

Evaluación de la estabilidad de las antocianinas como una alternativa natural de color en una bebida con sabor y sin calorías

Flor Amalia Landaverri Escobar^a y Ana Silvia Colmenares Samayoa de Ruiz^b

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle de Guatemala

^a florlandaverri@gmail.com

^b asruiz@uvg.edu.gt

RESUMEN: El objetivo principal de este trabajo fue evaluar las antocianinas como una alternativa al uso del colorante artificial rojo allura AC en una bebida sin calorías y con sabor natural. Se desarrolló la formulación de una bebida de fresa, sin calorías, con colorante natural, para lo cual se evaluó las antocianinas de extracto de col roja y de zanahoria negra como colorantes naturales. Las características sensoriales (color, sabor, dulzor y apariencia en general) fueron mejor evaluadas en la bebida con antocianinas provenientes de extracto de zanahoria negra. En el estudio de estabilidad se determinó que las formulaciones conservaron sus parámetros fisicoquímicos de °Brix, pH, acidez titulable y porcentaje de acidez, en distintas condiciones de almacenamiento a diferentes temperaturas; en cuanto al color, hubo mayor estabilidad en la bebida con extracto de zanahoria negra.

PALABRAS CLAVE: bebida, antocianinas, capacidad antioxidante.

Evaluation of anthocyanin stability as a natural color alternative in a flavored beverage without calories

ABSTRACT: The main objective of this research was to evaluate anthocyanins as an alternative to the use of allura red AC in a flavored beverage without calories and with natural flavor. A formula of a strawberry drink, without calories, was developed with natural coloring, for which the anthocyanins of red cabbage

extract and black carrot were evaluated as natural colorants. The sensory characteristics (color, taste, sweetness and appearance in general) were better evaluated in the drink with anthocyanins from black carrot extract. In the stability study it was determined that the formulas conserved their physicochemical parameters of ° Brix, pH and percentage of acidity, in different storage conditions at different temperatures; regarding color, there was greater stability in the drink with black carrot extract.

KEYWORDS: beverage, natural colors, anthocyanins, antioxidant capacity.

Introducción

En los últimos años se ha visto la necesidad de las industrias de alimentos a reformular sus productos existentes y a desarrollar nuevos productos con ingredientes y dosificaciones que no perjudiquen la salud del consumidor, esto debido a exigencias de gobierno y las preferencias de los clientes. Los productos con colorantes naturales se asocian al cuidado de la salud, mientras que los pigmentos sintéticos son evaluados críticamente.

Las antocianinas son compuestos naturales pertenecientes a un grupo de constituyentes flavonoides bioactivos (Castañeda, 2009). Estos son los pigmentos hidrosolubles más abundantes

y ampliamente distribuidos en tubérculos, pétalos, hojas, flores, frutas y verduras, responsables de la amplia gama de colores rojo, azul y púrpura. No se ha observado efectos tóxicos de este grupo de compuestos al utilizarse como colorantes naturales en alimentos procesados, y por el contrario, se ha encontrado que los extractos de las antocianinas están asociados a beneficios para la salud, dentro de los cuales cabe mencionar: mejora de la agudeza visual (Timberlake y Henry, 1988), capacidad antioxidante (Degenhardt *et al.*, 2000), tratamiento para diversos trastornos de la circulación de la sangre resultantes de la fragilidad capilar (Wang *et al.* 1997), propiedades vaso-protectoras y anti-inflamatorias (Lietti *et al.* 1979), inhibición de la agregación de plaquetas (Morazzoni y Magistretti, 1986), mantenimiento de la permeabilidad vascular normal (Wang *et al.* 1997), control de la diabetes, agentes neoplásicos y quimioprotectores (Kamei *et al.* 1995), y posiblemente otras propiedades debido a la acción de varias enzimas y procesos metabólicos (Wang *et al.* 1997).

Además de los beneficios que pueden tener las antocianinas, es importante reconocer que estas son sensibles al pH y la temperatura (Hernandez-Herrero y Frutos, 2014). Es por ello que la aplicación en sistemas alimentarios no es sencilla. En el estudio anterior, se evaluó las antocianinas como fuente potencial de color en alimentos. Se almacenaron jugos concentrados de uva, fresa y de cáscara de ciruela por ocho semanas en oscuridad a temperaturas de 6°C y 23°C. La estabilidad del color se determinó en pH de 2.4, 3.1, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.1, y además se valoró la capacidad antioxidante a pH 4.0. El color de los jugos se mantuvo estable durante las ocho semanas, por lo que se determinó en este estudio que las temperaturas de almacenamiento no fueron un factor decisivo para la conservación de color, a excepción del jugo de fresa en la que se presentó gran pérdida de color a 23°C. El jugo de cáscara de ciruela fue el que mostró mayor contenido en fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante y se puede almacenar durante 4 semanas a temperatura ambiente sin disminuciones significativas en la capacidad antioxidante. El color de los jugos de cáscara de ciruela fue estable hasta pH 5 durante las 8 semanas de almacenamiento a los 6 y 23°C.

La finalidad del presente estudio fue evaluar las antocianinas como una alternativa al uso del colorante artificial rojo allura AC en una bebida sin calorías y con sabor natural. Para ello fue necesario realizar un estudio con consumidores para conocer su percepción hacia las bebidas envasadas y hacia los colorantes naturales y sintéticos. Esto se hizo por medio de encuestas. Teniendo esto, se desarrolló una formulación de fresa, sin calorías, utilizando rojo allura AC, para tener una bebida de referencia. Luego se formuló la bebida realizando la sustitución del rojo allura AC, por antocianinas, para ello se trabajó con extractos de zanahoria negra y col roja. Así también se hicieron pruebas sensoriales para conocer el grado de aceptabilidad de la bebida por los consumidores. Se llevó a cabo un estudio de estabilidad evaluando parámetros fisicoquímicos y sensoriales. Además, se analizó el contenido total de antocianinas monoméricas y capacidad antioxidante.

Se desarrolló una bebida sin carbonatación, con sabor a base de compuestos destilados de fresa, sin calorías (edulcorada con estevia y sucralosa), con antocianinas.

Materiales y métodos

Evaluación de percepción del mercado

Se elaboró una encuesta para conocer la percepción que tienen las personas a las bebidas envasadas, a los edulcorantes, y a los colorantes, tanto naturales como artificiales. La encuesta contenía 16 preguntas la cual se pasó a 50 hombres y mujeres entre 15-40 años. Las personas encuestadas eran estudiantes universitarios, profesionales y catedráticos de instituciones educativas.

Formulación de bebida sabor a fresa, sin calorías, utilizando colorante artificial rojo allura

Se desarrolló una bebida de fresa sin carbonatación y sin calorías. El sabor fue proporcionado por la casa de sabores IFF, y estaba elaborado a base de compuestos destilados de la fresa. Para endulzar la bebida se empleó los edulcorantes sucralosa y estevia. Como acidulante se utilizó ácido cítrico y ácido málico, como antioxidante se usó EDTA, y además se añadió citrato de sodio como regulador de la acidez. Para darle color, se empleó el colorante artificial rojo allura AC. No se realizó ningún tratamiento térmico a la bebida y se envasó en recipientes de 355 mL de polietileno-tereftalato (PET) transparente.

Formulación de bebida de fresa, sin calorías utilizando antocianinas como fuente de colorante.

Al tener la fórmula aprobada de la bebida coloreada con rojo allura AC, se realizó la sustitución del colorante artificial a uno natural. Se hicieron aplicaciones en bebidas de tal manera que se obtuviera una tonalidad de color similar a la referencia la cual era la bebida con el colorante artificial.

Pruebas sensoriales

Se hicieron pruebas hedónicas para determinar el nivel de agrado que tienen los consumidores hacia el producto donde ellos evaluaron características de sabor, color, aroma, y apariencia general de las bebidas. Ellos debían indicar su nivel de agrado para cada atributo, las opciones eran: me gusta mucho, me gusta moderadamente, no me gusta ni me disgusta, me disgusta moderadamente, me disgusta mucho. Esta prueba la realizaron 40 personas, para ello no era necesario que pertenecieran a un panel entrenado.

Estudio de estabilidad de bebida por medición de parámetros fisicoquímicos.

Se cuantificaron los parámetros siguientes: a) °Brix, por medio de un refractómetro automático (modelo RFM91 marca Bellingham + Stanley), b) pH, (potenciométrico Titroline 6000), c) acidez titulable, equivalente a la cantidad de NaOH, 0.1 N, que se utiliza en llevar 100 mL de muestra a un pH igual a 8.70, d) Porcentaje de acidez, equivalente a la cantidad de NaOH, 0.1 N, hasta alcanzar un pH de 8.30, e) color, se utilizaron 100 mL de cada bebida en la celda de un colorímetro (Hunter Lab modelo ColorQUEST II).

Se reportó de acuerdo al estimado calculado con la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de acidez (\% de ácido cítrico)} = \frac{V_b \times N \times \text{Milieq} \times 100}{V_a}$$

En donde:

V_b = volumen en mL gastados.

N = normalidad del agente titulante (NaOH)

Milieq = miliequivalentes del ácido predominante en la muestra ácida (en este caso ácido cítrico). El factor de acidez del ácido cítrico es 0.064.

V_a = volumen de la muestra.

Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas

El contenido total de antocianinas monoméricas se determinó utilizando el método diferencial de pH (Lee, 2005). Este método se basa en la transformación estructural del cromóforo de la antocianina entre el pH 1.0 y 4.5. El procedimiento seguido, en forma breve, fue el siguiente: a) se diluyeron alícuotas de 10 mL de las bebidas formuladas en 40 mL de amortiguadores de pH 1.0 y 4.5 respectivamente y luego se colocaron en la oscuridad por 50 minutos, b) se obtuvo la absorbancia de cada solución a 515 y 700 nm utilizando un espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation modelo Genesys 10 UV scanning). La absorbancia se calculó con la ecuación siguiente:

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{\lambda_{\text{vis-max}}} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 1.0} - (\text{Abs}_{\lambda_{\text{vis-max}}} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

El coeficiente de extinción molar de cianidina 3-glucósido es 26,900. El total del contenido de antocianinas monoméricas se calculó y expresó como equivalentes de cianidin-3-glucósido, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de antocianina (mg / L)} = \text{Abs} \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000 / (\epsilon \times L)$$

En donde:

Abs = absorbancia

ε = absorbancia molar de cianidin 3-glucósido (26,900)

L = longitud de la celda (1 cm)

M = peso molecular de la antocianina (449.2 D)

DF = factor de dilución de la muestra

Determinación de capacidad antioxidante por el método del 2-2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

La metodología empleada fue la siguiente (Brand-Williams, 1995). a) Se preparó una solución de 6 x 10⁻⁵ M de DPPH en metanol. Inmediatamente, se forró el balón con papel aluminio para evitar interferencias con la luz, b) se prepararon las muestras como se indica en la Tabla 1:

Tabla 1. Preparación de las muestras

# Tubo	Bebida (mL)	Metanol (mL)	DPPH (mL)
1	0.02	2.98	3.9
2	0.03	2.97	3.9
3	0.06	2.94	3.9
4	0.09	2.91	3.9
5	0.12	2.88	3.9
6	0.15	2.85	3.9
7	0.18	2.82	3.9
8	0.21	2.79	3.9
9	0.24	2.76	3.9
10	0.27	2.73	3.9

c) Se agitaron en un vortex durante 15 segundos individualmente, d) Luego de eso, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm, utilizando como blanco al metanol puro, e) se colocaron las muestras en un lugar oscuro durante 2 horas, f) se repitió la lectura de absorbancia agitando previamente en el Vortex por 15 segundos más, g) el porcentaje de pérdida de absorbancia se estimó con la ecuación siguiente:

$$\text{Porcentaje de pérdida de absorbancia (\%)} = \left[\frac{(\text{abs}_0 - \text{abs}_{30})}{\text{abs}_0} \right] \times 100$$

h) Finalmente se empleó un modelo lineal para determinar el valor del IC50. Mientras más bajo fuese el valor, mayor era la capacidad antioxidante (Brand-Williams, 1995).

Tabla 2. Fórmula 1: Bebida de fresa, sin calorías empleando rojo allura AC (rojo 40) como colorante artificial

Ingrediente	Funcionalidad	Peso (kilogramos)
Agua	Base	995.340
Sucralosa	Edulcorante	0.100
Estevia	Edulcorante	0.020
Benzoato	Preservante	0.250
Ácido cítrico	Acidulante	1.170
Ácido málico	Acidulante	0.330
Citrato	Regulador de la acidez	0.230
EDTA	Antioxidante	0.100
Sabor natural a fresa	Saborizante	2.380
Rojo allura AC (Rojo 40)	Colorante	0.080
Azul brillante FCF (azul 1)	Colorante	8.600E-05
TOTAL		1000 L de bebida terminada

Resultados y discusión

Evaluación de percepción del mercado

Los resultados obtenidos en esta evaluación fueron los siguientes: a) preferencia por bebidas no carbonatadas y más saludables, y b) rechazo a los productos bajos o sin azúcar cuando estos no tienen un sabor adecuado, contienen edulcorantes como el aspartame, y cuando el perfil del dulzor del edulcorante presenta resabios o notas desagradables. Además, debido a la naturaleza de la población encuestada, se confirmó que los encuestados poseen criterios formados respecto a las ventajas de los colorantes naturales y sus propiedades antioxidantes. Esta información fue indispensable para la siguiente etapa del estudio que fue la formulación de la bebida.

Formulación de bebida de fresa, sin calorías, utilizando colorante artificial rojo allura AC

Se decidió desarrollar la bebida sin carbonatación debido a los resultados de la encuesta. Se ocupó el sabor elaborada con destilados de fresa y se endulzó con estevia. Se usó ácidos cítrico y málico como acidulante. Se añadió citrato de sodio como un regulador de la acidez. Como antioxidante se utilizó EDTA. Y para darle el color a la bebida se usó rojo allura AC. Se añadió un mínimo porcentaje de azul brillante FCF, para modificar ligeramente la tonalidad del color. El color que se obtuvo fue un rojo brillante, ver Tabla 2.

Tabla 3. Fuentes de antocianina que se recopilaron de distintos proveedores

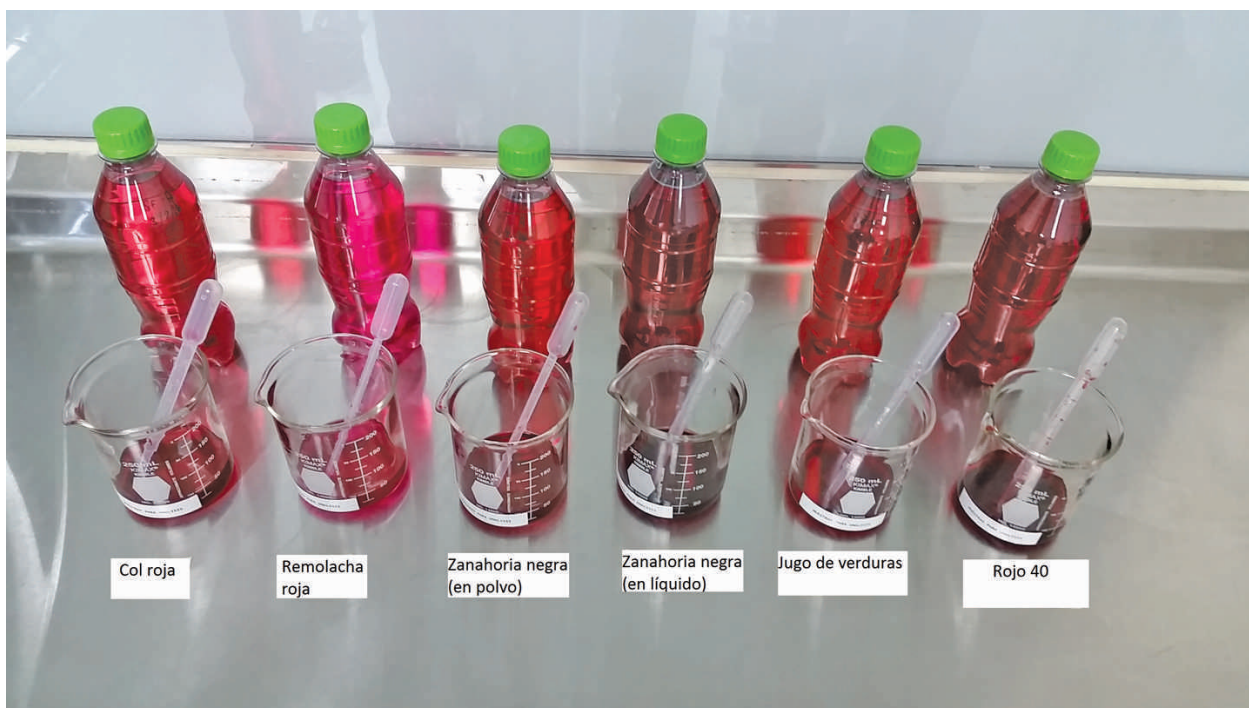
Proveedor	Fuente de antocianina
Naturex	Col roja (en líquido)
Naturex	Remolacha roja (en líquido)
FMC	Zanahoria negra (en polvo)
Sensient	Zanahoria negra (en líquido)
Naturex	Jugo de verduras (en líquido)

Formulación de bebida de fresa, sin calorías, utilizando antocianinas como colorantes naturales.

Se elaboró la bebida utilizando de referencia la de la Tabla 2, únicamente cambiando el colorante. Se emplearon diferentes muestras de colorantes naturales, los cuales se identifican en la Tabla 3.

En la Gráfica 1 se observan las tonalidades de las antocianinas listadas en la Tabla 3 además de la bebida con colorante artificial. La bebida elaborada con extracto de zanahoria negra líquida fue la que presentó un color más similar a la bebida de referencia (con rojo allura AC).

Las bebidas fueron expuestas al sol por 8 horas debido a que esta es una condición extrema y se buscaba conocer el efecto que tenía la luz solar sobre los colorantes naturales. La bebida coloreada con extracto de remolacha roja fue la que mostró



Gráfica 1. Bebidas de fresa utilizando antocianinas provenientes de distintas fuentes

menos estabilidad quedando con un tono amarillento. Por otro lado, la bebida formulada con colorantes artificiales fue la más estable, no mostró ni una ligera decoloración ni pérdida de brillo. Las bebidas coloreadas con extracto de zanahoria negra también resultaron ser estables; la bebida con extracto de col roja reveló una mínima pérdida de intensidad del color.

Se eligió continuar el trabajo con el extracto de zanahoria negra y con el extracto de col roja, ya que esta última brindó una tonalidad distinta que pudiera ser atractiva para el consumidor, por lo tanto, se pensó que debía ser evaluada.

En las Tablas 4 y 5 se describe la formulación utilizando extracto de col roja y el extracto de zanahoria negra, respectivamente.

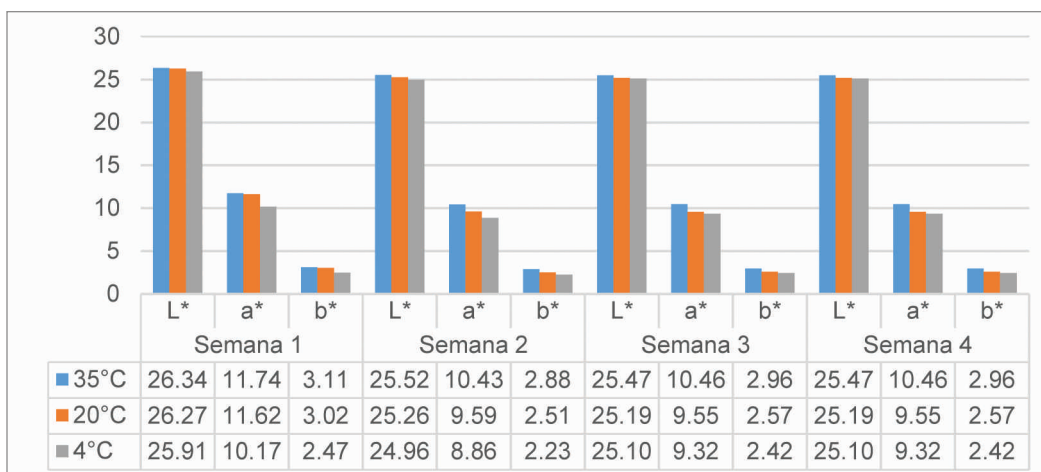
Estudio de estabilidad de bebida por medio de medición de parámetros fisicoquímicos

Las mediciones fisicoquímicas se llevaron a cabo semanalmente por cuatro semanas. Se colocaron bebidas en distintas condiciones de temperatura: en una incubadora a 35°C, en una bodega a temperatura ambiente (aproximadamente de 20°C) y en una refrigeradora a 4°C. Los resultados de los °Brix y los parámetros de acidez de las bebidas ensayadas no variaron significativamente con el tiempo de almacenamiento. Lo revelado fue positivo ya que, como se ha reportado, el grupo flavilico de las antocianinas

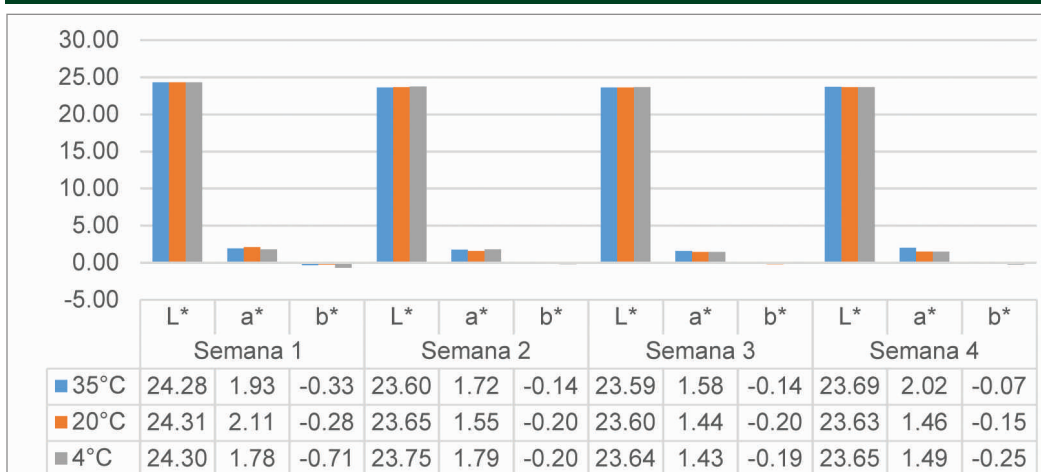
Tabla 4. Fórmula 2: Bebida de fresa, sin calorías empleando extracto de col roja como fuente de antocianinas como colorante natural

Ingrediente	Peso (kilogramos)
Agua	993.517
Sucralosa	0.100
Stevia Steviart	0.017
Benzoato	0.250
Ácido cítrico	1.167
Ácido málico	0.333
Citrato	0.233
EDTA	0.100
Sabor natural a fresa	2.383
Colorante natural: Antocianina proveniente de col roja	1.900
TOTAL	1000 L de bebida terminada

es muy reactivo y por lo tanto muy sensible a los cambios de pH, es por ello que cambia de color (Badui, 2006). A la formulación se le añadió citrato de sodio, este compuesto es considerado un regulador de la acidez el cual fue adicionado para contribuir con la estabilidad del pH en la bebida.



Gráfica 2. Mediciones de color de bebida con antocianinas provenientes de col roja



Gráfica 3. Mediciones de color de bebida con antocianinas provenientes de zanahoria negra

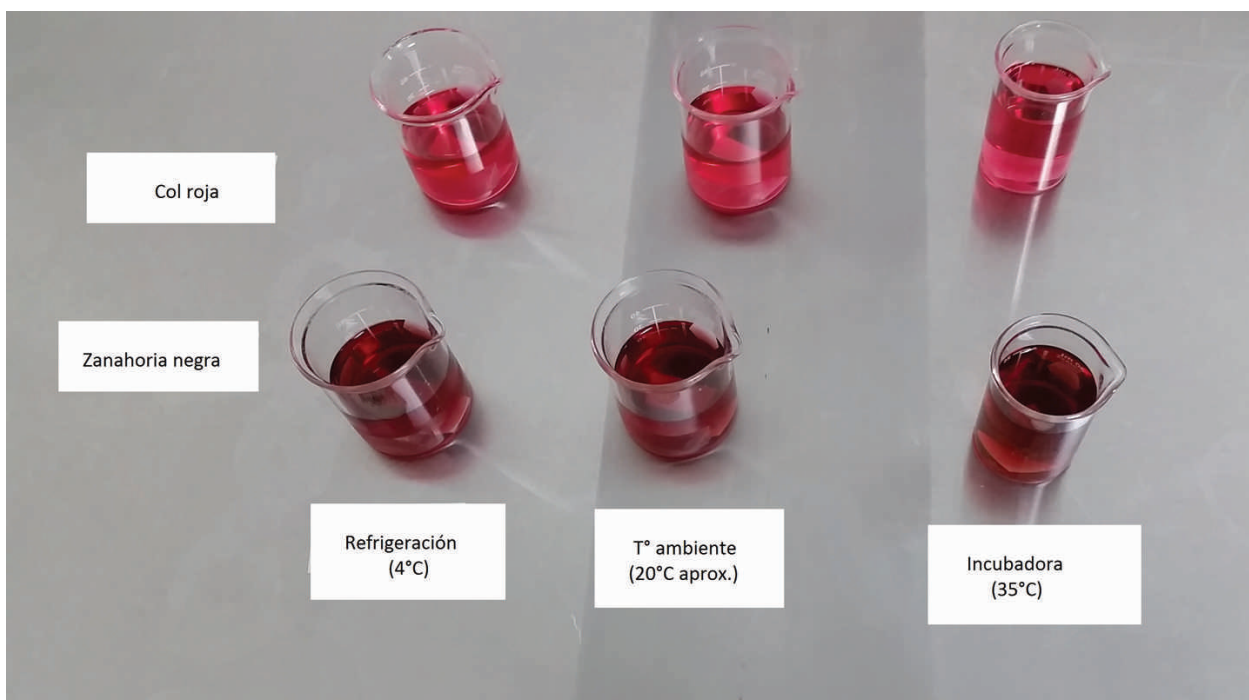
Tabla 5. Fórmula 3: Bebida de fresa, sin calorías empleando extracto de zanahoria negra como fuente de antocianinas como colorante natural

Ingrediente	Peso (kilogramos)
Agua	993.517
Sucralosa	0.100
Stevia Steviart	0.017
Benzoato	0.250
Ácido cítrico	1.167
Ácido málico	0.333
Citrato	0.233
EDTA	0.100
Sabor natural a fresa	2.383
Colorante natural: Antocianina proveniente de zanahoria negra	1.900
TOTAL	1000 L de bebida terminada

En las Gráficas 2 y 3 se muestran los cambios de los índices de color con respecto al tiempo de almacenamiento. Al comparar las gráficas se puede observar que la bebida con extracto de zanahoria negra se mantuvo más estable, y no se observó variación en las bebidas expuestas a distintas condiciones. En cambio, en la bebida con extracto de col roja, se detectó una ligera disminución de los valores respecto al tiempo y también hay una leve diferencia entre las bebidas almacenadas a distintas temperaturas.

Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas

Se cuantificó el contenido de antocianinas monoméricas en las dos formulaciones de las bebidas con colorantes naturales, en muestras almacenadas a temperatura de 35°C y a temperatura ambiente en la semana 1, 4 y 8. Se empleó la temperatura de 35°C para acelerar los posibles cambios en la vida útil del



Gráfica 4. Bebidas luego de ocho semanas expuestas a distintas condiciones de temperatura (4°C, 20°C y 35°C)

Tabla 6. Contenido total de antocianinas monoméricas expresadas en mg/L equivalentes de cianidin 3-glucósido en bebida con antocianinas provenientes de col roja

Contenido total de antocianinas monoméricas		
Semana	20°C (aprox.)	35°C
1	17.31	-
4	15.08	15.10
8	12.71	9.32

Tabla 7. Contenido total de antocianinas monoméricas expresadas en mg/L equivalentes de cianidin 3-glucósido en bebida con antocianinas provenientes de zanahoria negra

Contenido total de antocianinas monoméricas		
Semana	20°C (aprox.)	35°C
1	4.71	-
4	3.94	3.03
8	3.39	1.67

producto y las muestras a temperatura ambiente se utilizaron como control. Los resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. Puede observarse lo siguiente: a) el contenido de antocianinas

monoméricas fue superior en la bebida con extracto de col roja, b) en la cuarta semana no hubo cambios mayores, y c) en la octava semana la disminución de las antocianinas fue más elevada, principalmente a la temperatura de 35°C. No pudo establecerse la significancia de los cambios ya que no se determinaron en diferentes muestras almacenadas.

A simple vista, como se muestra en la Gráfica 4, se observó una ligera disminución en la tonalidad del color de las muestras almacenadas a 35°C, siendo más notorio en la bebida con extracto de col roja.

Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH

Se determinó la capacidad antioxidante de las dos formulaciones en las bebidas almacenadas a temperatura ambiente luego de ocho semanas. Los resultados se observan en las Tablas 8 y 9. Como se observa los valores de IC50 fueron menores en la bebida con extracto de zanahoria negra, lo cual indica que esta bebida tiene mayor capacidad antioxidante. A pesar de que en el análisis anterior se encontró que la bebida con extracto de col roja tenía más antocianinas monoméricas, la bebida con extracto de zanahoria negra tiene mayor capacidad antioxidante. Esto se debe a que la zanahoria negra tiene otras antocianinas poliméricas que no fueron detectadas en el análisis anterior. Se

Tabla 8. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de bebida con antocianinas provenientes de col roja

	IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	Semana 1	Semana 8
$^{\circ}\text{T}_{\text{ambiente}} (20^{\circ}\text{C})$	101.84	159.95

observó también una disminución de la capacidad antioxidante en la bebida con extracto de col roja luego de ocho semanas. No pudo determinarse el efecto de la temperatura en la capacidad antioxidante ya que no se realizó el análisis en todas las condiciones almacenadas.

Pruebas sensoriales

Se llevaron a cabo pruebas hedónicas con las dos bebidas con colorantes naturales. La bebida con antocianinas provenientes de extracto de col roja, en el atributo de sabor, fue calificado por la mayoría de los panelistas como “me gusta moderadamente” y “no me gusta ni me disgusta”, aunque también se observó que varios panelistas indicaron que les disgusta moderadamente. El dulzor y color fue calificado muy similar, el mayor porcentaje indicó que le “gustaba moderadamente”. En la evaluación de la bebida con antocianinas provenientes de extracto de zanahoria negra se obtuvo un resultado más positivo. El color fue mejor evaluado, 50% de los panelistas indicaron que les gustaba mucho. El sabor y dulzor también fue mejor calificado que en la bebida con antocianinas provenientes de col roja.

En la sección de comentarios, varios panelistas colocaron que el color de la bebida con antocianinas provenientes de zanahoria negra se veía con un color más agradable y más natural y que el sabor también se percibía más natural. Por otro lado, en la bebida con antocianinas de extracto de col roja indicaban que le faltaba sabor a fresa y que el color no se percibía natural.

Conclusiones

Se desarrolló la formulación de una bebida de fresa, sin calorías, con colorante natural, para lo cual se evaluó las antocianinas de extracto de col roja y de zanahoria negra como colorantes naturales. Las características sensoriales (color, sabor, dulzor y apariencia en general) fueron mejor evaluadas en la bebida con antocianinas provenientes de extracto de zanahoria negra.

En el estudio de estabilidad se determinó que las formulaciones conservaron sus parámetros fisicoquímicos de $^{\circ}\text{Brix}$, pH y porcentaje de acidez, en distintas condiciones de almacenamiento a diferentes temperaturas. En cuanto al color, hubo mayor estabilidad en la bebida con extracto de zanahoria negra.

Tabla 9. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de bebida con antocianinas provenientes de zanahoria negra

	IC50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	Semana 1	Semana 8
$^{\circ}\text{T}_{\text{ambiente}} (20^{\circ}\text{C})$	85.58	87.74

Bibliografía

- Badui, S. (2006) *Química de los Alimentos* 4^o ed. México, Pearson.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M., Berset. C. (1995) *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity* Food Science and Technology 28: 25-30.
- Castañeda, A. (2009) *Chemical studies of anthocyanins: A review* Food Chemistry 113 (4): 859-871.
- CSPH (2008) *Petition to Ban the use of Yellow 5 and Other Food Dyes* Center for Science in the Public Interest. Petition to the United States Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, June 3rd.
- Degenhardt, A., Knapp, H., Winterhalter, P. (2000) *Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity* Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (2): 338-343.
- Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T. Terabe, K. (1995) *Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro* Cancer Investigation 13 (6): 590-594.
- Hernández- Herrero, J.A., Frutos, M.J. (2014) *Colour and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices at different pHs and temperatures* Food Chemistry 154: 199-204.
- Lee, J. (2005) *Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study* Journal of AOAC International 88 (5): 1269-1278.
- Lietti, A., Cristoni, A., Picci, M. (1976) *Studies on Vaccinium myrtillus anthocyanosides. I. Vasoprotective and anti-inflammatory activity* Arzneimittelforschung. 26 (5): 829-832.
- Timberlake, C.F., Henry, B.S. (1988) *Anthocyanins as natural food colors* Prog. Clin. Biol. Res. 280:107-121.
- Wang, H., Cao, G. Prior, R. (1997) *Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins* J. Agric. Food Chem. 45 (2): 304-309.