilizado, más preferiblemente, en forma de polvo liofilizado encapsulado, y todavía más preferiblemente, en forma de polvo liofilizado microencapsulado.

En una realización particular, la composición colorante puede estar en forma de polvo liofilizado y comprender, además, un agente encapsulante. Los ejemplos de agente encapsulante incluyen, de forma no limitativa, una maltodextrina o una ciclodextrina.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método de preparación de una composición colorante basada en antocianinas, más preferiblemente, un método de preparación de una composición colorante basada en antocianinas de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Dicho proceso comprende las siguientes etapas:

- a) someter al menos una porción del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. a extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L.,
- b) someter al menos una porción de piel del fruto de *Myrtus communis* L. a un tratamiento de extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L., y
- c) mezclar una cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de la etapa a) y una cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. resultante de la etapa b).

En la etapa a) del proceso, al menos una porción del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. (i.e., piel del fruto maduro de *Berberis vulgaris* L.) se somete a extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. En una realización preferida, dicha extracción hidroalcohólica se lleva a cabo preferiblemente con sonda de ultrasonidos. Dicha extracción con sonda de ultrasonidos se puede realizar, por

ejemplo, mediante un equipo procesador de ultrasonidos, tal como el equipo Fisherbrand™ Model 705 Sonic Dismembrator, preferiblemente a una potencia de ultrasonidos de 325 W - 375 W. En otra realización, dicha extracción hidroalcohólica de la etapa a) se puede llevar a cabo con una proporción (sólido/líquido, S/L) de dicha porción del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. (sólido) respecto a disolvente hidroalcohólico (líquido) de entre 20 g/L y 28 g/L. De manera particularmente preferida, dicha extracción hidroalcohólica de la etapa a) del proceso de la invención se lleva a cabo en un medio hidroalcohólico (e.g., un medio formado por etanol y agua) que proporciona un pH ácido, más preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 2 y 4, todavía más preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 3,0 y 3,5. Estos valores de pH se pueden conseguir preferiblemente por acidificación del medio con ácido cítrico, p.ej. con ácido cítrico 5 M.

En una realización particular, en la etapa a) del proceso, al menos una porción de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. (i.e., piel del fruto maduro de *Berberis vulgaris* L.) se somete a extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L., en donde dicha extracción hidroalcohólica se lleva a cabo preferiblemente con sonda de ultrasonidos, con una proporción (sólido/líquido, S/L) de dicha porción del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. (sólido) respecto a disolvente hidroalcohólico (líquido) de entre 20 g/L y 28 g/L y/o, opcionalmente, en un medio hidroalcohólico (e.g., un medio formado por etanol y agua) que proporciona un pH ácido, más preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 2 y 4, todavía más preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 3,0 y 3,5. Estos valores de pH se pueden conseguir preferiblemente por acidificación del medio con ácido cítrico, p.ej. con ácido cítrico 5 M.

En la etapa b) del proceso, al menos una porción de piel de *Myrtus communis* L. (i.e., piel del fruto maduro de *Myrtus communis* L.) se somete a extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. En una realización preferida, dicha extracción hidroalcohólica se lleva a cabo preferiblemente con sonda de ultrasonidos. Dicha extracción con sonda de ultrasonidos se puede realizar, por ejemplo, con un equipo procesador de ultrasonidos, tal como el equipo Fisherbrand™ Model 705 Sonic Dismembrator, preferiblemente a una potencia de ultrasonidos de aproximadamente 450 W - 500 W, más preferiblemente, aproximadamente 500 W. En otra realización, dicha extracción hidroalcohólica de la etapa b) se lleva a cabo con una proporción (sólido/líquido, S/L) de dicha piel del fruto de *Myrtus communis* L. (sólido) respecto a disolvente hidroalcohólico (líquido) de entre 18 g/L y 22 g/L, más preferiblemente, entre 18,5 g/L y 21,0 g/L. De manera particularmente preferida, dicha extracción hidroalcohólica de la etapa b) del proceso de la invención se lleva a cabo en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 5 y 7, preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH de aproximadamente 6. En una realización particular, dicha extracción hidroalcohólica de la etapa a) del proceso de la invención se lleva a cabo en un medio formado por etanol y agua que proporciona un pH comprendido entre 5 y 7, más preferiblemente en un medio formado por etanol y agua que proporciona un pH de aproximadamente 6.

Se entiende que la expresión “aproximadamente”, cuando precede y se refiere a un valor numérico, en el contexto de la presente invención, divulga ese valor numérico en particular y, además designa cualquier valor comprendido dentro de un rango formado por ese valor numérico $\pm 5\%$, más preferiblemente un rango definido por el valor numérico $\pm 2\%$. A modo de ilustración, se debe interpretar la expresión “aproximadamente 1” como “dentro del rango comprendido entre 0,95 y 1,05”, preferiblemente, “dentro del rango comprendido entre 0,98 y 1,02”.

Se entiende que la expresión “rango comprendido entre”, en el contexto de la presente invención, comprende tanto los valores numéricos comprendidos entre los dos valores numéricos presentes en los dos extremos del rango como los propios dos valores numéricos que forman cada uno de los dos extremos en sí mismos, salvo que se indique lo contrario. Es decir, se debe interpretar, por ejemplo, que “dentro del rango comprendido entre 0,95 y 1,05” incluye tanto los valores incluidos dentro del rango formado por el valor máximo de 1,05 y el valor mínimo de 0,95, como 1,05 y 0,95 específicamente.

En una realización particular, en la etapa b) del proceso, al menos una porción de piel del fruto de *Myrtus communis* L. (i.e., piel del fruto maduro de *Myrtus communis* L.) se somete a extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L., en donde dicha extracción hidroalcohólica se lleva a cabo preferiblemente con sonda de ultrasonidos, con una proporción sólido/líquido (S/L) de dicha piel del fruto de *Myrtus communis* L. (sólido) respecto a disolvente hidroalcohólico (líquido) de entre 18 g/L y 20 g/L y/o, opcionalmente, en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 5 y 7, más preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH de aproximadamente 6.

El proceso de acuerdo con este segundo aspecto de la invención puede comprender, además, opcionalmente, antes de la etapa a) y/o la etapa b), someter dicha porción del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y/o dicha porción de piel del fruto de *Myrtus communis* L., respectivamente, a una etapa de liofilización.

La etapa a) y la etapa b) del proceso de la invención se basan en el uso del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y la piel del fruto de *Myrtus communis* L. Dicho material vegetal se puede obtener a partir del fruto de cada uno de estos dos arbustos por medios conocidos en la técnica. En una realización particularmente preferida, el proceso de la invención comprende una etapa preliminar, previa a la etapa a), en donde la semilla se separa de la piel y de la pulpa en el fruto de *Berberis vulgaris* L. y en donde la piel se separa de la pulpa y semilla del fruto de *Myrtus communis* L., preferiblemente el fruto maduro de *Berberis vulgaris* L. o *Myrtus communis* L., de forma manual y/o por medios mecánicos.

En una realización particular, la cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y la cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. que se mezclan en la etapa c) del proceso pueden estar comprendidas cada una de ellas independientemente entre 40 - 60 % en peso, respecto al peso total de la composición colorante. Preferiblemente, la cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y la cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. que se mezclan en la etapa c) del proceso pueden estar comprendidas cada una de ellas independientemente entre 45 - 55 % en peso, respecto al peso total de la composición colorante. Resulta evidente, además, que la suma de las cantidades en peso de los extractos de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y de piel del fruto de *Myrtus communis* L. mezclados en la etapa c) no superara en ningún caso el 100 % en peso respecto al peso total de la composición colorante.

Preferiblemente, se puede someter, de forma independiente entre sí, el extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de la etapa a), y/o el extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. resultante de la etapa b), a una etapa de liofilización previamente a la etapa c). Esto permite que, en la etapa c), ambos extractos se puedan mezclar directamente en forma de polvo liofilizado, facilitando así la obtención de una mezcla con mayor homogeneidad. Opcionalmente, se puede encapsular posteriormente la mezcla resultante de la etapa c), ya en forma liofilizada, en presencia de al menos un agente de encapsulación. Dicho agente de encapsulación debe ser compatible con el pH de la matriz alimenticia a la que se desea incorporar la composición colorante de la presente invención una vez obtenida.

En otra realización, se puede someter, de forma independiente entre sí, el extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de la etapa a), y/o el extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. resultante de la etapa b), a una etapa de liofilización previamente a la etapa c) y, opcionalmente, se puede llevar a cabo la encapsulación, de manera independiente, del extracto liofilizado de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de dicha liofilización y/o del extracto liofilizado de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. resultante de dicha liofilización en presencia de al menos un agente de encapsulación, antes de llevar a cabo la etapa c). Dicho agente de encapsulación debe ser compatible con el pH de la matriz alimenticia a la que se desea incorporar la composición colorante de la presente invención una vez obtenida. Preferiblemente, se puede someter, de forma independiente entre sí, el extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de la etapa a), y el extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. resultante de la etapa b), a una etapa de liofilización previamente a la etapa c) y, opcionalmente, a continuación encapsular el extracto liofilizado resultante de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y el extracto liofilizado resultante de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. en presencia de al menos un agente de encapsulación, también previamente a la etapa c). Esto permite que ambos extractos se liofilicen y encapsulen de forma independiente, de manera que en la etapa c) se mezclarían ya en forma de polvo liofilizado y encapsulado, facilitando la obtención de una mezcla encapsulada homogénea.

En otra realización, la mezcla resultante de la etapa c) se puede someter a una etapa posterior de liofilización. De esta manera, se pueden mezclar los extractos resultantes de las etapas a) y b) en forma líquida (*i.e.*, en presencia de una cantidad del disolvente empleado en la extracción hidroalcohólica, por ejemplo), y proceder a liofilizar la mezcla obtenida en la propia etapa c). Tras esta etapa posterior de liofilización, de forma opcional se puede encapsular, preferiblemente microencapsular, la mezcla resultante de la etapa c), ya en forma liofilizada, en presencia de al menos un agente de encapsulación. Dicho agente de encapsulación debe ser compatible con el pH de la matriz alimenticia a la que se desea incorporar la composición colorante de la presente invención una vez obtenida.

Los ejemplos de agentes de encapsulación adecuados incluyen, de forma no limitativa, ciclodextrinas y maltodextrinas. La encapsulación, en particular la microencapsulación, se puede llevar a cabo mediante los métodos conocidos en este sector de la técnica, incluyendo, por ejemplo, la (micro)encapsulación mediante secado por pulverización (*spray-drying*). Dicho secado por pulverización se puede llevar a cabo utilizando cualquier equipamiento conocido destinado a tal finalidad como, por ejemplo, el *Mini Spray Dryer*, modelo 8-290, de Buchi.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición colorante obtenida u obtenible mediante el método del segundo aspecto de la invención, arriba definido. Esta composición colorante comprende un extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. En una realización, la composición colorante puede comprender una cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición, más preferiblemente, una cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 45 % y un 55 % en peso, respecto al peso total de la composición. En otra realización, la composición colorante puede comprender una cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición, más preferiblemente, una cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 45 % y un 55 % en peso, respecto al peso total de la composición. En particular, la composición colorante puede comprender una cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición y/o una

cantidad de dicho extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición. Resulta evidente, además, que la suma de las cantidades en peso de los extractos de fruto desprovisto de semillas de *Barberis vulgaris* L. y de piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendidas por una cualquiera de estas composiciones colorantes de la invención no superara en ningún caso el 100 % en peso respecto al peso total de la composición colorante.

La composición colorante, de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, puede estar en forma líquida (e.g., en forma de solución hidroalcohólica) o en forma de polvo liofilizado. En una realización preferida, la composición colorante puede estar en forma de polvo liofilizado, más preferiblemente, en forma de polvo liofilizado encapsulado, y todavía más preferiblemente, en forma de polvo liofilizado microencapsulado.

En una realización particular, la composición colorante puede estar en forma de polvo liofilizado, y comprender además un agente encapsulante. Los ejemplos de agente encapsulante incluyen, de forma no limitativa, una maltodextrina o una ciclodextrina.

En un cuarto aspecto, se proporciona el uso de la composición colorante, definida de acuerdo con el primer o tercer aspecto de la invención, como colorante alimentario, preferiblemente, como colorante alimentario en condiciones de pH comprendido entre 2,5 y 6,5, y todavía más preferiblemente como colorante alimentario en condiciones de pH comprendido entre 3,0 y 6,0. Dicho uso puede comprender, adicionalmente, el uso como conservante (e.g., como agente antibacteriano y/o antifúngico). En una realización particularmente preferida, se proporciona el uso de la composición colorante del primer o tercer aspecto de la invención como colorante alimentario, preferiblemente, como colorante alimentario en condiciones de pH comprendido entre 2,5 y 6,5, o más preferiblemente en condiciones de pH comprendido entre 3,0 y 6,0, y también como conservante (e.g., como agente antibacteriano y/o antifúngico). En una realización más particularmente preferida, se proporciona el uso de la composición colorante del primer o tercer aspecto de la invención como colorante alimentario, preferiblemente, como colorante alimentario en condiciones de pH comprendido entre 2,5 y 6,5, o más preferiblemente en condiciones de pH comprendido entre 3,0 y 6,0, como conservante (e.g., como agente antibacteriano y/o antifúngico), y como antioxidante.

En una realización particularmente preferida, se proporciona el uso de la composición del colorante, según el primer o tercer aspecto de la invención, como colorante, conservante y antioxidante, más preferiblemente, como colorante alimentario, conservante y antioxidante y, todavía más preferiblemente, como colorante alimentario, conservante y antioxidante en condiciones de pH comprendido entre 3 y 3,5 o entre 5,0 y 6,0. Dichas condiciones de pH pueden corresponder, por ejemplo, al pH de una matriz alimenticia.

De acuerdo con un quinto aspecto de la invención, se proporciona un producto alimentario que comprende una composición colorante según el primer o tercer aspecto de la invención. Se entiende por "producto alimentario" aquel producto destinado a la alimentación humana y/o animal. En una realización preferida, se refiere al producto o productos destinado(s) a la alimentación humana, en particular, a la alimentación de niños y jóvenes adultos (entre 18 y 24 años de edad). Dicho producto alimentario puede comprender, de modo no limitativo, gelatinas, leches fermentadas aromatizadas, postres lácteos, helados de crema, polos, bebidas refrescantes aromatizadas, golosinas tales como gominolas o piruletas, etc.

En una realización preferida, el producto alimentario además comprende una matriz alimenticia con un valor de pH comprendido entre aproximadamente 3,0 y 3,5 o, más preferiblemente, una matriz alimenticia con un valor de pH comprendido entre 3,0 y 3,5. Los ejemplos de productos

alimentarios que comprenden dicha matriz alimenticia con un valor de pH de aprox. 3,0 - 3,5 incluyen, pero no se limitan a, gelatinas, leches fermentadas aromatizadas, zumos, néctares, pollos, bebidas refrescantes y golosinas (e.g., gominolas o piruletas). Se entiende por "matriz alimenticia", en el contexto de la presente invención, al producto alimentario como tal, antes de la introducción o adición de la composición colorante de la presente invención.

De hecho, resulta conocido que el pH de la matriz alimenticia condiciona significativamente el color de los colorantes naturales utilizados actualmente en la industria alimentaria, como por ejemplo el E-163, conduciendo a tonalidades rojizas a pH 3, con valores de L^* 20,17, a^* : 44,29, b^* : 32,82 según el sistema CIELAB. En este sentido, de forma particularmente ventajosa, las composiciones colorantes de la presente invención permiten obtener coloraciones magentas, que actualmente requieren la combinación de diferentes colorantes sintéticos con tonalidades azules, puesto que la industria alimentaria no dispone hoy en día de aditivos colorantes naturales o sintéticos que presenten la tonalidad magenta-morada.

El sistema CIELAB, L^* es un modelo que permite clasificar los colores en función de su luminosidad (parámetro " L^* ") y sus coordenadas cromáticas, en donde " a^* " corresponde a las coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde), y " b^* " corresponde a las coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul).

En otra realización preferida, el producto alimentario además comprende una matriz alimenticia con un valor de pH comprendido entre aproximadamente 5,5 y 6,0 o, más preferiblemente, una matriz alimenticia con un valor de pH comprendido entre 5,5 y 6,0. Se conoce que algunos postres lácteos, tales como los helados de crema (a base de nata), tienen un pH alrededor de 5,5 - 6,0, de manera que no es posible aportar una tonalidad magenta-morada ni tan siquiera con el colorante natural E-163, debido a la tonalidad que presenta en ese rango de pH, más particularmente a pH 6, con valores de L^* : 11,14, a^* : 31,72, b^* : 4,47, correspondientes a color granate oscuro, que progresivamente derivan a una tonalidad morada y luego a una azul oscura. Sin embargo, las composiciones colorantes de la presente invención permiten obtener coloraciones magenta-moradas a ese rango de pH alrededor de 5,5 - 6,0, con valores CIELAB, por ejemplo, de L^* : 7,06, a^* : 14,05, b^* : -0,74 o L^* : 14,69, a^* : 14,98, b^* : -1,14, tal como se demuestra experimentalmente en los ejemplos descritos a continuación.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y cualquier variación de la misma no pretenden excluir otras características técnicas, ingredientes o etapas.

Descripción de los dibujos

Fig. 1 - Perfil de antocianinas del extracto BV2 en polvo liofilizado, obtenido mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a un detector de diodos ultrasensible (UHPLC-DAD, previa identificación llevada a cabo mediante HPLC-DAD-MS).

Fig. 2 - Perfil de antocianinas del extracto MC2 en polvo liofilizado, obtenido mediante UHPLC-DAD, con identificación previa llevada a cabo mediante HPLC-DAD-MS.

Fig. 3 - Perfil de antocianinas de la composición BV2:MC2 en polvo liofilizado, obtenido mediante UHPLC-DAD, con identificación previa llevada a cabo mediante HPLC-DAD-MS.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con la finalidad de ilustrar la invención y los efectos técnicos proporcionados por la misma, pero no deben ser considerados como limitativos del

alcance de la misma. Así pues, es posible que la invención pueda ser puesta en práctica de un modo diferente al descrito específicamente en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1 - Composición colorante, en forma fluida, de extractos de fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. y piel del fruto de *Mvrtus communis* L.

Preparación y caracterización del extracto de fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. (en adelante, “extracto BV1”)

En primer lugar, se seleccionaron los frutos de *Berberis vulgaris* L. con un estado de madurez óptimo (11,0 - 19,0° Brix, determinado mediante un refractómetro Atago a 20 °C según el método oficial 932.14C (AOAC, 2005), y se separaron las semillas, obteniendo así el fruto (piel y pulpa) de *Berberis vulgaris* L. desprovista de semillas. Seguidamente, dicho fruto se sometió a liofilización, en concreto, a un ciclo de 5 días de liofilización a - 80 °C ($\pm$ 5 °C) a 0,029 mbar, y posterior homogeneización del tamaño de partícula, hasta alcanzar aproximadamente 0,150 mm, mediante un molino IKA Multidrive Basic (BS000) y posterior comprobación por granulometría a través de tamiz con número Malla (U.S. STD. Sieve) de 100 (corresponde a 0,149 mm o 0,0059 pulgadas). El extracto del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. se obtuvo a continuación por extracción hidroalcohólica bajo condiciones de potencia de ultrasonidos (Fisherbrand™, Sonic Dismembrator, Model 705) de 325 - 375 W, con una proporción sólido-líquido de 20 – 28 g/L (*i.e.*, proporción de extracto del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. liofilizado en peso respecto al volumen de medio hidroalcohólico), durante un tiempo de entre 1,5 y 4 minutos, utilizando una mezcla de etanol agua (80%: 20%, v/v) acidificada con ácido cítrico hasta pH 3 como disolvente de extracción. Esto permitió obtener un extracto hidroalcohólico de fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. rico en antocianinas (extracto BV1).

El extracto BV1 presentaba un contenido total de antocianinas monoméricas de 9,15 mg cya-3-gluE/g extracto BV1 (donde “cya-3-gluE” significa “equivalentes de cianidina-3-glucósido”), analizado mediante el método espectrofotométrico del pH diferencial. En dicho método analítico, la muestra se dispone en una solución con pH 1 para que las antocianinas estén en forma de oxonio, siendo esta su forma más estable, y en otra disolución con pH 4,5 donde las antocianinas pasan a una forma hemiacetal donde no presentan color. La cuantificación se realiza a partir de la diferencia de absorbancias entre ambas disoluciones, medidas a la longitud de onda de mayor absorción de la antocianina mayoritaria (500 - 560 nm).

Asimismo, el extracto BV1 se analizó mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC-DAD) en las siguientes condiciones: Agilent LC-1290II, columna Poroshell 120 SB-C18 4,6 mm x 75 mm 2.7 μ m, 35 °C, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/ Acetonitrilo. Mediante este análisis, se determinó que las antocianinas mayoritarias eran delfinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-glucósido, pelargonidina-3-O-glucósido y malvidina-3-O-glucósido. El color del extracto BV1 se determinó mediante un colorímetro Hunter Color Flez CiE Illuminate C, 2° y geometría 45/0°, mediante cubetas cilíndricas de vidrio de 5 cm de diámetro y 1,3 cm de altura, y se obtuvieron los siguientes valores, expresados en el sistema CIELAB: L*: 23,44, a*: 48,00 y b*: 2,94 a pH 3.

Preparación y caracterización del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. (en adelante, “extracto MC1”)

Por otro lado, se seleccionaron los frutos de *Myrtus communis* L. con un estado de madurez óptimo (6,0 - 9,0 ° Brix, determinado mediante refractómetro Atago a 20 °C según el método oficial 932.14C (AOAC, 2005), y se separaron las pieles de la pulpa y la semilla, obteniendo así piel del fruto de *Myrtus communis* L. desprovista de pulpa y semillas. Seguidamente, dicha piel

se sometió a liofilización, en concreto, a un ciclo de 5 días de liofilización a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) a 0,029 mbar, y posterior homogeneización del tamaño de partícula (0,150 mm) mediante un molino IKA Multidrive Basic (BS000). El extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. se obtuvo por extracción hidroalcohólica bajo condiciones de potencia de ultrasonidos (FisherbrandTM, Sonic Dismembrator, Model 705) de aproximadamente 450 - 500 W, con una proporción sólido líquido de 18 - 22 g/L (*i.e.*, proporción de extracto del fruto sin semillas de *Myrtus communis* L. liofilizado en peso respecto al volumen de medio hidroalcohólico) durante un tiempo de entre 18 y 22 minutos, utilizando una mezcla de etanol agua (80%:20%, v/v) con un valor de pH de 6 como disolvente de extracción. Esto permitió obtener un extracto hidroalcohólico de *Myrtus Communis* L. rico en antocianinas (extracto MC1).

Los resultados mostraron que el extracto MC1 presentaba un contenido total de antocianinas monoméricas de 26,34 mg cya-3-gluE/g extracto MC1. El extracto MC1 también se analizó mediante UHPLC, en las siguientes condiciones: Agilent LC-1290II, columna Poroshell 120 SB-C18 4,6 mm x 75 mm, 2,7 μm , 35 $^{\circ}\text{C}$, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/ Acetonitrilo. Se determinó que las antocianinas mayoritarias eran delfinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-glucósido y malvidina- 3-O-glucósido. El color del extracto MC1 se determinó mediante un colorímetro Hunter Color Flez CiE Illuminate C, 2 $^{\circ}$ y geometría 45/0 $^{\circ}$, mediante cubetas cilíndricas de vidrio de 5 cm de diámetro y 1,3 cm de altura, y se obtuvieron los siguientes valores, expresados en el sistema CIELAB: L*: 6,38, a*: 29,60 y b*: 8,35 a pH 3 y L*: 7,65, a*: 22,40 y b*: 3,00 a pH 6.

Preparación de la composición colorante en forma líquida que comprende el fruto sin semillas de *Barberis vulgaris* L. y la piel del fruto de *Myrtus communis* L. (en adelante, referida como composición colorante "BV1:MC1")

Finalmente, se mezclaron ambos extractos individuales, BV1 y MC1, en cantidades correspondientes a 50%:50% (pip) $\pm 10\%$ de *Barberis vulgaris* L. y *Myrtus communis* L., dando lugar a una composición colorante de acuerdo con la invención, en forma líquida, más particularmente en forma de disolución hidroalcohólica, que comprende extractos de piel de *Barberis vulgaris* L. y *Myrtus communis* L. (composición colorante BV1:MC1).

Ejemplo 2 - Composición colorante, en forma de polvo liofilizado, de extractos de fruto desprovisto de semillas de *Barberis vulgaris* L. y piel de *Myrtus communis* L.

Se obtuvieron los extractos individuales BV1 y MC1 tal como se describe en el Ejemplo 1, que se usaron tal como se describe a continuación:

Preparación y caracterización del extracto de fruto sin semillas de *Barberis vulgaris* L. en forma de polvo liofilizado (en adelante, "extracto BV2").

A partir del extracto BV1, se procedió a evaporar el etanol mediante el uso de un concentrador de muestras (equipo SpeedVac SPD130DLX; Thermoscientific) a 65 $^{\circ}\text{C}$ y 2,6 torr de presión, que corresponden a 346,6 Pa. A continuación, se congeló el extracto libre de etanol resultante a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se sometió a liofilización (equipo de liofilización: Freezone; 4,5 L; LABCONCO) a esa misma temperatura y 0,029 mbar de presión, que corresponden a 2,9 Pa, y posterior homogenización mediante un molino IKA Multidrive Basic (BS000), hasta la obtención de un polvo homogéneo con un tamaño de partícula de 0,150 mm, obteniendo así un extracto liofilizado en polvo rico en antocianinas procedente del fruto sin semillas de *Barberis vulgaris* L. (extracto BV2).

El extracto liofilizado BV2 presentó un rendimiento de extracción de 65,8 % y una humedad de 15,14 g de agua/ 100 g de extracto. Dentro de su composición química, se determinó que el

extracto presentaba un total de polifenoles, medidos por el método Fast Blue BB (Palombini, *et al.*, 2016), de 159,84 mg GAE/g extracto seco (donde "GAE" significa "equivalentes de ácido gálico"). El método Fast Blue BB se basa en someter la muestra a reacción con el reactivo fast blue BB (*i.e.*, 4'-amino-2',5'-dietoxibenzanilida) a una concentración 0,1% (p/v), en presencia de NaOH 5% (v/v). Al estar en medio alcalino, los grupos fenólicos de los polifenoles forman un complejo azo estable, que genera un color que entonces se mide por espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm.

De este valor total de polifenoles correspondiente a 159,84 mg GAE/g extracto seco, los ácidos hidroxibenzoicos resultan ser el componente mayoritario, con 44,96 mg GAE/g extracto seco, seguidos de los ácidos hidroxicinámicos con 25,58 mg FAE/g (donde "FAE" significa "equivalentes de ácido ferúlico) de extracto seco, además contiene 5,50 mg QE/g (donde "QE" significa "equivalentes de quercetina") de extracto seco de flavonoles, siendo todos estos medidos siguiendo la metodología QUENCHER (QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible), donde se parte de una pequeña cantidad de muestra, previamente homogeneizada hasta un tamaño de partícula de 0,037 mm, la cual se somete a contacto directo con los reactivos propios de cada determinación. Esta metodología permite medir tanto las moléculas solubles como los compuestos insolubles de forma precisa y fiable, y permite un posterior análisis espectrofotométrico a las longitudes de onda de mayor absorción de cada grupo fenólico, concretamente a 280 nm para los ácidos hidroxibenzoicos, 320 nm para los ácidos hidroxicinámicos y 370 nm para los flavonoles, respectivamente, siendo estas las longitudes de onda de mayor absorción de cada grupo fenólico. Asimismo, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de ultravioleta - visible (HPLC-UV/Vis), previa extracción en ácido metafosfórico (4,5%) y separación y cuantificación por UV-VIS (Thermo Separation Spectra Series UV100) a una longitud de onda de 215 nm mediante columna Sphreclone ODS (Phenomenex), se identificaron tres ácidos orgánicos mayoritarios presentes en el extracto, específicamente 0,573 mg/g extracto seco de ácido ascórbico, 5,95 mg/g extracto seco de ácido oxálico y 446,34 mg/g extracto seco de ácido cítrico.

Por otro lado, el extracto presentó un total de 12,42 mg cya-3-gluE/g extracto de antocianinas totales monoméricas determinadas mediante el método espectrofotométrico del pH diferencial (véase descripción del método del pH diferencial utilizado en el Ejemplo 1). Se identificaron 6 antocianinas individuales por HPLC-DAD-MS-ESI (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, acoplado a un electrospray de ionización espectrómetro de masas (Linear Ion Trap LTQ XL, Thermo Scientific, Columna C18 Water Spherisorb ODS2), cuantificándose un total de 5 antocianinas mediante cromatografía líquida ultra rápida de alta eficiencia acoplada a un detector de diodos (UHPLC-DAD), en las siguientes condiciones: Agilent LC-1290II, columna Poroshell 120 SB-C18 4,6 mm x 75 mm 2,7 μ m, 35 °C, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/ Acetonitrilo. Estas antocianinas eran delphinidina-3-O-glucósido (2,90 mg/g extracto seco), cianidina-3-O- glucósido (2,20 mg/g extracto seco), petunidina-3-O-glucósido (1,21 mg/g extracto seco), pelargonidina-3-O-glucósido (0,55 mg/g extracto seco) y malvidina-3-O-glucósido (2,46 mg/g extracto seco) (**Figura 1**).

Los inventores analizaron la actividad colorante del extracto BV2, observando que presentaba una variabilidad del color dependiendo del pH, así como también la estabilidad de un color rojo intenso (L^* : 12,87, a^* : 37,05, b^* : 17,83) entre valores de pH de 1 a 3,5, pasando a tomar un color rosa pálido (L^* :13,97, a^* : 5,21, b^* : 13,01) entre valores de pH de 4 a 6 y un color amarillo verdoso (L^* :52,41, a^* : -0,88, b^* : 23,25) en valores de pH superiores a 7,5. Concretamente el extracto BV2 a pH 4,5 tenía un color próximo al color estándar RAL 020 20 29 del sistema de color RAL design, y a pH 6,5 tenía un color próximo al estándar S8010 Y10R del sistema de color NCS 2050 (*Natural Color System* es un sistema de color internacional para diseño, arquitectura, producción, investigación y educación).

BV2 demostró tener un perfil cromático con un color característico que evolucionaba con el pH, en solución acuosa a una concentración de 20 mg/mL (Tabla 1):

Tabla 1:

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	12,87	12,77	13,22	14,88	17,45	19,32	20,09	20,16	19,09	17,32
a*	37,05	35,30	35,22	34,07	30,63	26,20	22,33	18,48	13,81	8,83
b*	17,83	16,69	16,52	14,62	9,14	7,72	7,81	9,33	11,67	13,16
Color estándar más cercano	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 020 20 29 ¹	RAL 020 20 29 ¹	BS 452 ²	BS44 9 ²	S 8010-Y10R ³	RAL 050 20 16 ¹

¹ Sistema RAL Design, ² Sistema BS Other, ³ Sistema NCS 2050.

Por otro lado, se analizó la actividad conservante (antibacteriana y antifúngica) de BV2, lo que permitió concluir que BV2 presenta actividad inhibitoria contra bacterias implicadas en enfermedades de transmisión alimentaria y de obligado análisis en los productos alimentarios: Para este ensayo se utilizaron las cepas de referencia: *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterocolitica* (ATCC 13076), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Concretamente, el extracto BV2 presentó actividad inhibitoria para el crecimiento de tres bacterias Gram negativas y tres bacterias Gram positivas, presentando concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas (CMI/CMB) de 10/20, 5/10, 2,5/10, 5/10 y 1,25/20 mg/mL de extracto frente a las cepas de las bacterias de referencia Gram negativas *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Salmonella enterocolitica* (ATCC 13076), respectivamente, y concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas (CMI/CMB) de 1,25/10, 5/>20, 2,5/20 mg/mL frente a las cepas bacterianas de referencia Gram positivas *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente. Por otro lado, el extracto también presenta actividad antifúngica con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 5 y 10 mg/mL de extracto contra algunos hongos presentes en los alimentos, como son *Aspergillus brasiliensis* y *Aspergillus fumigatus*, respectivamente. Para ello, el extracto BV2 fue diluido en serie en una microplaca. Para cada dilución, a cada pocillo se le adicionó el inóculo de una bacteria de referencia asegurando la presencia de 1,5 x 10⁵ unidades formadoras de colonia (CFU) por pocillo, se incubaron a 37 °C durante 24 horas y, después de una incubación con cloruro de yodonitrotetrazolio (INT), utilizado como colorante, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) siendo esta la concentración mínima que inhibe el crecimiento de bacteria visible por coloración amarilla y que no cambiaron a rosa. Las bacterias de los pocillos que se mantuvieron amarillos, posteriormente, se sembraron en medio sólido y se incubaron a 37 °C durante 24 h, la concentración más baja sin crecimiento bacteriano fue determinada como la concentración mínima bactericida (CMS). En el caso de la actividad antifúngica, la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada mediante microscopio binocular.

La actividad antioxidante del extracto BV2 también fue evaluada mediante dos métodos de actividad antioxidante químicos *in vitro* (Folin-Ciocalteu y DPPH) y un método de actividad antioxidante biológico *in vitro* (OxHLIA). En el método Folin-Ciocalteu, se hacen reaccionar los

compuestos reductores presentes en la muestra con el ácido fosfomolibdotúngstico del reactivo de Folin-Ciocalteu, generando una coloración azul medible a una longitud de onda de 750 nm. En el método DPPH, la solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazilo) reacciona con las moléculas antioxidantes de la muestra, perdiendo el color, que pasa de morado a amarillo, de tal manera que dicha pérdida de color se puede monitorizar mediante lecturas espectrofotométricas a 517 nm. El método OxHLIA, por otro lado, es un método biológico in vitro, en el que los eritrocitos extraídos de sangre de oveja, diluidos en PBS, se ponen en contacto con el extracto del fruto correspondiente y con AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobi(2-metilpropionamida)), que genera radicales libres. Posteriormente, se lleva a cabo la medición de la densidad óptica a 690 nm cada 10 minutos, hasta observar una hemólisis completa.

El extracto BV2 evidenció una alta actividad antioxidante con valores de 88,03 mg GAE/g extracto seco mediante la metodología Folin-Ciocalteu y 111,37 mg TE/g extracto seco mediante la metodología DPPH (donde "TE" significa "equivalentes de Trolox"). En el caso de OxHLIA se obtuvo un IC₅₀ de 125 µg/mL para la actividad antihemolítica durante 60 minutos. La expresión "IC₅₀" significa "concentración inhibitoria media", es decir, se refiere a la concentración de inhibidor que provoca un descenso del 50 % en la actividad analizada. Finalmente, aunque el consumo de frutos de *Berberis vulgaris* L. se considera seguro, y se ha consumido tradicionalmente durante generaciones en la península Ibérica, principalmente en España, se realizaron estudios de toxicidad. Así, se evaluó la posible toxicidad del fruto en células no tumorales de hígado de cerdo (PLP2), mediante la monitorización del crecimiento de las células por microscopia de contraste de fases, obteniendo como resultado la concentración de la muestra capaz de inhibir el 50% del crecimiento celular neto, que en este caso fue una concentración superior a 400 µg/mL de extracto, evidenciando una hepatotoxicidad nula.

Preparación y caracterización del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. en forma de polvo liofilizado (en adelante, "extracto MC2")

A partir del extracto MC1, se procedió a evaporar el etanol mediante el uso de un concentrador de muestras (equipo SpeedVac SPD130DLX; Thermoscientific) a 65 °C y 2,6 torr de presión, que corresponden a 346,6 Pa. A continuación, se congeló el extracto libre de etanol resultante a - 80 °C y se sometió a liofilización (equipo de liofilización: Freezone; 4,5 L; LABCONCO) a esa misma temperatura y 0,029 mbar de presión, que corresponden a 2,9 Pa, y posterior homogenización mediante un molino IKA Multidrive Basic (BS000), hasta la obtención de un polvo homogéneo (tamaño de partícula de 0,150 mm), obteniendo así un extracto liofilizado en polvo rico en antocianinas procedente de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. (extracto MC2).

El extracto liofilizado MC2 presentó un rendimiento de extracción de 57,6 % y una humedad de 9,22 g de agua/100g de extracto. Dentro de su composición química, se determinó que el extracto presentaba un total de polifenoles de 271,18 mg GAE/g extracto seco, siendo los ácidos hidroxibenzoicos los que se presentan en mayor cantidad con un valor de 44,96 mg GAE/g extracto seco. Además, este extracto presentaba una cantidad de flavonoles de 20,33 mg/g extracto seco y un total de ácidos hidroxicanámicos de 17,78 mg/g extracto seco. Estos flavonoles fueron determinados siguiendo la metodología QUENCHER, tal como se describe anteriormente en la sección relativa a la preparación y caracterización de BV2.

Por otro lado, mediante HPLC-UV/Vis, previa extracción en ácido metafosfórico (4,5 %) y separación y cuantificación por UV-VIS (Thermo Separation Spectra Series UV100) a una longitud de onda de 215 nm mediante columna Sphreclone ODS (Phenomenex), se identificaron tres ácidos orgánicos presentes en el extracto, específicamente 4,50 mg de ácido ascórbico/g extracto seco, 6,37 mg de ácido cítrico/g extracto seco y 7,16 mg de ácido oxálico/g extracto seco.

Asimismo, se determinaron las antocianinas totales monoméricas mediante el método de pH diferencial (véase descripción de este método en el Ejemplo 1) obteniendo un total de 47,51 mg cya-3-gluE/g extracto seco. Además, se identificaron 9 antocianinas individuales (**Figura 2**) por HPLC-DAD-ESI-MS (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, acoplado a un electroespray de ionización espectrómetro de masas (Linear Ion Trap LTQ XL, Thermo Scientific, Columna C18 Water Spherisorb ODS2), y se cuantificó un total de 4 antocianinas mediante UHPLC-DAD, en las siguientes condiciones: Agilent LC-1290II, columna Poroshell 120 SB-C18, 4,6 mm x 75 mm, 2,7 µm, 35 °C, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/acetonitrilo: delfinidina-3-O-glucósido (9,41 mg/g extracto seco, cianidina-3-O-glucósido (1,63 mg/g extracto seco), petunidina-3-O-glucósido (9,41 mg/g de extracto seco) y malvidina-3-O-glucósido (10,30 mg/g extracto seco).

Se encontró que el extracto MC2 presentaba una variabilidad del color dependiendo del pH, y se evidenció la estabilidad de un color morado intenso (L*: 11,42, a*: 34,61, b*: 15,45) a pH 3,0, a un color morado-azulado (L*: 4,22, a*: 13,71, b*: 0,05) a pH 6. Concretamente, el extracto MC2 tenía un color próximo al estándar de color RAL 010 20 25 del sistema de color RAL Design a pH 4,5).

MC2 demostró tener un perfil cromático característico que evolucionaba con el pH, en solución acuosa a una concentración de 4 mg/mL (Tabla 2):

Tabla 2:

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	11,37	11,42	12,29	15,19	17,38	14,07	6,82	4,22	3,29	1,73
a*	35,85	34,61	34,04	31,47	26,24	23,20	20,68	13,71	7,87	2,47
b*	16,22	15,45	12,77	5,64	2,84	0,27	-0,17	0,05	0,59	0,07
Color estándar más cercano	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 010 20 25 ¹	S7020 -R20B2	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 9005 ³

¹ Sistema RAL Design, ² Sistema NCS 2050, ³ Sistema RAL Classic.

El extracto MC2 presentaba además actividad antimicrobiana frente a cinco bacterias Gram negativas y tres bacterias Gram positivas utilizadas como cepas de referencia, presentando concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas (CMI/CMB) de 10/20 mg/mL extracto frente a las bacterias Gram negativas *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 9027) y *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), y 5/>20 y 2,5/20 frente a las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella enterica* (ATCC 13076), respectivamente, así como CMI/CMB de 0,6/20 mg/mL extracto contra las cepas de las bacterias Gram positivas *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente. Por otro lado, el extracto también presentaba actividad antifúngica con CMI de 1,25 mg/mL extracto contra el hongo *Aspergillus brasiliensis*. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento que se ha descrito más arriba para el extracto BV2.

La actividad antioxidante se determinó mediante los métodos químicos *in vitro* Folin- Ciocalteu y DPPH, y el método biológico *in vitro* OxHLIA, tal como se describe arriba, en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2. Se observaron actividades antioxidantes de 96,81 mg GAE/g y 73,90 mg TE/g para el extracto MC2 mediante las

metodologías Folin-ciocalteu y DPPH, respectivamente, y se obtuvo una IC₅₀ de 59µg/mL para la actividad antihemolítica durante 60 mediante la metodología OxLHIA.

Finalmente, aunque el consumo de frutos de *Myrtus communis* L. se considera seguro, y se ha consumido tradicionalmente su fruto silvestre durante generaciones, se realizaron estudios de toxicidad. Así, se evaluó la posible toxicidad del fruto en células no tumorales de hígado de cerdo (PLP2), evidenciando una hepatotoxicidad nula (> 400 µg/mL extracto).

Preparación y caracterización de la composición colorante en forma de polvo liofilizado que comprende el extracto del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. y el extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. (en adelante, referida como composición colorante “BV2:MC2”)

Una vez obtenidos los extractos individuales BV2 y MC2 de cada fruto de las diferentes especies vegetales, se obtuvo una composición colorante de acuerdo con la invención (composición colorante BV2:MC2), en forma de polvo liofilizado, mediante la mezcla de ambos extractos BV2 y MC2 en proporciones 50:50 p/p ± 10 %. Esa composición colorante, apta para su uso como ingrediente alimentario en forma de polvo liofilizado, presentaba las características de color deseadas a pH 3,5, así como propiedades funcionales y organolépticas adecuadas.

Merece la pena destacar, respecto a la composición BV2:MC2, la cantidad total de polifenoles (281,59 mg GAE/g extracto seco) medidos por el método Fast Blue BB, siendo los ácidos hidroxibenzoicos los que se presentan en mayor cantidad con un valor de 86,29 mg GAE/ g extracto seco. Además, este extracto presenta un total de ácidos hidroxicinámicos de 32,28 mg FAE/g extracto seco y de flavonoles de 14,77 mg QE/g extracto seco, medidos siguiendo la metodología QUENCHER arriba descrita.

Por otro lado, mediante HPLC-UV/Vis, previa extracción en ácido metafosfórico (4,5%) y separación y cuantificación por UV-VIS (Thermo Separation Spectra Series UV100) a una longitud de onda de 215 nm mediante columna Sphreclone ODS (Phenomenex), se identificaron tres ácidos orgánicos presentes en el extracto, específicamente 2,58 mg de ácido ascórbico/g extracto seco, 6,61 mg de ácido oxálico/g extracto seco y 230,20 mg de ácido cítrico/g extracto seco.

Asimismo, se determinaron las antocianinas totales monoméricas mediante el método de pH diferencial (véase descripción de este método en el Ejemplo 1) obteniendo un total de 39,91 mg cya-3-gluE/g extracto seco. Además, mediante el análisis por HPLC-DAD-MS- ESI (Dionex Ultimate 3000 UPLC, Thermo Scientific, acoplado a un electrospray de ionización espectrómetro de masas Linear Ion Trap LTQ XL, Thermo Scientific, Columna C18 Water Spherisorb ODS2) se identificaron 11 antocianinas individuales, que se muestran en la **Figura 3** con sus correspondientes picas cromatográficas y su valor de retención Rt, y se cuantificaron 5 antocianinas por UHPLC-DAD (Agilent LC-1290II, columna Poroshell 120 SB-C18, 4,6 mm x 75 mm, 2,7 µm, 35 °C, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/Acetonitrilo), delfinidina-O-glucósido (6,70 mg/g extracto seco), cianidina-3-O-glucósido (1,66 mg/g extracto seco), petunidina-3-O-glucósido (6,21 mg/g extracto seco), pelargonidina-3-O-glucósido (0,12 mg/g extracto seco) y malvidina-3-O- glucósido (7,16 mg/g extracto seco).

Dicha composición presentaba, además, un perfil de color característico debido a la composición única de antocianinas monoméricas que se consigue mediante la combinación de los extractos de fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. y de piel de *Myrtus communis* L. de acuerdo con la presente invención. En concreto, gracias a la combinación sinérgica de estos extractos de ambos frutos, las composiciones colorantes de la presente invención permiten conseguir un color

característico magenta particularmente estable a un pH de 3 - 3,5 y un color morado estable a valores de pH de 5,5 - 6,0.

En concreto, esta composición BV2:MC2 presentaba una variabilidad de color en solución acuosa dependiendo del pH, aunque se observó una inesperada estabilidad de un color morado rojizo (L*: 6,90, a*: 22,09, b*: 5,12) a pH 3,5, de un color morado (L*: 7,06, a*: 14,05, b*: -0,74) en valores de pH de 5,5, y se evidenció un color verde grisáceo en valores de pH superiores a 7,5 (L*: 5,45, a*: 0,52, b*: 2,02). Concretamente el extracto BV2:MC2 tenía un color próximo al RAL 8022 del sistema de color RAL Classic a pH 6,5 a 7,0.

El extracto BV2:MC2 demostró tener un perfil cromático característico que evolucionaba con el pH, en solución acuosa a una concentración de 8 mg/mL (Tabla 3):

Tabla 3:

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	7,03	6,59	6,90	6,74	6,58	7,00	7,06	6,57	7,23	7,40
a*	27,95	25,55	22,09	22,87	20,39	17,60	14,05	8,20	4,87	1,20
b*	8,17	7,07	5,12	4,22	2,40	0,72	-0,74	-1,59	-0,80	0,89
Color estándar más cercano	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 8022 ¹	RAL 8022 ¹

¹ Sistema RAL Classic.

Por otro lado, la composición BV2:MC2 presentó actividad conservante (antibacteriana y antifúngica) frente a 5 bacterias Gram negativas y 3 bacterias Gram positivas utilizadas como cepas de referencia, presentando CMI/CMB de 10/20 mg/mL *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), 5/20 mg/mL para *Enterobacter Cloacae* (ATCC 49741) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y 2,25/20 para las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella enterica* (ATCC 13076). Para las bacterias Gram positivas, presentó CMI/CMB de 0,6/20 frente a *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), 0,6/20 para *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Por otro lado, el extracto también presentaba actividad antifúngica con CMI de 5 mg/mL de extracto frente a *Aspergillus fumigatus*, respectivamente. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento que se ha descrito más arriba tanto para el extracto BV2 como para el extracto MC2.

Además, se confirmó la actividad antioxidante de esta composición BV2:MC2 mediante los métodos químicos *in vitro* Folin-Ciocalteu y DPPH, tal como se describe arriba, en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2, obteniendo valores de 60,31 mg GAE/g y 164,42 mg TE/g extracto seco, respectivamente. Además, se obtuvo una IC₅₀ de 29 µg/mL para la actividad antihemolítica durante 60 mediante la metodología OxLHIA.

Ejemplo 3 - Composición colorante en forma de polvo liofilizado de extractos de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y piel del fruto de *Mvrtus communis* L. en forma de polvo liofilizado microencapsulado

Se obtuvieron los extractos individuales BV2 y MC2 tal como se describe en el Ejemplo 2, que se utilizaron tal como se describe a continuación:

Preparación y caracterización del extracto de fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. en forma de polvo liofilizado microencapsulado (en adelante, “extracto BV3”)

5 A partir del extracto BV2, se procedió a la encapsulación por *spray-drying* (Buchi, Mini Spray Dryer, modelo B-290), con maltodextrina como agente encapsulante, en una concentración de 35 % - 45 % en peso (g/100 g), temperatura de 120 °C, aspiración a 95 %, flujo de alimentación de 5 mL/min y un flujo de aire de 7,88 L/min, obteniendo así el extracto microencapsulado procedente de *Berberis vulgaris* L. (extracto BV3) con un tamaño de partícula de 1 - 44 µm
10 determinado mediante Mastersizer 3000 (Malvern, UK).

El extracto BV3 presentó un rendimiento de extracción de encapsulación de 60,4 %, y una cantidad de compuestos fenólicos totales de 61,06 mg GAE/g extracto microencapsulado determinada por el método Fast Blue BB en las condiciones descritas arriba en la sección correspondiente a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2. Dentro de
15 estos compuestos fenólicos, los ácidos hidroxibenzoicos fueron los más representativos con 36,47 mg GAE/g extracto microencapsulado, seguido de una cantidad de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles de 10,15 mg FAE/g y 2,41 mg QEq/g, respectivamente, siendo todos estos medidos siguiendo la metodología QUENCHER, tal como se describe anteriormente
20 en la sección relativa a la preparación y caracterización de BV2.

Asimismo, se obtuvo una cantidad de antocianinas monoméricas totales de 5,57 mg cya- 3-glu/g extracto microencapsulado, determinada mediante el método espectrofotométrico del pH diferencial (véase descripción del método del pH diferencial en el Ejemplo 1). Además, se
25 cuantificaron un total de 5 antocianinas mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a un detector de diodos (UHPLC-DAD), en las siguientes condiciones: Agilent LC-1290II, columna Poroshell 120 SB-C18, 4,6 mm x 75 mm, 2,7 µm, 35 °C, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/ Acetonitrilo. Específicamente, se cuantificaron las siguientes antocianinas: delphinidina-3-O-glucósido (1,91 mg/g extracto seco), cianidina-3-O-glucósido (1,53
30 mg/g extracto seco), petunidina-3-O-glucósido (0,77 mg/g extracto seco), pelargonidina-3-O-glucósido (0,28 mg/g extracto seco) y malvidina- 3-O-glucósido (1,66 mg/g extracto seco).

Respecto al perfil cromático de BV3, se estudió una muestra particular microencapsulada con un 40 % en peso de maltodextrina (i.e., 40 g maltodextrina/100 g muestra microencapsulada) como
35 agente encapsulante, que presentó un perfil cromático característico que evolucionaba con el pH, en solución acuosa con una concentración de 20 mg/mL (Tabla 4):

Tabla 4:

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	18,89	19,4	21,58	25,3	29,39	33,0	33,18	33,18	32,49	30,29
a*	41,75	41,4	40,53	36,1	27,69	20,4	17,46	14,20	9,95	6,13
b*	27,92	27,4	22,60	12,7	8,71	8,65	9,20	11,08	14,58	18,38
Color estándar más cercano	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 3004 ¹	SW 7578 ²	PP G 13-03 ³	LPG 0416 ⁴	PPG 1060-7 ³	70YR 08/18 6 ⁵	RAL 070 30 20 ⁶

40 ¹ Sistema RAL Classic, ² Sistema Sherwin-Williams, ³ Sistema PPG/Johnstone's, ⁴ Sistema Isomat, ⁵ Sistema Dulux Trade, ⁶ Sistema RAL Design.

En solución acuosa, el extracto BV3 presentó un color rojizo intenso deseado (L^* : 19,43, a^* : 41,43, b^* : 27,46) a un pH de 3. A pH 5,5 (pH aproximado de los helados tipo crema), se observó un leve color morado (L^* : 33,18, a^* : 17,466, b^* : 9,20) que se asemeja al color estándar LPC 0416 del sistema Isomat.

El extracto BV3 presentaba además actividad antimicrobiana frente a 5 bacterias Gram negativas y 3 bacterias Gram positivas utilizadas como cepas de referencia, presentando CMI/CMB de 5/20 mg/mL para las bacterias Gram negativas *Enterobacter Cloacae* (ATCC 49741) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) y 10/20, 2,5/20 y 10/10 mg/mL para las bacterias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* (ATCC 13076) y *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), respectivamente, y CMI/CMB de 2,5/20, 5/20 y 5/20 mg/mL contra las bacterias gram positivas *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente. Además, el extracto microencapsulado, presentaba actividad antifúngica con una concentración mínima inhibitoria de 10 mg/mL contra el hongo *Aspergillus fumigatus*. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento que se ha descrito más arriba tanto para el extracto BV2 como para el extracto MC2. Por otro lado, se evaluó la actividad antioxidante mediante los métodos Folin-Ciocalteu y la metodología DPPH (véase descripción de estos métodos en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2), presentando valores de actividad antioxidante de 46,54 mg TE/g y 18,43 mg GAE/g mediante las metodologías DPPH y Folin-Ciocalteu, respectivamente. También se determinó un valor IC_{50} de 293 μ g/mL utilizando el método de actividad antioxidante biológico *in vitro* OxHLIA (véase descripción de este método en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2).

Preparación y caracterización del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. en forma de polvo liofilizado microencapsulado (en adelante, “extracto MC3”)

A partir del extracto MC2, se procedió a la encapsulación por *spray-drying* (Buchi, Mini Spray Dryer, modelo B-290), con maltodextrina como agente encapsulante, en una concentración de 25 % - 45 % (g/100 g), temperatura de 140 °C, aspiración a 95 %, flujo de alimentación de 5 mL/min y un flujo de aire de 7,88 L/min, obteniendo así el extracto microencapsulado procedente de *M. communis* (extracto MC3) con un tamaño de partícula de 0,5 - 40 μ m determinado mediante Mastersizer 3000 (Malvern, UK).

El extracto MC3 presentó un rendimiento de encapsulación de 69,6 % y un contenido de polifenoles totales de 112,09 mg GAE/g extracto microencapsulado (determinados por el método *Fast Blue BB*), siendo los ácidos hidroxibenzoicos los mayoritarios con 38,65 mg GAE/g de extracto microencapsulado, seguido por ácidos hidroxicinámicos con 6,83 mg GAE/g y flavonoles con 7,03 mg QE/g extracto microencapsulado, respectivamente. Todos estos valores fueron determinados siguiendo la metodología QUENCHER, tal como se describe anteriormente en la sección relativa a la preparación y caracterización de BV2.

Se determinó además un total de antocianinas monoméricas de 21,06 mg cya-3-gluE/g extracto microencapsulado, mediante el método espectrofotométrico del pH diferencial (véase descripción del método del pH diferencial en el Ejemplo 1). Además, se cuantificaron un total de 4 antocianinas mediante UHPLC-DAD, en las siguientes condiciones: Agilent LC-1290II, columna Poroshell 120 SB-C18, 4,6 mm x 75 mm, 2,7 μ m, 35 °C, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/Acetonitrilo. De este modo, se cuantificaron las siguientes antocianinas: delfinidina-3-O-glucosido (8,81 mg/g extracto seco, cianidina-3-O-glucósido (1,44 mg/g extracto seco), petunidina-3-O-glucósido (8,30 mg/g extracto seco) y malvidina-3-O-glucosido (8,64 mg/g extracto seco).

Respecto al perfil cromático de MC3, se estudió una muestra particular microencapsulada con 55% - 65% en peso de maltodextrina (i.e., 55 - 65 g maltodextrina/100 g muestra microencapsulada) como agente encapsulante, que presentó un perfil cromático característico que evolucionaba con el pH, a una concentración de 13 mg/mL de solución acuosa (Tabla 5):

5

Tabla 5:

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	7,12	6,23	5,63	5,63	2,01	2,90	2,93	2,81	0,97	2,40
a*	33,55	31,54	29,52	28,68	7,08	11,70	9,73	7,05	1,68	3,48
b*	10,92	9,66	8,30	7,41	0,87	-2,24	-2,46	-2,28	0,31	0,22
Color estándar más cercano	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 9005 ¹	RAL 9005 ¹

¹ Sistema RAL Classic.

- 10 Se consiguió obtener una gama de morados muy intensos con un color característico. Así, MC3 presentaba un color que actualmente no se encuentra en las opciones de colorantes alimentarios naturales disponibles en el mercado. Se comprobó además que el extracto MC3 era estable hasta un pH 7,0, a partir del cual se observaron coloraciones verde oliva (L * 2,40, a* 3,48 y b* 0,22), con color similar al RAL 9005 del sistema de color RAL Classic), mientras que el extracto MC2 no encapsulado comenzaba a degradarse a pH 6,5 (L * 3,29, a*7,87 y b* 0,59).

Además se confirmó la actividad conservante del extracto MC3 presentando actividad antimicrobiana contra 5 bacterias Gram negativas y 3 bacterias Gram positivas utilizadas como referencia, específicamente con CMI de 10 y 20 mg/mL contra las bacterias Gram negativas *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), respectivamente, y CMI/CMB de 5/20, 2,5/20 y 10/20 mg/mL contra las bacterias Gram negativas *Salmonella entérica* (ATCC 13076), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), respectivamente. Respecto a las bacterias Gram positivas, presentó CMI/CMB de 5/20, 20/20 y 10/20 mg/mL contra las bacterias *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente. Asimismo, el extracto microencapsulado presentó actividad antifúngica contra el hongo *Aspergillus fumigatus* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 10 mg/mL. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento que se ha descrito más arriba tanto para el extracto BV2 como para el extracto MC2. Por otro lado, se determinó que el extracto presentaba una actividad antioxidante de 41,57 mg GEA/g extracto microencapsulado y 83,90 mg TE/g extracto microencapsulado mediante las metodologías Folin-ciocalteu y DPPH (véase descripción de estos métodos en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2), respectivamente. También se determinó un valor IC₅₀ de 315 µg/mL utilizando el método de actividad antioxidante biológico in vitro OxHLIA (véase descripción de este método en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2).

Preparación de la composición colorante en forma de polvo liofilizado microencapsulado que comprende el extracto del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y el extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. (en adelante, referida como composición colorante “BV3:MC3”)

40

Finalmente, se mezclaron ambos extractos individuales, BV3 y MC3, en cantidades correspondientes a 50 %:50 % p/p $\pm$ 10 % de *Berberis vulgaris* L. y *Myrtus communis* L., dando lugar a una composición colorante de acuerdo con la invención, en forma de polvo liofilizado microencapsulado, que comprende extractos del fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y de la piel del fruto *Myrtus communis* L. (composición colorante BV3:MC3), en la siguiente tabla (Tabla 6) se observa el perfil cromático del extracto BV3:MC3 a diferentes pH a una concentración de 13 mg/mL de solución acuosa (Tabla 6).

Tabla 6:

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L'	12,12	12,60	13,09	15,79	18,85	21,53	23,15	22,68	21,86	20,42
a'	39,38	39,43	39,04	37,75	31,67	25,05	20,03	15,27	8,47	0,69
b'	19,97	20,58	19,04	9,38	1,37	0,35	1,22	3,50	7,74	13,38
Color estándar mas cercano	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	S 6030-R20B ¹	S 7020-R20B ¹	7645 C'	RAL 340-6 ³	RAL 8017 ⁴	RAL 080 20 10 ⁵

¹ Sistema NSC2050, ² Sistema Pantone® C (Coated), ³ Sistema RAL Effect, ⁴ Sistema RALClassic, ⁵ Sistema RAL Design

Ejemplo 4- Composición colorante de extractos del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. y la piel del fruto de *Myrtus communis* L. en forma de polvo liofilizado encapsulado (BV4:MC4)

A partir de la composición colorante BV2:MC2, obtenida según se describe en el Ejemplo 2, se procedió a realizar el proceso de encapsulación por *spray-drying* (Buchi, Mini Spray Dryer, modelo B-290) con maltodextrina como agente encapsulante a una temperatura de 120 °C, aspiración a 95 %, con un flujo de alimentación de 5 mL/min, un flujo de aire de 7,88 L/min y una proporción de 35 % - 45 % de agente encapsulante, obteniendo una composición colorante en forma de polvo liofilizado microencapsulado, que comprende extractos del fruto sin semillas de *Berberis vulgaris* L. y de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. (en adelante, referida como "composición colorante BV4:MC4"), con un tamaño de partícula de 0,5 - 25 μ m determinado mediante Mastersizer 3000 (Malvern, UK).

La composición BV4:MC4 encapsulada presentó un rendimiento de encapsulación de 69,64 %. Se determinó que contenía un total de polifenoles de 83,39 mg GAE/g extracto seco mediante el método Fast Blue BB en las condiciones descritas arriba en la sección correspondiente a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2, que permitió identificar los ácidos hidroxibenzoicos los mayoritarios con un total de 37,63 mg/g extracto seco, seguido de los ácidos hidroxicinámicos con 7,48 mg/ g de extracto seco y flavonoles con un total de 5,76 mg/g extracto seco, medidos siguiendo la metodología QUENCHER, tal como se describe anteriormente en la sección relativa a la preparación y caracterización de BV2.

Asimismo, se determinó una cantidad de antocianinas monoméricas totales de 12,78 mg cya-3-gluE/g extracto microencapsulado, analizado mediante el método espectrofotométrico del pH diferencial (véase descripción del método del pH diferencial en el Ejemplo 1). Además, se cuantificaron 5 antocianinas por UHPLC-DAD (Agilent LC- 1290II, columna Poroshell 120 SB-C18, 4,6 mm x 75 mm, 2,7 μ m, 35 °C, flujo 0,75 mL/min, ácido trifluoroacético (0,1%)/ Acetonitrilo): delfinidina-3-O-glucósido (4,17 mg/g extracto seco), cianidina-3-O-glucósido (1,17

mg/g extracto seco), petunidina-3-O- glucósido (3,70 mg/g extracto seco), pelargonidina-3-O-glucósido (0,03 mg/g extracto seco) y malvidina-3-O-glucósido (4,15 mg/g extracto seco).

Una composición BV4:MC4 microencapsulada como 35 % - 45 % en peso de maltodextrina (*i.e.*, 35 - 45 g maltodextrina/100 g muestra microencapsulada) como agente encapsulante, además, presentó el siguiente perfil cromático característico, conseguido entre pH 3,5 y 6, en solución acuosa, a una concentración de 13 mg/mL (Tabla 7):

Tabla 7:

pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	11,37	10,99	11,56	11,59	12,42	14,12	14,68	14,69	13,68	12,03
a*	35,89	34,79	34,70	33,28	30,33	26,37	20,97	14,98	5,80	-0,89
b*	17,14	16,35	14,85	8,85	0,90	-2,66	-2,78	-1,14	2,93	8,69
Color estándar más cercano	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	S 7020-R20B ¹	S 8010-R10B ¹	BS 3-039	No tiene

¹ Sistema NCS 2050, ² Sistema BS 2660.

El extracto BV4:MC4 permitió obtener un color característico y diferente a los obtenidos con el extracto de BV o extracto de MC de forma individual, concretamente se obtuvo un color magenta intenso a pH 4,5 y a pH 5,5 presentó un color similar al S7020-R20B del sistema de color NCS 2050 ya pH 6,0 un color próximo al S8010-R10B del sistema de color anterior. Se identificó experimentalmente, además, que el extracto era estable hasta un pH 7, a partir del cual se obtenían coloraciones verdosas (L* 12,03, a* -0,89 y b* 8,69). Así mismo, el extracto BV4:MC4 presentó actividad conservante con actividad antimicrobiana frente a 5 bacterias Gram negativas y 3 bacterias Gram positivas utilizadas como cepas de referencia, CMI/CMB de 10/20, 5/20, 10/20, 2,5/20 y 20/>20 mg/mL frente a las bacterias Gram negativas *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 9027), *Salmonella enterocolitica* (ATCC 13076) y *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610), respectivamente, y CMI/CMB 2,5/20, 10/20 y 10/20 mg/mL frente a las bacterias Gram positivas *Basillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente. Por otro lado, el extracto BV4:MC4 presentó actividad antifúngica con una concentración mínima inhibitoria de 20 mg/mL frente al hongo, *Aspergillus fumigatus*. Para ello, se utilizó el mismo procedimiento que se ha descrito más arriba tanto para el extracto BV2 como para el extracto MC2. Además, esta composición BV4:MC4 microencapsulada presentaba una actividad antioxidante de 28,91 mg GAE/g y 45,84 mg TE/g extracto microencapsulado mediante las metodologías Folin-Ciocalteu y DPPH, respectivamente, tal como se describe arriba, en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2. También se determinó un valor IC₅₀ de 228 µg/mL utilizando el método de actividad antioxidante biológico *in vitro* OxHLIA (véase descripción de este método en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2).

Ejemplo 5 - Prototipo de gelatina formulada con una composición colorante de la presente invención (BV2:MC2) vs prototipo de gelatina formulada con BV2 únicamente (comparativo) vs prototipos formulados con colorantes comerciales sintéticos (comparativos)

Prototipo de gelatina formulada con BV2 únicamente

Este prototipo se formuló, por cada 100 g de gelatina, con 85 - 90 % en peso de agua, 8 - 10 % en peso de azúcar como edulcorante, 1,53 - 2,5 % en peso de gelatina (como ingrediente gelificante base), 0,1 - 0,5 % en peso del E330, 0,30 - 0,35 % en peso del extracto BV2, y aroma. Se consiguió una gelatina con un pH de 3 - 3,5, unos parámetros de CIELAB de L*: 38,35, a*: 39,79, b*: 15,21, que corresponden con una tonalidad roja (color próximo al RAL 020 40 40 del sistema RAL Design o 21105 del sistema Federal Estándar 595C de US Federal Standard color guides), donde los parámetros CIELAB se vieron influenciados por la matriz alimenticia propia de la formulación de la gelatina.

También se obtuvo un contenido en antocianinas totales de 0,04 mg cya-3-gluE/ g gelatina, determinado mediante el método espectrofotométrico del pH diferencial (véase descripción del método del pH diferencial en el Ejemplo 1). Por otro lado, se determinó una vida útil de 15 días (i.e., periodo en el que se determina la ausencia de crecimiento microbiano por gramo de material analizado, de: Enterobacterias (ausencia/g) y *Salmonella* (ausencia/25 g), o máximo de aerobios mesófilos (10^3 u.f.c./g) y *Listeria monocytogenes* (100 u.f.c./g), según Reglamento (CE) n° 2073/2005.

Prototipo de gelatina formulada con BV2:MC2

Este prototipo se formuló, por cada 100 g de gelatina, 85 - 90 % en peso de agua, 8 - 10 % en peso de azúcar como edulcorante, 1,53 - 2,5 % de gelatina (como ingrediente gelificante base), 0,1 - 0,5 % en peso de ácido cítrico (E330), con 0,20 - 0,25 % en peso de la composición BV2:MC2 (la composición BV2:MC2 contiene 50 %:50 % p/p $\pm$ 10 %), y aroma. Se consiguió una gelatina con un pH de 3 - 3,5 y unos parámetros de CIELAB en el producto final de L*: 23,69, a*: 35,50, b*: 10,49, que corresponden con una tonalidad magenta (color próximo al S 5040-R10B del sistema NCS 2050 o 7421 C del sistema de color Pantone® C).

Prototipos de gelatina formulados con colorantes comerciales sintéticos

A modo comparativo con la oferta de gelatinas encontrada en el mercado, se realizaron otros prototipos formulados con colorantes comerciales: E-124 (colorante sintético Ponceau 4R) para la tonalidad roja, y E-163 (colorante natural, antocianinas procedentes de zumo de zanahoria morada, de rábano o de uva) y E-133 (azul brillante FCF) para la tonalidad morada. En ambos casos la formulación base fue la misma, variando únicamente el % de colorante incorporado en la mezcla: se adicionó 0,05 - 0,1 % en peso en el caso del colorante sintético E-124; 0,15 - 0,25 % en peso en el caso del colorante natural comercial E-163 o 0,15 - 0,25 % en peso de la mezcla de los colorantes sintéticos comerciales en proporción 1:4 (E133:E124).

Tabla 8:

Parámetros CIELAB	Prototipo formulado con Extracto BV2	Prototipo formulado con Extracto BV2:MC2	Prototipo formulado con E-124	Prototipo formulado con E-163	Prototipo formulado con E-163 + E-133
L*	38,35	23,69	39,76	40,16	33,72
a*	39,79	35,50	37,34	37,56	9,14
b*	15,21	10,49	16,62	9,88	-14,85

Color estándar más próximo	RAL 020 40 40 ¹	S 5040-R108 ²	LPC 0486 ³	RAL 530 -1 ⁴	TSD 13-2-5 ⁵
-----------------------------------	----------------------------	--------------------------	-----------------------	-------------------------	-------------------------

¹ Sistema RAL Design, ² Sistema NCS 2050, ³ Sistema Isomat, ⁴ Sistema RAL Effect, ⁵ Sistema DIN 6164.

Como se puede observar por los valores CIELAB, obtenidos a pH 3,5 (Tabla 8), al utilizar los colorantes alimentarios comerciales se obtuvieron tonalidades totalmente distintas (coloración rojiza en el caso de los prototipos formulados individualmente con E-124 o E-163; coloración azulada en el caso del prototipo formulado con la combinación de E-124 y E-163) a las observadas con las composiciones de la presente invención, ilustradas por el prototipo de gelatina formulado con BV2:MC2, que condujo a una tonalidad magenta a estos valores de pH.

Estudio comparativo del perfil cromático y parámetros CIELAB del colorante E-163, extracto de *Berberis vulgaris* L. (BV3) en forma de liofilizado en polvo microencapsulado, extracto de *Mvrtus communis* L. en forma de liofilizado en polvo microencapsulado (MC3), composición colorante BV3:MC3 y composición colorante BV4:MC4 microencapsulada

En la Tabla 9, se han analizado muestras correspondientes al actual colorante E-163 disponible en el mercado, procedente de diferentes fuentes naturales, como la zanahoria morada, la col lombarda, el rábano y la uva, frente a muestras de BV3, MC3, BV3:MC3 y la composición BV4:MC4 de acuerdo con la presente invención:

Tabla 9:

E163										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	21,04	20,17	18,72	13,71	15,03	13,93	12,86	11,14	9,61	5,98
a*	45,17	44,29	42,69	41,17	39,25	37,44	34,43	31,72	28,08	17,82
b*	34,47	32,82	29,56	25,00	16,41	9,95	4,47	4,47	-1,51	-4,68
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene
BV2										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	12,87	12,77	13,22	14,88	17,45	19,32	20,09	20,16	19,09	17,32
a*	37,05	35,30	35,22	34,07	30,63	26,20	22,33	18,48	13,81	8,83
b*	17,83	16,69	16,52	14,62	9,14	7,72	7,81	9,33	11,67	13,16
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 020 20 29 ¹	RAL 020 20 29 ¹	BS 452 ²	BS44 9 ²	S 8010 - Y10 R ³	RAL 050 20 16 ¹

MC2										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	11,37	11,42	12,29	15,19	17,38	14,07	6,82	4,22	3,29	1,73
a*	35,85	34,61	34,04	31,47	26,24	23,20	20,68	13,71	7,87	2,47
b*	16,22	15,45	12,77	5,64	2,84	0,27	-0,17	0,05	0,59	0,07
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 010 20 25 ¹	S70 2 0-R20 B ²	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 900 5 ³
BV2:MC2										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	7,03	6,59	6,90	6,74	6,58	7,00	7,06	6,57	7,23	7,40
a*	27,95	25,55	22,09	22,87	20,39	17,60	14,05	8,20	4,87	1,20
b*	8, 17	7,07	5,12	4,22	2,40	0,72	-0,74	-1,59	-0,80	0,89
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 8022 ¹	RAL 8022 ¹
BV3 (40 % en peso de maltodextrina)										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	18,89	19,43	21,58	25,33	29,39	33,00	33,18	33,18	32,49	30,29
a*	41,75	41,43	40,53	36,16	27,69	20,41	17,46	14,20	9,95	6,13
b*	27,92	27,46	22,60	12,72	8,71	8,65	9,20	11,08	14,58	18,38
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 3004 ¹	SW 7578 ²	PP G1 3-03 ³	LPC 0416 ⁴	PPG1 060-7 ³	70Y R 08/1 8 6 ⁵	RAL 070 30 20 ⁶
MC3 (40 % en peso de maltodextrina)										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	7,12	6,23	5,63	5,63	2,01	2,90	2,93	2,81	0,97	2,40
a*	33,55	31,54	29,52	28,68	7,08	11,70	9,73	7,05	1,68	3,48
b*	10,92	9,66	8,30	7,41	0,87	-2,24	-2,46	-2,28	0,31	0,22
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	RAL 9005 ¹	RAL 900 5 ¹
BV3:MC3 (40% en peso de maltodextrina)										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0

L*	12,12	12,60	13,09	15,79	18,85	21,53	23,15	22,68	21,86	20,42
a*	39,38	39,43	39,04	37,75	31,67	25,05	20,03	15,27	8,47	0,69
b*	19,97	20,58	19,04	9,38	1,37	0,35	1,22	3,50	7,74	13,38
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	s 6030-R20B ¹	s 7020-R20B ¹	7645 C ²	RAL 340-6 ³	RAL 8017 ⁴	RAL 0802010 ⁵
BV4:MC4 (40 % en peso de maltodextrina)										
pH	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
L*	11,37	10,99	11,56	11,59	12,42	14,12	14,68	14,69	13,68	12,03
a*	35,89	34,79	34,70	33,28	30,33	26,37	20,97	14,98	5,80	-0,89
b*	17,14	16,35	14,85	8,85	0,90	-2,66	-2,78	-1,14	2,93	8,69
Color estándar más próximo	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	No tiene	S 7020-R20B ¹	s 8010-R10B ¹	BS 3-039	No tiene

¹ Sistema NCS 2050, ² Sistema DIN 6164, ³ Sintema Pantone® U (Uncoated), ⁴ Sistema RAL Design, ⁵ Sistema Dulux Trade, ⁶ Sistema Pantone® C (Coated), ⁷ Sistema RAL Effect

5 La industria alimentaria no dispone en la actualidad de aditivos colorantes de origen natural que presenten tonalidades magenta-morada, por lo que es necesario recurrir al uso de la mezcla de colorantes sintéticos con tonalidades azules tales como E-131 (azul patente), E-132 (indigotina), E-133 (azul brillante FCF) con E-163 (antocianina) u otros colorantes con tonalidades rojas tipo E-122 (azorrubina), E-124 (Ponceau 4R), etc. El colorante E-163, disponible en el mercado, y analizado en la Tabla 9, proporciona una coloración roja-granate, pero no consigue alcanzar una tonalidad magenta-morada, a diferencia de lo que sucede con las composiciones de la presente invención.

15 En relación a la capacidad antioxidante del colorante comercial E163, se comprobó que presentó unos valores de DPPH y Folin-Ciocalteu de 48,25 mg TE/g y 49,22 mg TE/g extracto, respectivamente, determinados según se describe en la sección relativa a la preparación y caracterización del extracto BV2 en el Ejemplo 2. También se determinó, mediante el método in vitro biológico OxHLIA, un valor de IC₅₀ de 225 µg/mL de extracto. Asimismo, se evidenció que el colorante natural comercial E-163 presentaba actividad conservante, presentando actividad antimicrobiana frente a 4 bacterias utilizadas como cepas de referencia, con CMI/CMB de 20/>20, 10/>20 y 2,5/20 mg/mL frente a las bacterias Gram negativas *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella enterica* (ATCC 13076), respectivamente y 2,5/20 y 10/>20 mg/mL frente a las bacterias Gram negativas *Basillus cereus* (ATCC 11778) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), respectivamente. Dicho colorante también presentaba actividad antifúngica con una concentración mínima inhibitoria de 20 mg/mL frente al hongo *Aspergillus fumigatus*. Con estos datos se evidencia la superioridad en capacidad conservante de la presente invención.

Con la presente invención, se consiguen una serie composiciones colorantes basadas en extractos de origen natural con poder colorante en diferentes presentaciones (extracto hidroalcohólico, extracto liofilizado en polvo y extracto microencapsulado en polvo) que podrán servir como alternativa en la industria alimentaria para la formulación de una amplia gama de alimentos cuya matriz alimenticia tenga un pH entre 2,5 y 6,0, preferiblemente 3,0 - 3,5 y/o 5,5 - 6, aportando tonalidades color magenta - morado sin la necesidad de recurrir al uso de aditivos sintéticos, con el potencial beneficio para la salud derivado de ello (e.g., disminución de TDHA, reacciones alérgicas, etc.).

Estudio de la actividad antimicrobiana y antifúngica de los extractos BV2, MC2, BV3 y MC3, de las composiciones BV2:MC2 y BV4:MC4, y del colorante E-163

En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos BV2, MC2, BV3 y MC3, y las composiciones BV2:MC2 y BV3:MC3, obtenidas según se describe en los Ejemplos anteriores, así como también de los resultados obtenidos con el colorante comercial E-163. Todos estos resultados fueron obtenidos mediante el método de descrito en el Ejemplo 2 de la presente invención:

Tabla 10:

	BV2	MC2	BV2:MC 2	BV3	MC3	BV4:MC 4	E163
Actividad antimicrobiana							
<i>Enterobacter cloacae</i> (CMI/CMB, µg/mL)	5/10	10/20	5/20	5/20	10/>20	10/20	20/>20
<i>Escherichia coli</i> (CMI/CMB, µg/mL)	2,5/10	5/>20	2,5/20	5/20	5/20	5/20	10/>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CMI/CMB, µg/mL)	5/10	10/20	5/20	10/20	20/>20	10/20	>20/>20
<i>Salmonella enterica</i> (CMI/CMB, µg/mL)	1,25/20	2,5/20	2,5/20	2,5/20	2,5/20	2,5/20	2,5/20
<i>Yersinia enterocolitica</i> (CMI/CMB, µg/mL)	10/20	10/20	10/20	10/10	10/20	20/>20	5/10
<i>Bacillus cereus</i> (CMI/CMB, µg/mL)	1,25/10	0,6/20	0,6/10	2,5/20	5/20	2,5/20	2,5/20
<i>Listeria monocytogenes</i> (CMI/CMB, µg/mL)	5/>10	0,6/20	0,6/10	5/20	20/20	10/20	10/>20
<i>Staphylococcus aureus</i> (CMI/CMB, µg/mL)	2,5/20	0,6/20	0,6/10	5/20	10/20	10/20	2,5/20
Actividad antifúngica							
<i>Aspergillus Brasiliensis</i> (CMI/CMF, µg/mL)	>20/>20	>20/>20	>20/>20	>20/>20	>20/>20	>20/>20	>20/>20
<i>Aspergillus fumigatus</i> (CMI/CMF, µg/mL)	10/>20	20/>20	5/>20	10/>20	10/>20	20/>20	10/>20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición colorante basada en antocianinas, caracterizada por que comprende un extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, que comprende una cantidad de dicho extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 40 % y un 60 % en peso, respecto al peso total de la composición, y/o una cantidad de dicho extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 40 % y 60 % en peso, respecto al peso total de la composición.
- 15 3. Composición según la reivindicación anteriores, que comprende una cantidad de dicho extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. comprendida entre un 45 % y un 55 % en peso, respecto al peso total de la composición, y/o una cantidad de dicho extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. comprendida entre un 45 % y 55 % en peso, respecto al peso total de la composición.
- 20 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que está en forma líquida o en forma de polvo liofilizado.
- 25 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que está en forma líquida o en forma de solución hidroalcohólica.
- 30 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que está en forma de polvo liofilizado encapsulado.
- 30 7. Composición según la reivindicación 6, en la que el polvo liofilizado encapsulado esta microencapsulado.
- 35 8. Composición según la reivindicación 6 o 7, que además comprende al menos un agente encapsulante.
- 35 9. Método de preparación de una composición colorante basada en antocianinas, caracterizado por que comprende:
 - 40 a) someter al menos una porción de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. a extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de fruto desprovisto de semillas *Berberis vulgaris* L.,
 - b) someter al menos una porción de piel de fruto de *Myrtus communis* L. a extracción hidroalcohólica para obtener un extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L., y
 - 45 c) mezclar una cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de la etapa a) y una cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. resultante de la etapa b).
- 50 10. Método según la reivindicación 9, en donde la cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L y la cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis*

L que se mezclan en la etapa c) están comprendidas cada una de ellas independientemente entre 40-60 % en peso, respecto al peso total de la composición colorante.

11. Método según la reivindicación 9 o 10, en donde la cantidad del extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L y la cantidad del extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L que se mezclan en la etapa c) están comprendidas cada una de ellas independientemente entre 45-55 % en peso, respecto al peso total de la composición colorante.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde, antes de la etapa a) y/o la etapa b), se somete dicha porción de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. y/o dicha porción de piel del fruto de *Myrtus communis* L., respectivamente, a una etapa de liofilización.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde, en la etapa a) y/o en la etapa b), se lleva a cabo dicha extracción hidroalcohólica con sonda de ultrasonidos.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde, en la etapa a), se lleva a cabo dicha extracción hidroalcohólica con una proporción de dicho fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L respecto a disolvente hidroalcohólico de entre 20 y 28 g/L.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en donde, en la etapa a), se lleva a cabo dicha extracción hidroalcohólica en un medio hidroalcohólico que proporciona un medio ácido, preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 2 y 4, más preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 3 y 3,5.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-15, en donde, en la etapa b), se lleva a cabo el tratamiento de extracción hidroalcohólica en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH ácido, preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 5 y 7, más preferiblemente en un medio hidroalcohólico que proporciona un pH comprendido entre 5,5 y 6,5.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-16, en donde el extracto de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de la etapa a) y el extracto de la piel del fruto de *Myrtus communis* L. resultante de la etapa b) se someten cada uno de ellos independientemente a una etapa de liofilización previamente a la etapa c).

18. Método según la reivindicación 17, en donde se lleva a cabo, de manera independiente, la encapsulación del extracto liofilizado de fruto desprovisto de semillas de *Berberis vulgaris* L. resultante de dicha liofilización y del extracto liofilizado de la piel de fruto de *Myrtus communis* L. resultante de dicha liofilización, en presencia de al menos un agente de encapsulación, antes de llevar a cabo la etapa c).

19. Método según la reivindicación 17, en donde la mezcla resultante de la etapa c) se encapsula en presencia de al menos un agente de encapsulación.

20. Composición colorante basada en antocianinas, caracterizada por ser obtenida mediante el método definido según cualquiera de las reivindicaciones 9-19.

21. Uso de la composición colorante definida según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 20, caracterizado por ser como colorante alimentario.

22. Uso de la composición según la reivindicación 21, como colorante alimentario en condiciones de pH comprendido entre 3,0 y 6,0.
- 5 23. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 21-22, como colorante alimentario en condiciones de pH comprendido entre 3,0 y 3,5.
24. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, como colorante alimentario en condiciones de pH comprendido entre 5,5 y 6,0.
- 10 25. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 21-24, que además comprende el uso como conservante.
26. Uso de la composición según la reivindicación 25, en donde dicho uso como conservante comprende el uso como agente antibacteriano y/o antifúngico.
- 15 27. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 21-26, en donde dicho uso además comprende el uso como agente antioxidante.
- 20 28. Producto alimentario caracterizado porque comprende la composición colorante definida según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 20.

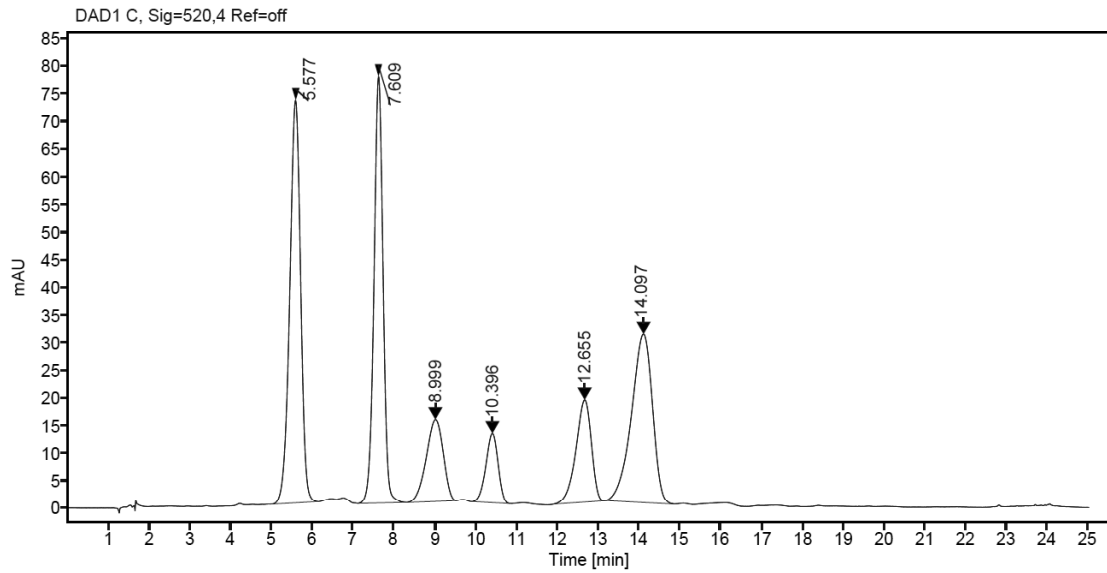


Figura 1

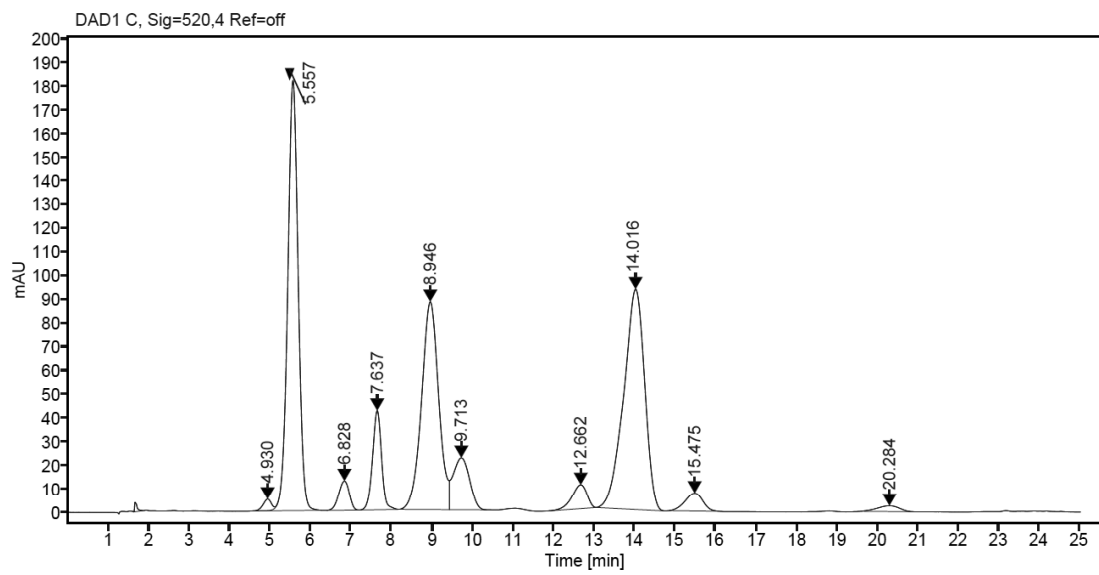


Figura 2

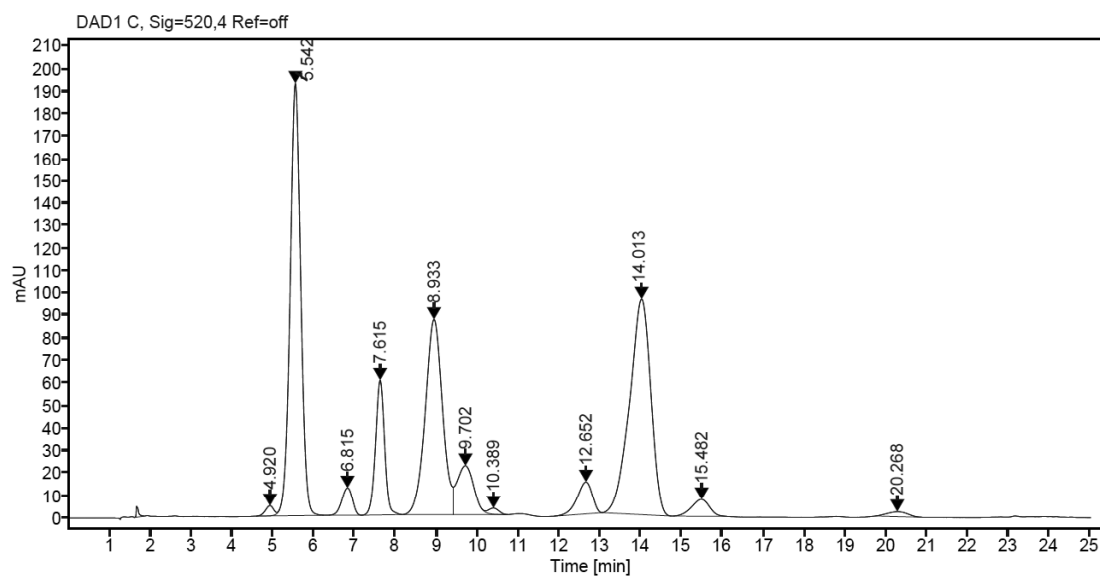


Figura 3



- 21 N.º solicitud: 202430760
- 22 Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2024
- 32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.:
A23L5/43 (2016.01)
C09B61/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TAMAYO-VIVES, CRISTINA, et al. Wild fruits of <i>Crataegus monogyna</i> Jacq. and <i>Sorbus aria</i> (L.) Crantz: from traditional foods to innovative sources of pigments and antioxidant ingredients for food products. Foods, 2023, Vol. 12, Nº 12, artículo nº 2427, ISSN: 2304-8158 resumen	1-28
A	VEGA, ERIKA N., et al. Wild sweet cherry, strawberry and bilberry as underestimated sources of natural colorants and bioactive compounds with functional properties. Food Chemistry, 2023, Vol. 414, artículo nº.135669, ISSN 0308-8146 resumen	1-28
A	US 2013281548 A1 (EPCB-N) EPC BEIJING NATURAL PROD CO LTD (EPCB-N) EPC BEIJING PLANT PHARM TECHNOLOGY CO) 2013-10-24, reivindicaciones	1-28
A	US 2008255226 A1 (OMNI-N) OMNICA GMBH (EIDE-I) EIDENBERGER T 2008-10-16, reivindicaciones	1-28

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23L, C09B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT, INTERNET