

INVESTIGACIÓN

Correlación entre unidades asta-concentración carotenoide en pimentones. Predicción de la estabilidad del color durante el almacenamiento

Por Antonio Pérez-Gálvez¹, M^a Isabel Mínguez-Mosquera¹, Juan Garrido-Fernández^{1*},
M^a Mercedes Lozano-Ruiz² y Vicente Montero-de-Espinosa²

¹Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa (CSIC).
Av. Padre García Tejero nº4, 41012, Sevilla, Spain. E-mail: jgarrido@cica.es

²Instituto de Tecnología Agroalimentaria. Consejería de Agricultura y Comercio.
PO Box 217, 06080, Badajoz, Spain.

RESUMEN

Correlación entre unidades asta-concentración carotenoide en pimentones. Predicción de la estabilidad del color durante el almacenamiento.

El pimentón obtenido de forma tradicional, a partir de frutos secados en hornos de leña, se ha almacenado a temperatura ambiente durante 18 meses. Se han tomado muestras de los mismos a intervalos de 2-3 meses y se ha evaluado la cantidad de color extractable como unidades ASTA y, en paralelo, se ha controlado la concentración carotenoide. Se comparan los valores obtenidos por cada uno de los dos procedimientos, observándose que se da una buena correlación entre las unidades ASTA y la concentración total de carotenoides. Se postula una ecuación que relaciona ambos parámetros y otra ecuación que permite predecir el valor remanente de ASTA con el tiempo de conservación. La retención de color a los 18 meses se sitúa en torno al 55 % del valor inicial.

PALABRAS-CLAVE: ASTA - Carotenoide - Color-Conservación -Pimentón.

SUMMARY

Correlation between ASTA units-carotenoid concentration in paprika. Prediction of the color stability during storage.

Paprika obtained through the traditional process, from fruits dried in oak ovens, is stored at room temperature for 18 months. Samples are taken at 2-3 months time intervals and color quantity is evaluated, measuring it as ASTA units and carotenoid content. Values obtained from both measurements are compared, achieving a good correlation between ASTA units and total carotenoid content. As a result two equations are proposed, one linking both parameters and another which predicts the remaining ASTA unit as a function of storage time. ASTA values after 18 months of storing time are ca. 55% of the initial values.

KEY-WORDS: ASTA-Carotenoid-Color - Paprika -Storage.

1. INTRODUCCIÓN

La valoración comercial del pimentón se realiza en base a la cualidad por la que es apreciado por el consumidor: el color. Por ello, todos los estudios realizados en esta especie, y del fruto del cual se obtiene, van encaminados a conocer y mejorar la

presencia carotenoide del fruto, minimizar la incidencia del procesado en dicho contenido y a la mejor conservación del producto hasta su empleo por el consumidor (Okos et al., 1990). Consecuentemente, se conjuntan estudios biosintéticos (esclareciendo la ruta de síntesis en el fruto fresco) y degradativos (esencialmente la oxidación de los pigmentos carotenoides) según luz, aire, temperatura, presencia o ausencia de antioxidantes (Mínguez-Mosquera et al., 1994; Biacs et al., 1992), factores íntimamente ligados a los ácidos grasos presentes en el medio (Kamal-Eldin y Appelqvist, 1996). Del binomio biosíntesis-degradación va a depender la calidad inicial del producto y la conservación de ésta en el tiempo.

Se han introducido diversas mejoras, como las variedades, para elevar el rendimiento pigmentario de los frutos y, por tanto, la calidad de los mismos. También utilizando técnicas de elaboración poco agresivas, como es el caso del secado tradicional de la Vera que, además, adicionan buenas características organolépticas (Mínguez-Mosquera et al. 2000). Una vez obtenido el producto final, se han realizado diversos estudios sobre la influencia de variadas condiciones de almacenamiento (Gómez et al., 1998 a, b) y el papel que otras sustancias antioxidantes, como tocoferoles o ácido ascórbico (Fuente et al., 1977; Kanner et al., 1978; Biacs et al., 1992), tienen en el mantenimiento del color. Más recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia que tiene la matriz lipídica, en la que se encuentran inmersos los carotenoides, en acelerar o retardar los procesos oxidativos de tales pigmentos (Varón et al., 2000). Así, se ha constatado que un cambio en la naturaleza del medio lipídico, haciéndolo menos polar, aumenta la estabilidad del color y hace más duradera su vida comercial (Pérez-Gálvez et al., 1999; Pérez-Gálvez et al., 2000).

Aunque algunas transacciones comerciales del pimentón puedan llegar a realizarse por valoración organoléptica (según color aparente, brillo, textura, etc.), lo habitual es basarse en un procedimiento espectrofo-

tométrico por medida de absorbancia a una determinada longitud de onda. Hay un procedimiento curioso que realiza la transformación (por reducción) de carotenoides rojos a amarillos (Baranyai y Szabolcs, 1976) con lo cual se unifica la medida de coloración pigmentaria. Pero no cabe duda que la determinación según el método ASTA (FAO/WHO, 1984) es la más sencilla, aunque también tiene sus limitaciones. Así, a partir de una medida ASTA se obtiene una valoración global del color del pimentón, pero no se puede conocer la relación que tiene la fracción de pigmentos roja respecto a la amarilla, si se han adicionado colorantes, o si existe deterioro carotenoides (presencia excesiva de epóxidos, isómeros, etc.) (Mínguez-Mosquera et al., 1992). Todo ello sólo sería detectable mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alta resolución, que permite analizar los pigmentos componente a componente (Mínguez-Mosquera et al., 1995). No obstante, el método ASTA es un sistema bastante usual (y en muchas ocasiones el único empleado) para la evaluación del producto.

En esta experiencia se lleva a cabo un seguimiento de la evolución del color en pimentones de las variedades Jaranda y Jariza durante su conservación. Se realiza la medida atendiendo a las dos alternativas comentadas, es decir, como unidades ASTA y según composición carotenoides individualizada. Por una parte, se pretende observar la modificación del perfil carotenoides con el tiempo y, por otra, establecer correspondencias entre la composición carotenoides total (determinada por cromatografía líquida de alta resolución) con la valoración ASTA.

2. MATERIALES Y METODOS

Materia prima. Los pimentones estudiados proceden de frutos de pimiento (*Capsicum annum* L.) de las variedades Jaranda y Jariza (cuatro muestras por variedad). Los frutos fueron secados, en cada finca, por el procedimiento tradicional en la comarca de La Vera, Cáceres (España), en hornos de leña y luego se trituraron, de forma independiente, en un molino de martillos (incluyendo pericarpio y semillas). Las muestras se dispusieron en bolsas de plástico de 100 g de capacidad y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente. Se estableció un control temporal cada 2 meses durante el primer año, que pasó a ser trimestral en el segundo año, hasta completar un periodo de conservación total de un año y medio. El muestreo de cada pimentón se realizó por triplicado.

Evaluación del color según Método ASTA. Se pesan entre 0.07 y 0.11 g de pimentón a los que se añaden 100 ml de acetona y después de agitar se deja en maceración durante 4 horas. Se toma una alícuota de la solución transparente y se mide el valor de absorbancia a 460 nm (FAO/WHO, 1984). Las unidades de color se calculan según la expresión:

$$\text{unidades ASTA} = \frac{\text{Absorbancia solución acetona} \times 16.4 \times I_f}{\text{g de muestra}}$$

siendo I_f un factor de corrección del aparato que se realiza con solución estándar de dicromato potásico y sulfato de cobalto.

Determinación de la concentración de carotenoides mediante HPLC. Se sigue la metodología propuesta por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1993. Tras las operaciones de extracción, desesterificación y preparación de la muestra, los pigmentos carotenoides se analizan por HPLC. Para la cuantificación individualizada se utiliza β -apo-8-carotenal como patrón interno.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución de la composición individual de pigmentos carotenoides. En la Tabla I se muestra la concentración individual de pigmentos carotenoides de los frutos procedentes de la Finca 1 de Jaranda, así como las fracciones de rojos (capsanteno, capsorrubeno), amarillos (violaxanteno, cucurbitaxanteno A, mutatoxanteno, zeaxanteno, β -criptoxanteno, β -caroteno) y totales (suma de las dos fracciones anteriores), a lo largo de los 18 meses de conservación. Se incluye el porcentaje de retención al final de la experiencia para tener una idea clara de la cantidad restante de un carotenoides, o conjunto, en comparación con la de partida (100%). La concentración total carotenoides experimenta un descenso continuo, aunque suave, con el tiempo. La retención, al cabo de los 18 meses, aún se mantiene en el 41%.

Respecto al contenido carotenoides individual se observó un comportamiento desigual. Así, capsanteno al final de los 18 meses todavía conserva un 42% de la cantidad inicial. En cambio, la retención de β -caroteno fue del 26%. Por otra parte, el isómero *cis* de zeaxanteno aumenta su concentración en una primera etapa de la conservación (de 25.6 mg/kg hasta 59.5 mg/kg), y posteriormente desciende hacia los valores iniciales. Algo parecido ocurre con el epóxido y los isómeros *cis* de capsanteno. En general, los carotenoides en su configuración *todo-trans* experimentan siempre un descenso (más o menos acusado), en tanto que los correspondientes isómeros *cis* (y epóxido) aumentan inicialmente su concentración para posteriormente seguir también el descenso global de pigmentos.

Al objeto de obtener una estimación media del comportamiento de los pimentones, en cuanto a color y su estabilidad a lo largo del tiempo de conservación, se consideran conjuntamente las 8 fincas estudiadas. Los resultados son extrapolables a pimentones obtenidos y conservados en condiciones similares. Es decir, se pretende obtener una ecuación que sirva de referencia para estimar el grado de retención del color durante el almacenamiento.

En la figura 1 se muestra la evolución de capsanteno y la de sus derivados *cis* y 5,6-epóxido, agrupando todos los datos sin distinción de finca ni variedad. Se expresa como porcentaje de retención

Tabla I
Evolución de la concentración de carotenoides, individual y agrupada por fracciones roja, amarilla y total durante el período de conservación del pimentón correspondiente a la muestra Jaranda 1

Pigmento	Concentración (media±desviación estándar en mg/kg)							% ^a
	0	2 meses	4 meses	6 meses	8 meses	12 meses	18 meses	
Capsorrubeno	288,1±16,5	225,4±5,65	205,0±8,29	190,6±3,62	204,3±4,10	192,6±5,33	170,5±18,2	59,2±6,33
Violaxanteno	278,9±18,9	175,1±3,21	175,1±3,21	143,3±23,5	157,7±0,17	134,8±8,96	122,0±8,94	43,8±3,21
epóx. Capsanteno	157,3±11,1	206,0±3,78	175,8±24,3	137,5±6,12	111,4±47,8	132,5±6,86	93,7±8,52	59,5±5,41
Capsanteno	2163,5±71,	1744,8±20,	1492,2±2,4	1269,8±9,5	1198,7±17,	1107,0±22,	902,6±91,4	41,7±4,23
cis-Capsanteno	347,7±23,2	480,9±13,5	431,2±82,5	383,6±56,5	396,4±3,08	354,3±58,5	197,1±16,4	56,7±4,71
Mutatoxanteno	83,3±7,55	80,2±1,60	57,4±0,47	18,0±0,25	34,5±0,57	-	-	0
Cucurbitaxanteno	350,4±16,3	341,4±1,67	295,7±9,25	239,7±4,17	222,7±2,22	192,3±9,95	137,8±13,2	39,3±3,76
Zeaxanteno	462,2±18,4	397,5±2,19	331,2±11,6	269,2±3,13	237,1±4,32	213,6±8,84	155,5±14,9	33,6±3,21
cis-Zeaxanteno	25,6±1,35	26,3±3,72	56,0±13,2	47,7±3,21	59,5±3,44	37,7±8,64	33,7±1,81	131,6±7,04
β-Criptoxanteno	395,8±15,8	351,9±1,03	305,2±11,3	251,8±9,89	232,0±0,34	199,7±3,43	134,6±12,7	34,0±3,21
β-Caroteno	399,3±6,74	335,0±9,28	274,8±30,7	244,2±8,72	207,2±1,61	181,3±11,7	104,8±8,61	26,3±2,16
cis-β-Caroteno	93,7±10,4	71,1±8,47	75,3±6,55	41,1±3,98	46,2±1,50	29,2±5,30	32,7±4,43	35,0±4,73
Rojos	2956,7±92,	2657,1±43,	2304,2±52,	1981,5±68,	1910,8±66,	1786,3±82,	1363,9±13,	46,1±4,55
Amarillos	2089,2±95,	1883,2±42,	1638,0±21,	1293,2±20,	1231,5±6,3	1037,9±58,	721,2±64,6	34,5±3,09
Totales	5045±99,6	4540,2±1,0	3942,2±74,	3274,8±47,	3142,3±73,	2824,3±54,	2085,1±19,	41,3±3,95

^a porcentaje de retención carotenoide a los 18 meses de conservación.

para poder realizar comparaciones evolutivas. El ajuste responde a un polinomio de segundo orden que es el que mejor representa la evolución experimentada. Se distingue un comportamiento muy diferenciado de los valores de retención para cada uno de ellos. Isómeros y epóxido de capsanteno incrementan inicialmente su presencia y luego descienden de forma amortiguada. En cambio, capsanteno desciende de forma ininterrumpida en el tiempo. Dada la presencia mayoritaria de capsanteno (res-

pecto de sus isómeros y del epóxido), si se considera el conjunto la concentración disminuye desde el inicio de la experiencia.

Las figuras 2 y 3, análogamente, representan la evolución de zeaxanteno y *cis*-zeaxanteno y β-caroteno y *cis*-βcaroteno, respectivamente. Se observa, nuevamente, que el porcentaje de isómero se mantiene por encima de sus predecesores inmediatos, sobre todo en el primer caso. Este tipo de transformación ya se puso de manifiesto en experiencias an-

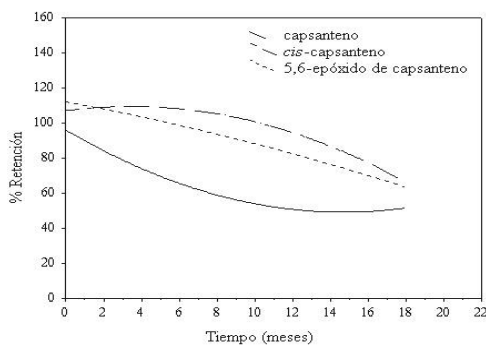


Figura 1

Evolución de la concentración de capsanteno y de sus derivados, *cis* y 6 epóxido, en pimentones (n=8) almacenados durante 18 meses a temperatura ambiente.

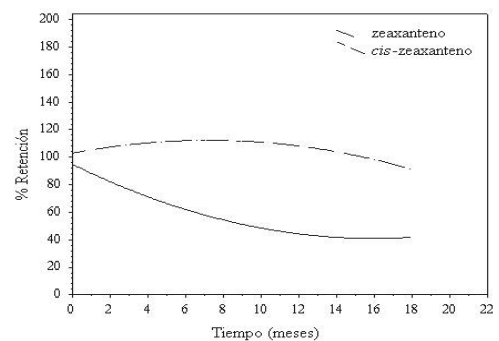


Figura 2

Evolución de la concentración de zeaxanteno y su isómero *cis* en pimentones (n=8) almacenados durante 18 meses a temperatura ambiente.

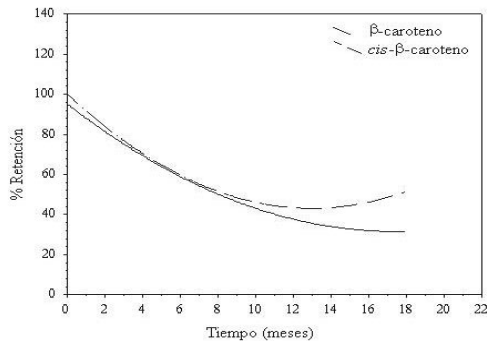


Figura 3
Evolución de la concentración de β -caroteno y su isómero *cis* en pimentones (n=8) almacenados durante 18 meses a temperatura ambiente.

teriores con pimentones sometidos a termodegradación (Pérez-Gálvez y Garrido-Fernández, 1997). En dichos ensayos, a 60 °C, se produjo la formación preferente de isómeros *cis* de capsanteno, zeaxanteno y b-caroteno. Aquí también tiene lugar dicho aumento, aunque levemente para el caso del isómero *cis* de b-caroteno.

Los resultados permiten establecer una posible vía degradativa de pigmentos, durante la conservación, que tenga lugar en el sentido de formación de epóxidos y derivados *cis*, a partir de las correspondientes formas todo-*trans*. Los productos formados son más susceptibles a posteriores ataques oxidativos y se pueden originar roturas en la cadena central de la molécula y, por tanto, pérdida de color.

Correlación unidades ASTA-concentración de carotenoides. Uno de los objetivos planteados en este

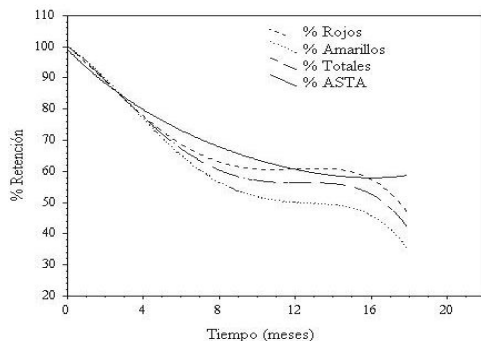


Figura 4
Porcentaje de retención de las unidades ASTA y de la concentración de carotenoides rojos, amarillos y totales, en pimentones (n=8) almacenados durante 18 meses a temperatura ambiente.

trabajo es establecer un sistema de valoración carotenoides que pueda correlacionarse con el utilizado habitualmente de unidades ASTA. La composición carotenoides suministra la información detallada del contenido individual en pigmentos, mientras que el procedimiento ASTA proporciona datos globales de capacidad colorante. Por tanto, esta última medida no discrimina entre lo que es cantidad, o intensidad de color, con la presencia cualitativa de componentes que produce dicha coloración. Así, caso de que exista una adulteración del pimentón, por presencia de componentes colorantes ajenos al pimentón, o si dichos componentes se encuentran en un estado muy deteriorado, estos hechos no serán detectados por tal método. Por el contrario, el análisis individualizado de carotenoides, y las distintas relaciones entre ellos, sí pueden ser indicativos de la pureza en la utilización de la materia prima, o bien del estado de deterioro (o tiempo de almacenamiento) de un pimentón dado.

Una forma de comparar unidades ASTA y concentración de pigmentos carotenoides, salvando las diferencias numéricas que cada sistema de medida ofrece, es reflejar los valores respectivos en forma de porcentaje de retención. Es lo que se hace en la Figura 4, y para el conjunto de todos los pimentones, donde se muestra la evolución de las unidades ASTA con un ajuste polinomial de orden 4. Análogamente, se representa la concentración pigmentaria (también como retención), de cada una de las fracciones y para el total carotenoides. Como se observa, las líneas correspondientes tienden a diferenciarse a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento. Este comportamiento es similar al que presenta cada finca individualmente. Los pigmentos rojos poseen mayor estabilidad que los amarillos, en consonancia con los resultados obtenidos anteriormente (Mínguez-Mosquera et al., 1992). Los pigmentos totales,

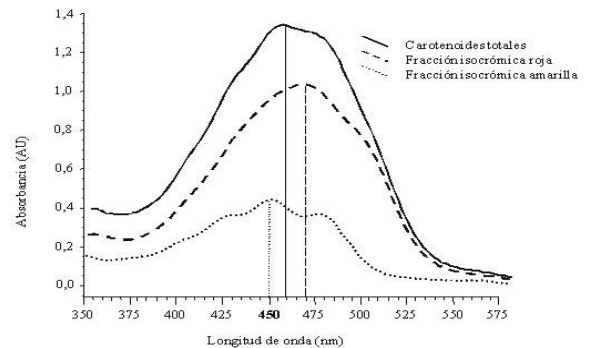


Figura 5
Espectros de absorción electrónica del extracto carotenoides de un pimentón según fracciones roja, amarilla y pigmentos totales, en acetona.

al ser una media de rojos y amarillos, siguen una evolución intermedia.

En la Figura 5 se presenta el espectro de absorción electrónica para los pigmentos β -caroteno, β -criptoxanteno y zeaxanteno de forma conjunta (amarillos), así mismo el correspondiente a capsanteno más capsorrubeno (rojos). Para el primero de los grupos, el de los amarillos, la zona de máxima absorción está situada en los 450 nm, en tanto que para los pigmentos rojos dicho máximo se coloca en torno a los 470nm. En el extracto colorante del total de pigmentos ambas fracciones se influyen mutuamente, de tal forma que la absorción máxima se presenta en el intervalo entre el máximo de los carotenoides rojos y el de los amarillos, zona en la que se lleva a cabo, precisamente, la valoración de pimentones como unidades ASTA. Este paralelismo permite, por tanto, establecer una ecuación que correlacione, dentro de condiciones normales, los parámetros unidades ASTA-concentración carotenoide. Para obtener dicha ecuación se representan gráficamente todos los datos de los valores ASTA frente a concentración total de pigmentos (C_{TP}). El modelo que mejor se adapta a los datos experimentales obtenidos, que se muestra en la Figura 6, es una línea recta de ecuación:

$$C_{TP} = 22.33 \times ASTA$$

la cual permite el cambio directo de unidades ASTA a concentración total carotenoide y viceversa. Se puede verificar su validez de la siguiente forma: con los datos ASTA experimentales y la ecuación obtenida se calculan los datos de concentración de pigmentos totales "teóricos". A su vez estos datos "teóricos" se comparan con los datos de concentración obtenidos experimentalmente. Si la ecuación matemática anterior es ideal la representación de ambos conjuntos de datos origina una línea recta de

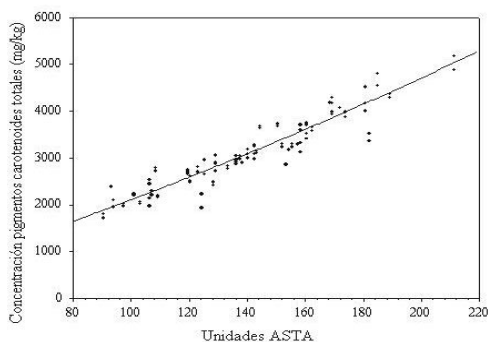


Figura 6

Representación de la concentración de pigmentos carotenoides totales frente a las unidades ASTA, en cada uno de los periodos controlados, para los ocho pimentones almacenados.

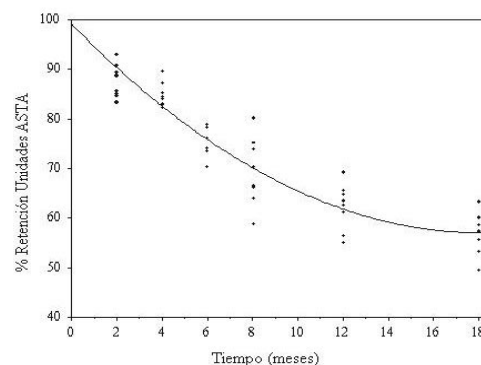


Figura 7

Porcentaje de retención del color, como medida ASTA, frente al tiempo de almacenamiento, de los ocho pimentones estudiados.

ordenada el origen y pendiente 1. La línea obtenida es de pendiente 0.992588, lo cual indica una buena validez de la ecuación propuesta.

Al objeto de poder predecir la coloración de un pimentón en un instante determinado, estimando así el tiempo máximo de almacenamiento del producto, o bien cuándo éste deja de tener valor en una transacción comercial, se procede a obtener una ecuación que correlacione el valor de las unidades ASTA y el tiempo. En la Figura 7 se representa el valor de retención ASTA a lo largo del tiempo, para todas las muestras de pimentón. Se incluyen los datos correspondientes a los ocho pimentones con objeto de disponer de una muestra lo suficientemente amplia y representativa para que las conclusiones que se obtengan puedan ser aplicables, de forma general, a cualquier otro pimentón de forma de obtención y conservación análogos a los aquí tratados. De todos los modelos ensayados, el que presenta un mejor ajuste es el que viene dada por la expresión siguiente:

$$\%ASTA = 99.06 - 4.65 \times t + 0.129 \times t^2$$

El estudio realizado abarca un total de 18 meses a los que corresponde como media un porcentaje de retención ASTA del 55%. Es por tanto éste, el límite de aplicación de la ecuación anterior.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su gratitud a la Dirección General de Investigación (Ministerio de Ciencia y Tecnología) por la financiación del presente trabajo (proyecto PETRI 95-0100).

5. BIBLIOGRAFÍA

Baranyai, M. y Szabolcs, J. (1976). Determination, by reduction, of the red and total pigment content in paprika products. *Acta aliment.*, **5**, 87-105.

- Biacs, P. A., Czinkotai, B. y Hoschke, Á. (1992). Factors affecting stability of **colored substances in paprika powders**. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 363-367.
- FAO/WHO. (1984). Specifications for identity and purity of food colours (28th session of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives); FAO Food and Nutrition Paper 31/1; **FAO: Rome, 105-109**.
- Fuente, T., Serna, A. y Navarro, F. (1977). Estudio de α -tocoferol en pimentón. *Anales de Química*, **73**, 159-162.
- Gómez, R., Pardo, J. E., Navarro, F. y Varón, R. (1998a). Colour differences in paprika pepper varieties (*Capsicum annuum* L.) cultivated in a greenhouse and in the open air. *J. Sci. Food. Agric.*, **77**, 268-272.
- Gómez, R., Parra, V., Pardo, J. E., Amo, M. y Varón, R. (1998b). Influence of storage conditions on pigment degradation in paprikas from different greenhouse pepper cultivars. *J. Sci. Food. Agric.*, **78**, 321-328.
- Kamal-Eldin, A. y Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**, 671-700.
- Kanner, J., Mendel, H. y Budowski, O. (1978). Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): oleoresin-cellulose solid model. *J. Food Sci.*, **43**, 709-712.
- Mínguez-Mosquera, M. I. y Hornero-Méndez, D. (1993). Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika and oleoresin by reversed-phase HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1616-1620.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Hornero-Méndez, D. y Garrido-Fernández, J. (1995). Detection of bixin, lycopene, canthaxanthin, and β -Apo-8'-carotenal in products derived from red pepper. *J. AOAC Int.*, **78**, 491-496.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M. y Garrido-Fernández, J. (1992). Color quality in paprika. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2384-2388.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M. y Garrido-Fernández, J. (1994). Competition between the processes of biosynthesis and degradation of carotenoids during the drying of peppers. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 645-648.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Pérez-Gálvez, A. y Garrido-Fernández, J. (2000). Carotenoid content of the varieties Jaranda and Jariza (*Capsicum annuum* L.) and response during the industrial slow drying and grinding steps in paprika processing. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2972-2976.
- Okos, M., Csorba, T. y Szabad, J. (1990). The effect of paprika seed on the stability of the red colour of ground paprika. *Acta Aliment.*, **19**, 79-86.
- Pérez-Gálvez, A. y Garrido-Fernández, J. (1997). Termodegradación de carotenoides en el pimentón. *Grasas y Aceites*, **48**, 290-296.
- Pérez-Gálvez, A., Garrido-Fernández, J. y Mínguez-Mosquera, M. I. (1999). Participation of pepper seed in the stability of paprika carotenoids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 1449-1454.
- Pérez-Gálvez, A., Garrido-Fernández, J. y Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Effect of high-oleic sunflower seed on the carotenoid stability of ground pepper. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 79-83.

Recibido: Mayo 2003
Aceptado: Octubre 2003