



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA
SUSTENTABLE**

**EVALUACIÓN DEL COLORANTE DE *Passiflora biflora* LAM COMO ADITIVO EN
MATRICES ALIMENTICIAS**

KIMBERLY LARA SÁNCHEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
PORTADA**

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

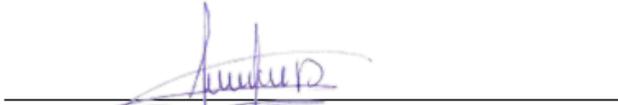
2023

La presente tesis titulada: “**Evaluación del colorante de *Passiflora biflora* Lam como aditivo en matrices alimenticias**” realizada por la alumna: **Kimberly Lara Sánchez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA


Dra. Dora Angélica Avalos de la Cruz

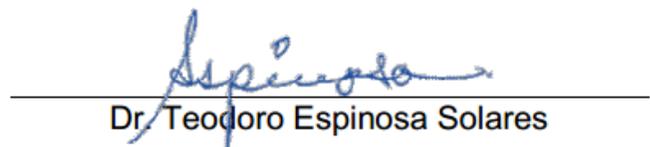
ASESOR


Dr. Victorino Morales Ramos

ASESOR


MC. Carlos Gilberto García García

ASESOR


Dr. Teodoro Espinosa Solares

EVALUACIÓN DEL COLORANTE DE *Passiflora biflora* Lam COMO ADITIVO EN MATRICES ALIMENTICIAS

Kimberly Lara Sánchez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2023

RESUMEN

En la industria agroalimentaria los aditivos naturales son valorados en el desarrollo de productos. Las antocianinas son un colorante natural, que, por su alta capacidad antioxidante, están directamente relacionados al bienestar y la salud. El objetivo de este trabajo fue cuantificar en el fruto de *Passiflora biflora* Lam el contenido de antocianinas y su estabilidad en bebidas modelo. Se evaluó la capacidad antioxidante de diferentes extractos del fruto de *P. biflora* Lam y su caracterización cualitativa y cuantitativa por pH diferencial y LC-MS/MS. Se evaluó mediante pH diferencial y HPLC la degradación de antocianinas por tratamiento acelerado y térmico. Los extractos tuvieron un contenido de compuestos fenólicos de 1597-3739 μg de ácido gálico g^{-1} , y porcentajes de inhibición de radicales libres ABTS y DPPH de 72.76-99.43 y 68.74-92.15 % respectivamente. El contenido de antocianinas osciló entre 33.68-51.9 mg C3G 100 g^{-1} de extracto seco por LC-MS/MS, y 1933-8706 mg C3G eq 100 g^{-1} por pH diferencial. Las bebidas modelo presentaron porcentajes de degradación de antocianinas de 59.20-66.50 y 14.05-26.07 % por pH diferencial y HPLC. Los resultados obtenidos demuestran la presencia de antocianinas en el fruto de *P. biflora* Lam volviéndolo apto para su aplicación como colorante natural en bebidas acidificadas.

Palabras clave: *Passiflora biflora*, antocianinas, fenilalanina, cianidin-3-O- β -glucósido, ácido gálico.

EVALUATION OF THE COLORANT OF *Passiflora biflora* Lam AS AN ADDITIVE IN FOOD MATRICES

Kimberly Lara Sánchez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2023

ABSTRACT

In the agri-food industry, natural additives are valued in product development. Anthocyanins are a natural colorant, which, due to their high antioxidant capacity, are directly related to well-being and health. The objective of this work was to quantify the anthocyanin content in *Passiflora biflora* Lam fruit and its stability in model beverages. The antioxidant capacity of different extracts of *P. biflora* Lam fruit and their qualitative and quantitative characterization by differential pH and LC-MS/MS were evaluated. Anthocyanin degradation by accelerated and thermal treatment was evaluated by differential pH and HPLC. The extracts had a phenolic compound content of 1597-3739 $\mu\text{g g}^{-1}$ gallic acid, and free radical inhibition percentages ABTS and DPPH of 72.76-99.43 and 68.74-92.15 % respectively. Anthocyanin content ranged from 33.68-51.9 mg C3G 100 g^{-1} dry extract by LC-MS/MS, and 1933-8706 mg C3G eq 100 g^{-1} by differential pH. The model beverages presented anthocyanin degradation percentages of 59.20-66.50 and 14.05-26.07 % by differential pH and HPLC. The results obtained demonstrate the presence of anthocyanins in the fruit of *P. biflora* Lam making it suitable for application as a natural colorant in acidified beverages.

Keywords: *Passiflora biflora*, anthocyanins, phenylalanine, cyanidin-3-O- β -glucoside, gallic acid.

DEDICATORIA

*A mis padres, María de los Ángeles y Jesús,
quienes con su esfuerzo nos han sacado adelante.*

*A mi hermana Monserrat,
mi más grande motivación.*

*A mi pareja Jhair,
por su apoyo incondicional.*

*A mis amigos y profesores,
por su apoyo y dedicación.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento económico otorgado para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias a través de la beca No. 1079108.

Al Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, la LGAC2 Innovación y desarrollo de procesos agroalimentarios para el bienestar social de la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable, los Laboratorios de Ciencia de los Alimentos y Extractos Vegetales, a los chicos del programa Jóvenes Construyendo el Futuro y la Subdirección de Vinculación, por las facilidades, uso de sus instalaciones y apoyo brindado para el cumplimiento de este proyecto de investigación.

A la Dra. Dora Angélica Avalos de la Cruz por su apoyo incondicional y guía durante mi formación profesional y en los momentos más difíciles a lo largo de este periodo.

A mis asesores del Consejo Particular, Dr. Teodoro Espinosa Solares, M.C. Carlos Gilberto García García y Dr. Victorino Morales Ramos, por la confianza, el esfuerzo, el tiempo y dedicación brindada.

A Dr. Diego A. Luna Vital y la Dra. Astrid Domínguez Uscanga del Tecnológico de Monterrey, Campus Puebla, así como a su equipo de trabajo que me permitieron realizar una estancia en la cual me abrieron las puertas de sus laboratorios y su amistad.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	12
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	13
4.1. Colorantes artificiales.....	13
4.2. Colorantes naturales.....	14
4.4. Antocianinas en <i>Passiflora</i>	16
4.5. Estabilidad de las antocianinas.....	17
4.6. Distribución y diversidad	18
4.7. Descripción botánica	18
4.8. Descripción botánica de <i>Passiflora biflora</i> Lam	20
4.9. Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos en <i>Passiflora</i>	21
CAPÍTULO I.....	23
CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL FRUTO DE <i>P. biflora</i> LAM.....	23
RESUMEN	24
ABSTRACT	25
1. INTRODUCCIÓN	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Caracterización física y química de los frutos.....	27
2.1.1. Dimensiones y peso de los frutos.....	27
2.1.2. Humedad	27
2.1.3. Cenizas	28
2.1.4. Determinación de grasas	28
2.1.5. Prueba de dureza de los frutos	29
2.2. Capacidad antioxidante de extractos de los frutos.....	29
2.2.1. Extractos del fruto de <i>P. biflora</i> Lam.....	29
2.2.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre (DPPH)	30
2.2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS	30
2.2.4. Determinación de compuestos fenólicos.....	31

2.2.5. Análisis de resultados	31
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1. Características físicas y químicas de los frutos	31
3.2. Capacidad antioxidante.....	33
3.2.1. Capacidad antioxidante por inhibición del radical libre DPPH	33
3.2.2. Capacidad antioxidante por el método antirradical ABTS.....	34
3.2.3. Compuestos fenólicos.....	34
4. CONCLUSIONES	35
5. LITERATURA CITADA	35
CAPÍTULO II	38
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE <i>P. biflora</i> LAM	38
RESUMEN	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUCCIÓN	41
2. MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1. Análisis de antocianinas	42
2.1.1. Liofilización de extractos.....	42
2.1.2. Cuantificación de antocianinas por el método de antocianinas totales (TA)	42
2.1.3. Identificación y cuantificación de fitoquímicos por LC-MS/MS	43
2.2. Capacidad antioxidante de extracto seco.....	44
2.2.1. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre (DPPH)	44
2.2.1. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS	44
2.3. Análisis estadístico	45
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1. Análisis de antocianinas	45
3.1.1. Liofilización de extractos.....	45
3.1.2. Cuantificación de antocianinas por el método de antocianinas totales (TA)	45
3.1.3. Identificación y cuantificación de fitoquímicos por LC-MS/MS	47
3.2. Capacidad antioxidante de extracto seco.....	48
3.2.1. Capacidad antioxidante por inhibición del radical libre DPPH	48
3.2.2. Capacidad antioxidante por el método antirradical ABTS.....	49
4. CONCLUSIONES	50
5. LITERATURA CITADA	50
CAPÍTULO III	54
ESTABILIDAD DEL COLORANTE DE <i>P. biflora</i> LAM EN TRES MODELOS DE BEBIDAS ALIMENTICIAS	54
RESUMEN	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUCCIÓN	57

2. MATERIALES Y MÉTODOS	57
2.1. Preparación de las bebidas modelo	57
2.2. Ensayo de tratamiento acelerado	58
2.3. Ensayo de tratamiento térmico	58
2.4. Cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial	59
2.5. Análisis cuantitativo de antocianinas por HPLC	59
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1. Cuantificación de antocianinas por pH diferencial y HPLC para el tratamiento acelerado	60
3.2. Cuantificación de antocianinas por pH diferencial y HPLC para tratamiento térmico	62
4. CONCLUSIONES	64
5. LITERATURA CITADA	65
V. CONCLUSIONES GENERALES	66
VI. LITERATURA CITADA	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Tamaño, peso y número de semillas en frutos de <i>P. biflora</i> y otras especies reportadas.....	32
Cuadro 2. Determinaciones de humedad, cenizas y grasas del fruto de <i>P. biflora</i> y <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i>	33
Cuadro 3. Determinación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de los extractos de <i>P. biflora</i> Lam.	34
Cuadro 4. Cuantificación de Antocianinas totales por pH diferencial de los diferentes extractos.....	46
Cuadro 5. Identificación cualitativa y cuantitativa dirigida por LC-MS/MS.....	47
Cuadro 6. Capacidad antioxidante ABTS y DPPH de extractos secos.	49
Cuadro 7. Concentración de antocianinas en los modelos de bebidas por el método de pH diferencial y HPLC almacenados a 40 °C por 8 días.	62
Cuadro 8. Concentración de antocianinas en los modelos de bebidas por el método de pH diferencial, almacenados a 70, 80 y 90 °C durante 6 horas.	63
Cuadro 9. Concentración de antocianinas en los modelos de bebidas por HPLC, almacenados a 70, 80 y 90 °C durante 6 horas.	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de colorantes según su origen (Vigueras y Portillo, 2016).	15
Figura 2. Morfología de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>edulis</i> (Fonseca, A.M.A et al., 2022).....	20
Figura 3. <i>Passiflora biflora</i> Lam; a) anverso de las hojas; b) reverso de las hojas; c) tamaño de referencia de los frutos, y d) flor.....	21
Figura 4. Cromatograma del extracto seco de <i>P. biflora</i> Lam y al lado cromatograma del estándar de C3G	61

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los colorantes naturales son estables si se almacenan en zonas frescas, oscuras y secas; diversos factores contribuyen en la alteración de su estabilidad, como la luz, temperatura y pH. El bajo costo y alta eficiencia en el uso de colorantes artificiales hidrosolubles desplazaron el uso de colorantes naturales. Estudios han relacionado su uso con reacciones alérgicas, hipersensibilidad e hiperactividad en niños impulsando la creciente demanda por el desarrollo de alternativas naturales. Las antocianinas han representado la alternativa más utilizada para la sustitución de colorantes artificiales rojos. Debido a su abundancia en la naturaleza y a la gran variedad de organismos existentes, capaces de producir pigmentos se busca la oportunidad de darle color a los alimentos con alimentos (Chatham et al., 2020; Munawar y Jamil, 2014; Portillo et al., 2019; Scotter, 2003; Swer et al., 2019).

Se ha reportado la obtención de colorante natural a partir del pericarpio del fruto de *Passiflora edulis* f. *edulis* o maracuyá púrpura, el pericarpio es duro en estado maduro, considerado como un fruto atractivo para el consumidor por su sabor agridulce, debido a la dureza del pericarpio hace que sea desechado, generando interés al aplicarlo para brindar color a productos como gelatina y fideos. Su uso como colorante fue demostrado con pruebas de estabilidad al calor, la luz y almacenamiento, mostrando el potencial uso de *Passiflora* en el desarrollo de colorantes naturales (Armando et al., 2022; Kawasoe et al., 2021).

En este trabajo se hizo una caracterización física y química del fruto de *P. biflora* Lam, así como su capacidad antioxidante, identificación de compuestos fenólicos y cuantificación de antocianinas totales del fruto, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el colorante extraído del fruto de *Passiflora biflora* Lam 1789 como aditivo en tres bebidas modelo y conocer su funcionalidad de coloración (Sari et al., 2012; Zhao et al., 2020).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fácil aplicación, disponibilidad y estabilidad de los colorantes sintéticos ha provocado que se encuentren en cualquier alimento, ya que, al ser solubles en agua han sido fabricados como polvo, gránulos y líquidos. Durante el periodo de 1936 y 1960 se realizaron estudios sobre la seguridad de estos colorantes, donde se reveló que eran inseguros para el consumo humano, provocando que los consumidores presionaran a los fabricantes para reemplazar los colorantes sintéticos por naturales. Actualmente los colorantes naturales cuentan con una gran demanda por parte de la industria alimentaria debido a los beneficios que brindan a la salud. Entre los principales grupos de colorantes naturales se encuentran las antocianinas, carotenoides, clorofilas y betalaínas, siendo el primer grupo el principal objetivo de numerosos estudios, ya que sus propiedades colorantes son responsables de brillantes colores naranja, rosa, rojo, violeta y azul en las flores y frutos de algunas plantas. Además, su actividad antioxidante ha tenido un impacto positivo en la prevención de enfermedades neuronales y cardiovasculares, por lo que surge la necesidad de identificar especies vegetales ricas en antocianinas; así que se plantea su posible presencia en frutos de *P. biflora*, debido a la similitud en las características físicas de su piel con las uvas (Loypimai et al., 2015, Munawar, Makiah y Jamil, 2014).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar el colorante extraído del fruto de *Passiflora biflora* Lam 1789 como aditivo en tres bebidas modelo y conocer su funcionalidad de coloración.

Objetivos específicos

1. Determinar las características físicas y químicas del fruto de *P. biflora* Lam para conocer sus proporciones de grasas, humedad, cenizas y capacidad antioxidante.
2. Caracterizar químicamente los extractos de *P. biflora* Lam para comparar su contenido de antocianinas versus especies reportadas por medio de LM-MS/MS y antocianinas totales.
3. Evaluar la estabilidad del colorante por tratamientos acelerado y térmicos en tres bebidas modelo para determinar su degradación.

HIPÓTESIS

El fruto de *Passiflora biflora* Lam 1789 tiene un contenido de antocianinas igual o superior al reportado en uvas y su calidad es adecuada para su uso como colorante natural.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Colorantes artificiales

Desde la prehistoria el hombre se ha distinguido por usar colorantes naturales en diferentes productos, como objetos artesanales que aún subsisten. El color en los alimentos ha influido en la aceptabilidad y elección de compra, provocando que los alimentos se vean más apetitosos para los consumidores. Debido a la fácil aplicación, disponibilidad, solubilidad y estabilidad de los colorantes sintéticos, sustituyeron a los colorantes naturales (Damant, 2011; Baliarsingh et al., 2012; Viguera y Portillo, 2016; Swer et al., 2019). Se denominan colorantes artificiales o sintéticos a los que fueron obtenidos por síntesis química, siendo los mono y diazo los más usados en la industria alimenticia, que a su vez son más de la mitad de los colorantes aprobados por los Estados Unidos y la Unión Europea (Corradini, 2018).

Han sido ampliamente utilizados como aditivos alimenticios debido a que compensan las variaciones naturales de las materias primas como la pérdida de color durante su procesamiento. Su bajo costo de producción y alta eficacia a bajas concentraciones ha provocado que sea ampliamente usado sobre los colorantes naturales. Sin embargo, su uso ha sido cuestionado en temas de seguridad alimentaria, debido a que algunos colorantes artificiales eran inseguros para el consumo humano, pues durante los años 1936 y 1960 se descubrió que estos manifestaban ser tóxicos y dañinos a la salud, como lo es el incremento de respuestas alérgicas en los niños. Por lo que ha sido necesario la obtención de colorantes naturales, ya que al ser obtenidos de fuentes naturales con solventes polares son toxicológicamente seguros (Abramsson-Zetterberg y Ilbäck, 2013; Corradini, 2018; Munawar y Jamil, 2014; Scotter, 2003).

4.2. Colorantes naturales

Actualmente los colorantes naturales han tenido una alta demanda en la industria alimentaria ya que brindan beneficios a la salud, además de que pueden ser obtenidos de fuentes vegetales y animales. Algunos de los principales colorantes naturales son antocianinas, carotenoides y clorofilas, los cuales son obtenidos a partir de plantas, siendo las antocianinas, objeto de diferentes investigaciones principalmente por los beneficios que representan a la salud, como potencial antioxidante y efecto protector contra el daño provocado por estrés oxidativo. Son metabolitos vegetales secundarios responsables de colores azul, púrpura y rojo en frutos rojos. Uvas, fresas, cerezas y col roja son algunos ejemplos de alimentos vegetales ricos en antocianinas de los cuales se han hecho extracciones para su estudio y aplicación de diferentes productos alimentarios (Baliarsingh et al., 2012; Damant, 2011; Lea y Henry, 2003; Loypimai et al., 2015; Munawar y Jamil, 2014; Viguera y Portillo, 2016; Zhu et al., 2012).

En la Figura 1, se muestran diferentes tipos de colorantes naturales como las antocianinas que son obtenidas a partir de frutos rojos, carotenoides asociados a lípidos localizados en plantas superiores y algas, las clorofilas que se encuentran en los cloroplastos donde el verde brillante está determinado por la presencia de un átomo de magnesio central en un anillo de porfirina. Otros colorantes menos comunes como betalaína y curcumina tienen colores amarillo-rojo y amarillo respectivamente (Lea y Henry, 2003; Munawar y Jamil, 2014).

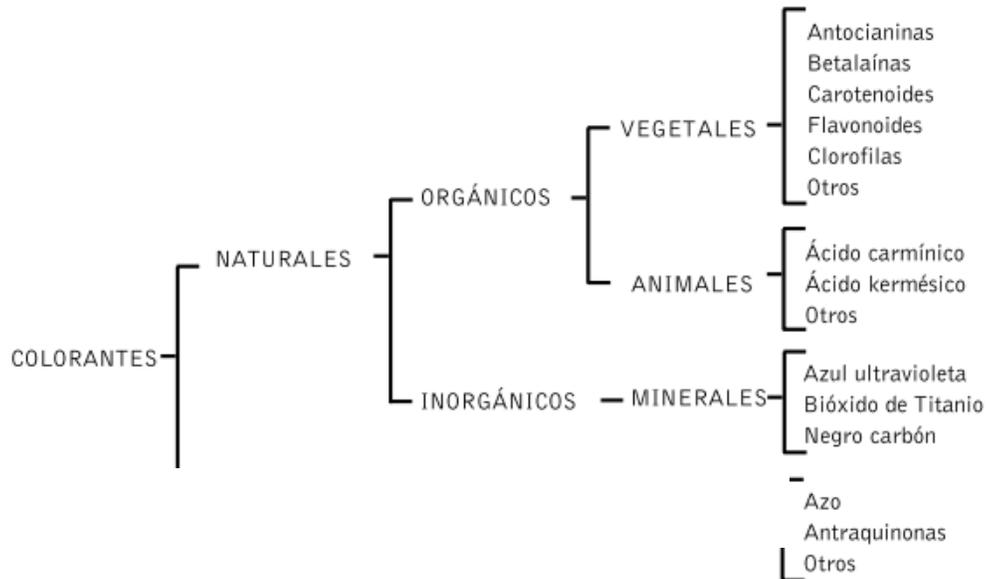


Figura 1. Tipos de colorantes según su origen (Vigueras y Portillo, 2016).

4.3. Antocianinas

Las antocianinas forman parte de uno de los grupos más grandes de pigmentos solubles en agua, constituyen una de las subclases de los flavonoides y pertenecen al grupo fenólico en forma glicosiladas, son responsables de colores rojo, morado y azul. Este grupo se obtiene principalmente de frutos o la piel de frutos rojos, como uvas, manzanas rojas, ciruelas, otros. Su actividad antioxidante antirradical las ha llevado a ser reconocidas dentro de la industria, ya que se han usado en la prevención de enfermedades neuronales y cardiovasculares, pues las propiedades que más las destacan son: antiinflamatorias, quimioterapéuticas, cardioprotectoras, hepatoprotectoras y neuroprotectoras. Por lo tanto, se han hecho diversos estudios para la incorporación de las antocianinas a diferentes productos alimenticios como bebidas, refrescos, lácteos, mermeladas y dulces (Espín et al., 2000; Lea y Henry, 2003; Munawar y Jamil, 2014; Swer et al., 2019).

Cabe mencionar que las antocianinas han presentado sensibilidad al pH, ya que exhiben diferentes colores a distintas escalas de pH, desde el amarillo (pH 13), verde (pH 11), azul (pH 10), púrpura (pH 7) y rojo (pH 1). Otras condiciones que han provocado cambios en la estabilidad de

antocianinas, son temperatura, iluminación y el tiempo de almacenamiento, ya que afectan su degradación y cambio de color, pero métodos de secado por aspersión y liofilización han sido métodos suaves para la obtención de pigmentos polvos (Weber, Boch y Schieber, 2017; Chen et al., 2019).

La col lombarda es uno de los alimentos en los que se encuentran presentes las antocianinas, siendo cianidin-3,5-diglucósido, cianidin-3-soforosido-5-glucósido acilado las estructuras dominantes presentes en este alimento, representativas del grupo de los flavonoides y derivados de 2-fenilbenzopirilio. Las antocianinas se han considerado como sustituto de colorantes artificiales debido a sus colores brillantes y atractivos, que, gracias a su solubilidad, se incorporan fácilmente en diferentes sistemas agroalimentarios. Otros estudios han demostrado que las antocianinas cuentan con diferentes propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antibacteriales, tienen capacidad para eliminar radicales libres y contribuyen en la reparación del daño celular, pero sin ser tóxicos ni mutagénicos (Bordignon-Luiz et al., 2007; Haddar et al., 2018; Harlen y Jati, 2018).

4.4. Antocianinas en *Passiflora*

El fruto de *Passiflora biflora* Lam, al igual que el maracuyá (*P. edulis*), es una fruta que pertenece a la familia *Passifloraceae*, se caracteriza por ser ovalados y para el caso de *P. biflora* Lam su color es morado con pericarpio suave en estado maduro. El centro del fruto contiene semillas pequeñas y duras. Es una especie silvestre, lo cual le permite adaptarse a diferencia del maracuyá convencional. Estudios han reportado la presencia de antocianinas como cianidin-3-O-glucósido, quercetin-3-glucosido, peonidin-3-glucósido y cianidin-3-rutinósido (Fonseca A.M.A et al., 2022; Kawasoe et al., 2021).

Las antocianinas son sustancias abundantes en los pigmentos, al tener baja estabilidad durante su procesamiento les ha generado una desventaja al suplir los colorantes artificiales, el pH y la

temperatura de almacenamiento y procesamiento son los principales factores que afectan el color y la estabilidad química de las antocianinas. Actualmente con el desarrollo de técnicas y métodos de estabilización de antocianinas, ha provocado el interés por el uso de colorantes naturales a partir de productos agrícolas, como col roja y batata morada (Kawasoe et al., 2021; Luna-Vital et al., 2017; Zhao et al., 2020), por lo que un colorante del fruto de *P. biflora* Lam es una alternativa para el desarrollo de estos colorantes naturales.

4.5. Estabilidad de las antocianinas

La incorporación de antocianinas a productos alimentarios no solo beneficia la apariencia de los productos, sino también son de beneficio para la salud del consumidor. Las antocianinas aisladas de su entorno natural tienden a ser susceptibles a decoloraciones y pérdida de bioactividad por degradación química, generalmente provocada por el pH, oxígeno, temperatura y luz. Es por eso que se están llevando a cabo estudios que permitan identificar productos ricos en antocianinas, así como estabilizadores para su aplicación como colorantes en alimentos y bebidas ácidas para obtener una vida útil aceptable (Chung et al., 2016; Luna-Vital et al., 2017; Sari et al., 2012; Yang et al., 2021).

En soluciones acuosas con pH menor a 3 se ha demostrado que el catión flavilio rojo es la forma predominante de antocianina, a medida que el pH aumenta los cationes de flavilio se vuelven inestables, se convierten en pseudobases incoloras a pH 4-5, a pH 6-7 bases quinoidales azules y chalconas de color amarillo claro a incoloro con pH mayor a 7, debido a que las antocianinas son propensas a ataque nucleofílico por el agua, provocando la subsecuente degradación y decoloración (Chatham et al., 2020; Sampaio et al., 2021; Zhao et al., 2020).

Kawasoe et al.(2021) han realizado estudios para la obtención de un colorante natural a partir del pericarpio del fruto de *P. edulis* Sims, mejor conocido como maracuyá, fruto ovalado que

durante su madurez se caracteriza por tener un pericarpio duro de color amarillo, marrón rojizo o púrpura, su pulpa y jugo son amarillos y viscosos. El sabor agridulce de este fruto ha provocado que sea de interés para el consumidor, pero la dureza del pericarpio ha provocado que se deseche su cáscara. Analizaron el pericarpio de *P. edulis* Sims y demostraron que es un material apto para la obtención de colorante natural, logrando dar color a alimentos procesados como gelatina y fideos, además de ser un colorante estable al calor, la luz y el almacenamiento.

4.6. Distribución y diversidad

La familia *Passifloraceae* está compuesta por 16 géneros, los cuales se encuentran distribuidos en regiones tropicales y subtropicales, siendo el género *Passiflora* el más grande, ya que comprende más de 560 especies de vides, lianas, árboles y arbustos. Este género está distribuido en regiones templadas y tropicales de América, pero es rara su presencia en Asia, Australia y África tropical. Su distribución va desde el nivel del mar hasta altitudes que superan los 3000 metros sobre el nivel del mar. En una clasificación infragenérica, Feuillet y Mac Dougal agruparon las especies de *Passiflora* en cuatro subgéneros: *Astropheia*, *Deidamioides*, *Decaloba* y *Passiflora* (Carvajal de Pabón et al., 2011; Pacheco et al., 2016).

4.7. Descripción botánica

Las plantas de este género forman parte de una gran riqueza a nivel económico, nutricional y en recursos genéticos, ya que algunas especies cuentan con propiedades sedativas, antiespasmódicas y antibacteriales, son cultivadas principalmente por la producción de frutas, así como usos ornamentales. Entre sus usos farmacológicos está el desarrollo de fármacos ansiolíticos y sedantes, algunas especies han sido usadas tradicionalmente para tratar la ansiedad, el insomnio, histeria, epilepsia y espasmos o dolor. Son hierbas y arbustos trepadoras con zarcillos axilares. Tallo herbáceo o leñoso y trepador. Hojas alternas, a veces simples, enteras, lobuladas o palmeadas, a

veces compuestas, imparipinnadas; las estípulas germinan en la base de los peciolos; zarcillos axilares surgiendo de pedicelos estériles. Las flores pueden ser bisexuales o unisexuales. El receptáculo es grande y por lo regular es ahuecado como una taza, tiene numerosos apéndices filamentosos o anulares entre la corola y los estambres, que son de colores brillantes y forman una corona conspicua. Cáliz de 3-5 sépalos imbricados libres o basalmente connatos. Corola de 3-5 pétalos connados libres. Estambres 3-5 insertados ya sea en la parte inferior del perianto; filamentos subulados o filiformes que envuelven el ginóforo; anteras versátiles. Ovario superior más o menos estipulado y unilocular de 3-5 carpelos unidos que contienen varios óvulos antrópicos en placentas parietales. Estilos iguales en número a las placentas, agrupados en la base, distintos en la parte superior, extendidos; estigmas clavados; óvulos numerosos unidos a 3-5 placentas lineales. El fruto es una baya indehiscente o una cápsula con 3-5 válvulas semiplacentíferas. Semillas numerosas; funículo dilatado en un arillo pulposo cupuliforme: testa crustácea, foveolada. Embrión recto; cotiledones foliáceos, radícula cilíndrica (Carvajal de Pabón et al., 2011; Dhawan et al., 2001, 2004).

La especie más usada y conocida de este género es la *Passiflora edulis*, es popular por su pulpa y las infusiones que se pueden realizar con las hojas, ya que han sido usadas como sedantes y tranquilizantes, además del potencial antiinflamatorio que se ha reconocido. El fruto ha sido ampliamente utilizado en el desarrollo de mermelada, gelatina, yogur, vino, en el área de la medicina popular, así como agente hidratante y cosmético. Las semillas son consideradas comestibles por su alto contenido de proteínas y aceites compuestos por ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico (Silva et al., 2013).

El fruto maracuyá morado (*P. edulis* f. *edulis*) ha sido descrito con morfología de globular a ovoide, con un diámetro de 4-5 cm y un peso promedio de 35 g cuando el fruto está maduro lo envuelve una cáscara suave arrugada (pericarpio), compuesto por tres tejidos: epicarpio duro, ceroso y de color morado oscuro, un parénquima blanco y esponjoso (mesocarpio), y el endocarpio que es la región placentaria, el interior del fruto está lleno de una pulpa gelatinosa de color amarillo anaranjado que se compone por arilos, los cuales tienen incrustadas semillas pequeñas como se observa en la Figura 2 (Fonseca, A.M.A. Geraldi et al., 2022).

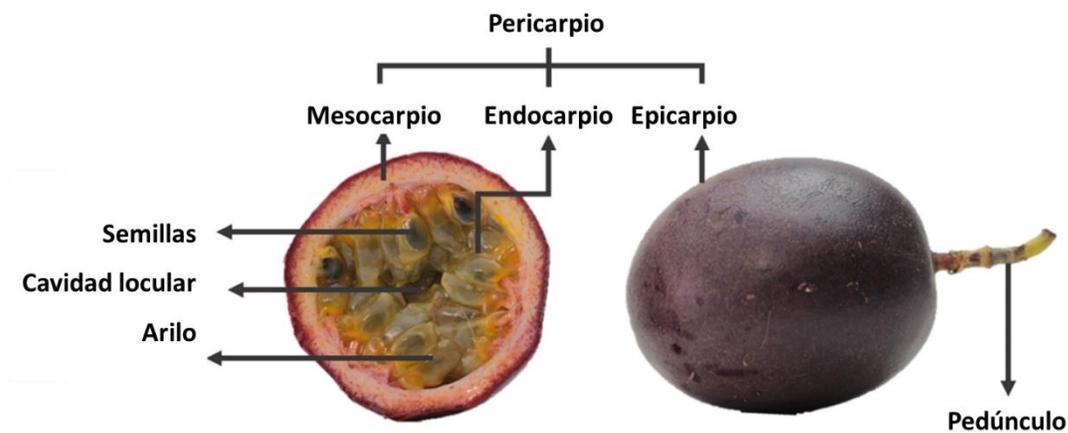


Figura 2. Morfología de *Passiflora edulis* f. *edulis* (Fonseca, A.M.A et al., 2022)

4.8. Descripción botánica de *Passiflora biflora* Lam

P. biflora Lam 1789, es nativa del Neotrópico desde México hasta Colombia y Venezuela, pertenece al subgénero *Decaloba*. Esta especie cuenta con hojas alternas y obreniformes anchas, 3 venas desde la base, muesca poco profunda, ocelos 4-6 en ambas superficies, setulosas en ambas superficies; peciolo de 0.8-1.8 cm de largo; flor emparejada en axilas, con pedúnculo y pedicelo de 0.8-1.0 cm de largo; brácteas lanceoladas de 2 mm de largo; 5 sépalos de blanco a amarillo verdoso; 5-7 pétalos blancos; filamentos coroneales con 2 espirales, cada uno con 30-35 filamentos connados en la base, amarillos, verdes; espiral exterior de 8-10 mm de largo y 0.9-1.1 de ancho; espiral interior de 3.5-4 mm de largo y 0.4-0.5 de ancho; opérculo plicado de 3 mm de altura y amarillo

verdoso; androginóforo; 5 estambres; ovario ovalado; 3 estilos. Baya ovalada de semillas ovadas a ovals de 3-3.5 mm de largo y 2-2.25 mm de ancho de color negro-marrón. Cabe mencionar que esta especie tiene dos flores que crecen juntas en las axilas de las hojas como se observa en la Figura 3 (A. Chung et al., 2018).

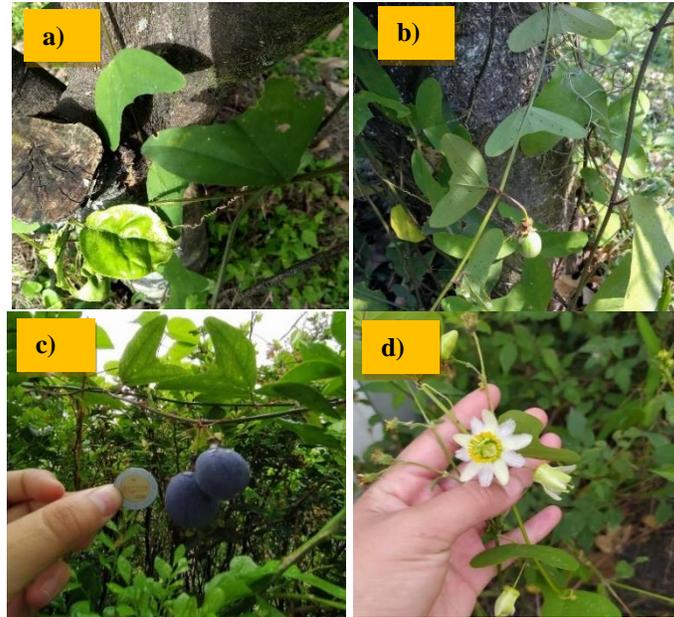


Figura 3. *Passiflora biflora* Lam; a) anverso de las hojas; b) reverso de las hojas; c) tamaño de referencia de los frutos, y d) flor

4.9. Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos en *Passiflora*

Se ha popularizado el consumo de frutas y verduras debido a sus propiedades y componentes, entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales han sido identificados en especies como *Passiflora alata* y *Passiflora edulis*. Estos polifenoles al tener propiedades antioxidantes han generado que el interés por estas dos especies vaya en aumento, ya que se les ha atribuido la captación de radicales libres, así como la reducción de estrés oxidativo ayudando a la prevención de enfermedades como diabetes tipo 1 y 2 (Deng et al., 2011; Saravanan y Parimelazhagan, 2014; Silva et al., 2013).

Existen ensayos para determinar la capacidad antioxidante de estos frutos, mediante los ensayos 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), en los cuales se busca reducir y eliminar los radicales libres que llevan el mismo nombre. El ensayo DPPH es usado para determinar la actividad antioxidante de compuestos fenólicos purificados y extractos de plantas. Se ha determinado que, en su mayoría, los antioxidantes fenólicos reaccionan de forma lenta con DPPH. El radical DPPH se disuelve en etanol o metanol, obteniendo una disolución de color púrpura intenso, que tiene su pico de absorción a 517 nm, esta prueba cuenta con buena estabilidad, sensibilidad y viabilidad. El ensayo ABTS es usado para medir la capacidad de los antioxidantes, en la eliminación del radical catiónico ABTS generado en la solución acuosa, usando Trolox como estándar. En el ensayo de ABTS, un agente oxidante (permanganato de potasio) reacciona con la sal de ABTS, donde la reducción de este radical, verde azulado por los antioxidantes responsables de la donación de hidrógenos, se mide por la supresión de su espectro de absorción, dicha solución muestra su pico de absorbancia a 734 nm (Deng et al., 2011; He et al., 2020; Ratnavathi y Komala, 2016; Saravanan y Parimelazhagan, 2014).

CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN FÍSICA, QUÍMICA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL FRUTO DE *P. biflora* LAM

Kimberly Lara Sanchez¹, Dora Angélica Avalos de la Cruz¹, Victorino Morales Ramos¹, Carlos
G. García-García ¹, Teodoro Espinosa-Solares²

¹Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km. 348.5 Venta
Parada 11, 94500 Córdoba, Ver. México (sanchez.kimberly@colpos.mx; davalos@colpos.mx;
vicmor@colpos.mx; carlogarcia@colpos.mx). ²Universidad Autónoma Chapingo, Posgrado en
Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230.
Texcoco, Estado de México, México. (t.espinosa.s@taurus.chapingo.mx). Autora para
correspondencia: davalos@colpos.mx

RESUMEN

La familia *Passifloraceae* está compuesta por 16 géneros distribuidos en regiones tropicales y subtropicales, siendo el género *Passiflora* el más amplio. Las plantas de este género cuentan con gran riqueza a nivel económico y nutricional por las propiedades sedativas, antibacteriales y antioxidantes, presentes también en sus frutos. *Passiflora biflora* Lam es nativa de América del sur y se caracteriza por ser una planta trepadora de tallos delgados. El objetivo de este estudio fue evaluar las características físicas, químicas y capacidad antioxidante del fruto para conocer sus atributos. Las partes del fruto utilizados para el extracto fueron epicarpio (Ep), mesocarpio (M) y la mezcla de estos dos (Full: F), los solventes utilizados fueron agua (W), etanol (E) y agua: etanol (50:50 WE). Se emplearon ensayos de inhibición del radical libre (DPPH), de decoloración del radical catiónico (ABTS) y colorimétrico Folin-Ciocalteu. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con diseño factorial 3^2 a los resultados de capacidad antioxidante de los diferentes extractos con los solventes indicados, y comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$). El fruto midió 26.55 ± 3.72 mm de longitud, 22.3 ± 3.61 mm de diámetro; el peso fue de 6.62 ± 2.52 g. El contenido de humedad fue de 86.18 ± 0.01 %, cenizas 0.84 ± 0.01 % y grasas 0.51 ± 0.01 %. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la cuantificación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en los diferentes extractos. El contenido total de compuestos fenólicos más alto fue para el extracto de epicarpio en agua:etanol (EpWE) de 3739.00 ± 152.92 μg ácido gálico g^{-1} . Para capacidad antioxidante DPPH y ABTS, los porcentajes de inhibición más altos fueron los obtenidos para los extractos de pulpa y etanol (Ep y M) en los diferentes extractos, de 95.95-99.43% y 85.41-92.15 % respectivamente. Este fruto silvestre cuenta con propiedades antioxidantes para ser aprovechadas en la industria alimentaria.

Palabras clave: DPPH, ABTS, compuestos fenólicos, *Passiflora biflora*.

ABSTRACT

The *Passifloraceae* family is composed of 16 plants distributed in tropical and subtropical regions, the genus *Passiflora* being the largest. The plants of this genus have great economic and nutritional wealth due to their sedative, antibacterial and antioxidant properties, also present in their fruits. *Passiflora biflora* Lam is native to South America and is characterized by being a climbing plant with slender stems. The objective of this study was to evaluate the physical and chemical characteristics and antioxidant capacity of the fruit. The parts of the fruit used for the extract were epicarp (Ep), mesocarp (M) and the mixture of these two (Full: F), the solvents used were water (W), ethanol (E) and water: ethanol (50:50 WE). Free radical inhibition (DPPH), cation radical decolorization (ABTS) and Folin-Ciocalteu colorimetric assays were used. Analysis of variance (ANOVA) with factorial design 3^2 was performed on the results of antioxidant capacity of the different extracts obtained from *P. biflora* fruit and the different solvents, and Tukey's multiple comparisons ($p \leq 0.05$). The fruit measured 26.55 ± 3.72 mm in length, 22.3 ± 3.61 mm in diameter; the weight was 6.62 ± 2.52 g. Moisture content was 86.18 ± 0.01 %, ash 0.84 ± 0.01 % and fat 0.51 ± 0.01 %. Significant differences ($p \leq 0.05$) were observed in the quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity in the different extracts. The highest total phenolic compound content was for the epicarp extract in water: ethanol (EpWE) of 3739.00 ± 152.92 μg gallic acid g^{-1} . For DPPH and ABTS antioxidant capacity, the highest inhibition percentages were obtained for pulp and ethanol extracts (Ep and M) in the different extracts, 95.95-99.43% and 85.41-92.15% respectively. This wild fruit has antioxidant properties capable of being exploited in the food industry.

Keywords: DPPH, ABTS, phenolic compounds, *Passiflora biflora*.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Passiflora* son hierbas y arbustos trepadores con zarcillos axiliares, tallo herbáceo o leñoso y trepador, hojas alternas, a veces simples, enteras, lobuladas o palmeadas, otras veces compuestas, imparipinnadas; las estípulas germinan en la base de los pecíolos; zarcillos axilares surgiendo de pedicelos estériles. Las flores pueden ser bisexuales o unisexuales. El receptáculo es grande y por lo regular es ahuecado como una taza, tiene numerosos apéndices filamentosos o anulares entre la corola y los estambres, son de colores brillantes forman una corona conspicua. La especie *P. biflora* Lam 1789, es nativa del Neotrópico desde México hasta Colombia y Venezuela, pertenece al subgénero *Decaloba*. Tiene hojas alternas, obreniformes anchas, 3 venas desde la base, muesca poco profunda, ocelos 4-6 en ambas superficies, setulosas en ambas superficies; pecíolo de 0.8-1.8 cm de largo; flor emparejada en axilas, con pedúnculo y pedicelo de 0.8-1.0 cm de largo (Chung et al., 2018; Dhawan et al., 2001).

La capacidad antioxidante de los alimentos ha despertado el interés de investigadores debido a los beneficios a la salud, ya que el consumo de estos brinda protección frente algunos eventos patológicos. Tal es el ejemplo del efecto protector de una dieta rica en vegetales ante enfermedades coronarias (Espín et al., 2000).

Estudios han reportado la capacidad antioxidante y características proximales de diferentes especies del género *Passiflora*; sin embargo, debido a las escasas investigaciones sobre el fruto de *P. biflora*, el presente estudio tuvo como objetivo la caracterización física y química del fruto de *P. biflora* para contribuir al conocimiento de sus atributos (Saravanan y Parimelazhagan, 2014).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Caracterización física y química de los frutos

2.1.1. Dimensiones y peso de los frutos

En el Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados se han desarrollado trabajos de investigación básica para conocer esta especie y su potencial para obtención de colorante natural, por lo que se cuenta con una plantación para obtener los frutos analizados. Se cosecharon frutos maduros y frescos de la especie de *P. biflora* en el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, el cual se ubica a 650 msnm, 18° 50' LN y 96° 51' LO. El clima de la zona es cálido-húmedo con lluvias en verano y temperatura media de 22 °C, máxima de 35 °C y mínima de 10 °C. Se colectaron 60 frutos por la mañana, posteriormente se caracterizaron físicamente parámetros como tamaño, peso, y número de semillas. El peso de los frutos fue tomado sin el pedúnculo en una balanza de precisión (SCOUTTM Pro OHAUS), y el largo y ancho de los frutos fue medido con un vernier digital de 15 cm (Pie de Rey Calibrador Digital Vernier STAINLESS HARDENED).

2.1.2. Humedad

La determinación de humedad fue llevada a cabo por pérdida de peso en un horno de secado con sistema de flujo de aire (TERLAB), de acuerdo con el método 964.22 de la AOAC (1990), se colocaron charolas en el horno a una temperatura de 105 °C durante 12-24 h hasta que alcanzaron un peso constante, posteriormente se pusieron en desecador durante 10 min y se procedió a pesar. Se pesaron 6 g de muestra fresca en las charolas y se metieron en el horno de secado a 105 °C. Finalmente se enfriaron en desecador durante 10 min y se pesaron. El porcentaje de humedad fue calculado con la ecuación 1.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{A}{B} * 100$$

Ecuación 1

Donde:

A = Peso de muestra seca (g)

B = Peso de muestra húmeda (g)

2.1.3. Cenizas

El porcentaje de cenizas fueron determinadas por el método de calcinación directa de acuerdo con el método 942.05 de la AOAC (1990), se usaron crisoles de porcelana, que fueron colocados en el horno de secado con sistema de flujo de aire (TERLAB) durante 24 h a 110 °C, a continuación, se ubicaron en desecador durante 30 min, se tomó el peso del crisol, y se le añadieron 2 g de muestra, el proceso de calcinación inició en una parrilla de calentamiento hasta que las muestras dejaron de expulsar humo. Los crisoles con muestra fueron colocados en mufla (Marca Scorpion Scientific®, A-52230, México) durante 5 h a 550 °C, una vez que la muestra se incineró se dejó enfriar en la mufla. Una vez que las muestra estuvieron a temperatura ambiente fueron colocadas en desecador durante 30 min, finalmente se pesaron en la balanza analítica. El porcentaje de cenizas se determinó por medio de la ecuación 2.

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(M2 - M1)}{P} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$M1$ = Peso de crisol (g)

$M2$ = Peso de crisol con muestra calcinada (g)

P = Peso de muestra (g)

2.1.4. Determinación de grasas

El porcentaje de grasas se llevó a cabo de acuerdo a la norma AOAC 920.39 (2000) en un equipo Soxhlet. Se pesó 1 g de pulpa con cáscara del fruto de *P. biflora* seco y se colocó en dedales con porosidad. Se utilizó 80 mL éter anhidro (J.T. Baker®, EUA) como solvente de extracción, en un matraz de fondo plano en calentamiento hasta que se obtuvo una tasa de condensación entre 5 y 6

gotas por s durante 4 h. Posteriormente se secó el matraz en el horno durante 30 min a 100°C. Finalmente se pesó en la balanza analítica. El porcentaje de grasas fue obtenido con la ecuación 3.

$$\% \text{ de grasas} = \frac{(M_2 - M_1)}{P} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

M = Peso inicial del matraz (g)

B = Peso final del matraz (g)

P = Peso de muestra (g)

2.1.5. Prueba de dureza de los frutos

En un texturometro SHIMADZU EZ-SX se llevó a cabo la prueba de dureza en frutos verdes y maduros frescos (madurez sensorial) del fruto de *P. biflora* de acuerdo con las condiciones descritas por Axol-Rodriguez (2015). Al fruto de forma horizontal se le aplicó una fuerza utilizando un punzón de 3 mm de diámetro con una velocidad de 2 mm/s hasta un 25% de compresión a una temperatura de 25°C, los resultados son expresados en N.

2.2. Capacidad antioxidante de extractos de los frutos

2.2.1. Extractos del fruto de *P. biflora* Lam

Los extractos se obtuvieron a partir de las metodologías de Kawasoe et al. (2021), y Bendini et al. (2006), el método consistió en cortar en trozos las diferentes partes del maracuyá (epicarpio, mesocarpio y la mezcla de ambos), se pesaron 2 g y añadieron 10 mL de los diferentes solventes, agua, etanol y agua: etanol (50:50). La solución se dejó reposar durante 30 min en hielo y posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min a una temperatura de 4°C. Finalmente los extractos se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su uso. Se utilizaron diferentes claves para la identificación de los diferentes extractos: EpW: Epicarpio en agua; EpE: Epicarpio en etanol; EpWE: Epicarpio en agua: etanol; MW: Mesocarpio en agua; ME: Mesocarpio en etanol;

MWE: Mesocarpio en agua: etanol; FW: (Epicarpio y mesocarpio) completo en agua; FE: completo en etanol; FWE: completo en agua: etanol.

2.2.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre (DPPH)

La capacidad antioxidante por DPPH se determinó mediante la metodología descrita por Brand-Williams et al. (1995). Para la cual se preparó una solución de DPPH (Aldrich®, Rusia) con 0.1 mM en etanol, se tomaron 2.9 mL y se añadieron 0.1 mL del extracto obtenido. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm, 30 min después de que la reacción inició en el espectrofotómetro (Genesys 10S UV-visible Thermo Scientific). Se usó trolox (Aldrich®, Rusia) (Ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico) para obtener la curva de calibración (20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del radical DPPH, según la ecuación 4.

$$\% \text{ Inhibición} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

A_0 =Absorbancia del control sin extracto

A_t = Absorbancia de la muestra

2.2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS

El radical ABTS se determinó mediante la metodología descrita por Re et al. (1999) se obtuvo mezclando 5 mL del reactivo ABTS (Sigma®, Canadá) 7.00 mM y 440 μL de persulfato de potasio (J.T. Baker®, EUA) 140 mM. Esta solución se dejó reaccionar de 12-16 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Se añadió etanol a la solución hasta que la absorbancia llegó a 0.007 ± 0.05 en el espectrofotómetro (Genesys 10s UV, Thermo Scientific). La solución se diluyó en etanol hasta obtener una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Se mezclaron 3 mL de ABTS con 30 μL del extracto obtenido, se dejó reposar durante 6 min y posteriormente se midió la absorbancia a 734

nm. Se utilizó trolox para la curva de calibración y los resultados se expresaron como % de inhibición del radical ABTS (20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.2.4. Determinación de compuestos fenólicos

Para esta determinación se basó en el método de Saravanan y Parimelazhagan (2014). Se depositaron 100 μL de extracto en tubos de ensaye y añadió 1 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-aldrich®, EUA) 50 % v/v, la solución se homogenizó y se dejó reaccionar durante 1 min, a continuación se añadió 2.5 mL de solución de carbonato de sodio al 20%, se dejó reposar durante una hora y se midió la absorbancia a 725 nm en espectrómetro (Genesys 10s UV, Thermo Scientific). Se utilizó ácido gálico (Fermot®, México) para la curva de calibración (20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y los resultados fueron expresados como concentración μg de ácido gálico por gramo de muestra.

2.2.5. Análisis de resultados

Se llevó a cabo análisis de varianza (ANOVA) con diseño factorial 3^2 para el estudio de los resultados de capacidad antioxidante de los diferentes extractos obtenidos a partir del fruto de *P. biflora* y los diferentes solventes. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$) fue usada para comparar las medias de los parámetros evaluados utilizando el Software estadístico RStudio (RStudio® 4.0.5).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características físicas y químicas de los frutos

En el Cuadro 1, se muestran las características físicas de los frutos, y se comparan con otras especies reportadas (Aular y Rodríguez, 2003), como se observa, este fruto es de menor proporción

que el de *P. giberti*, pero más grandes que los frutos estudiados por Chung et al. (2018), lo cual puede ser atribuida a la diferencia ambiental entre las dos zonas de estudio.

Cuadro 1. Tamaño, peso y número de semillas en frutos de *P. biflora* y otras especies reportadas.

Tamaño	<i>P. biflora</i> *	(Aular y Rodríguez, 2003)				
		<i>P. biflora</i> (Axol-Rodríguez, 2015)	<i>P. biflora</i> (Chung et al. 2018)	<i>P. edulis</i>	<i>P. cincinata</i>	<i>P. giberti</i>
Longitud (mm)	26.55±3.72	26.70±4.20	1.50-2.00	ND	ND	ND
Diámetro (mm)	22.30±3.61	22.41±3.30	1.00-1.30	ND	ND	ND
Peso (g)	6.56±2.52	7.66±1.70	ND	73.72	53.06	13.51
Número de semillas	105.87±50.20	ND	ND	ND	ND	ND

*Los valores son presentados como media ± desviación estándar. ND (No determinado).

Los frutos de *P. biflora* fueron descritos por Axol-Rodríguez et al. (2015) como coriáceos en estado verde, que al madurar adquieren una textura blanda, a diferencia de otras especies como el maracuyá convencional, puede ser aprovechado en su totalidad, además de contar con un epicarpio delgado y frágil al daño mecánico. En la prueba de dureza para frutos maduros se obtuvo un valor de 0.70±0.02 N (Newtons) y para frutos verdes fue de 1.66±0.03 N. Se observó una disminución en la firmeza de los frutos en las dos etapas de maduración, lo cual se atribuye a una pérdida de elasticidad y viscosidad de la pulpa (Arrazola Paternina et al., 2022).

El Cuadro 2 muestra el contenido de humedad, cenizas y grasas del fruto de *P. biflora*, y los reportados por Axol-Rodríguez et al. (2015) y Jiménez et al. (2011), este último reportó para la especie *P. edulis* Sims f. *edulis*. El contenido de humedad obtenido fue ligeramente superior a lo reportado por Axol-Rodríguez et al. (2015), lo cual puede ser atribuido por la temporada de cosecha y las condiciones ambientales cambiantes entre los años de análisis, en comparación *P. edulis* f. *edulis*, que tiene un 82.1 ±0.10 % de humedad. Esta diferencia puede ser atribuido a la presencia de otros componentes no estudiados para *P. biflora*. En el caso de la determinación de cenizas se

observó que *P. biflora* tiene mayor contenido mineral que el reportado para *P. edulis* f. *edulis*. El porcentaje de grasa en el fruto de *P. edulis* f. *edulis* no fue determinada, pero se observó que no hubo diferencia a lo reportado por Axol-Rodriguez et al. (2015).

Cuadro 2. Determinaciones de humedad, cenizas y grasas del fruto de *P. biflora* y *P. edulis* f. *edulis*.

Componente	<i>P. biflora</i> *	<i>P. biflora</i> Lam Axol-Rodriguez et al. (2015)	<i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i> Jiménez et al. (2011).
Humedad (%)	86.18±0.01	84.50±0.04	82.1 ±0.10
Cenizas (%)	0.84±0.01	0.83±0.01	0.50±0.1
Grasas (%)	0.51±0.01	0.50±0.08	0

*Los valores son presentados como media ± desviación estándar (n=4).

*Fuente Original.

3.2. Capacidad antioxidante

3.2.1. Capacidad antioxidante por inhibición del radical libre DPPH

La capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos proporcionaron información referente a la actividad antirradical que poseen los extractos. Estas reacciones fueron llevadas a cabo entre el radical DPPH estable y el antioxidante de los extractos. En el Cuadro 3 se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los diferentes extractos del fruto de *P. biflora*. Se obtuvieron porcentajes de inhibición que varían entre 71.22-92.15%, el valor más alto corresponde al extracto de mesocarpio en etanol. En la especie *P. edulis* se ha reportado hasta un 64% de inhibición de DPPH; en *P. biflora* se han reportado porcentajes de 48.8 , 78.5 y 77.1 % con solventes etanol, agua y etanol:agua (70:30), respectivamente (Axol-Rodriguez et al., 2015; He et al., 2020).

Cuadro 3. Determinación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de los extractos de *P. biflora* Lam.

Extracto	Compuestos fenólicos (μg de ácido gálico g^{-1})	% de Inhibición	
		ABTS	DPPH
EpW	3119.83 \pm 150.78 b	98.82 \pm 0.01 a	87.18 \pm 0.01 a
EpE	2997.33 \pm 154.12 b	95.95 \pm 0.03 ab	91.53 \pm 0.01 a
EpWE	3739.00 \pm 152.92 a	99.43 \pm 0.00 a	90.48 \pm 0.00 a
MW	2551.50 \pm 149.35 d	96.54 \pm 0.02 a	89.25 \pm 0.01 a
ME	3139.83 \pm 203.53 b	98.11 \pm 0.02 a	92.15 \pm 0.00 a
MWE	2875.67 \pm 167.35 bc	98.75 \pm 0.01 a	90.71 \pm 0.01 a
FW	2055.67 \pm 189.52 d	80.95 \pm 0.09 bc	85.41 \pm 0.06 a
FE	2485.67 \pm 179.86 c	72.76 \pm 0.13 c	71.22 \pm 0.12 b
FWE	1587.33 \pm 131.78 e	79.30 \pm 0.10 c	68.74 \pm 0.09 b

Los valores son presentados como media \pm desviación estándar (n=4). Las medias con letras diferentes en cada columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

3.2.2. Capacidad antioxidante por el método antirradical ABTS

La capacidad antioxidante por ABTS es un método estudiado por espectrofotometría para medir la pérdida de color al añadir un antioxidante a la solución ABTS, la cual consta de color verde-azul. En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos a partir de los diferentes extractos obtenidos de *P. biflora*, los cuales muestran porcentajes de inhibición desde 72.76- 99.43 %, más altos que los reportados en estudios de extractos de la cáscara de *P. edulis* aplicados en carne, en los cuales fueron hasta de 60% de inhibición (Ramli et al., 2020).

3.2.3. Compuestos fenólicos

Como se observa en el Cuadro 3, el contenido de compuestos fenólicos varía en los diferentes extractos obtenidos del fruto de *P. biflora*, en el extracto del epicarpio del fruto en la mezcla de solventes etanol: agua (50: 50) se obtuvieron 3739.30 \pm 152.92 μg de ácido gálico g^{-1} , y el menor fue un valor de 1587.33 \pm 131.78 μg de ácido gálico g^{-1} en el extracto del fruto completo con la mezcla de solventes etanol: agua (50: 50). Axol-Rodríguez et al. (2015) reportaron valores que van de 2028 \pm 2.14 a 2770 \pm 2.85 μg de ácido gálico g^{-1} , para extractos de *P. biflora* en solventes de etanol y etanol: agua (70:50) respectivamente. De igual manera Barbosa Santos et al. (2021) reportaron

el contenido de polifenoles totales presentes en la pulpa de las especies *P. edulis* y *P. cincinnata* de 471.1 y 365 mg kg⁻¹ (μg g⁻¹), respectivamente.

4. CONCLUSIONES

La determinación de las características físicas, químicas y de actividad antioxidante de las partes del fruto y sus extractos con diversos solventes, nos permiten conocer las propiedades del fruto de *P. biflora* Lam e identificar sus usos potenciales. El extracto del epicarpio en agua: etanol fue el que mostró mayor inhibición para ABTS, y para DPPH fue el obtenido del mesocarpio en etanol; sin embargo, la prueba de Tukey mostró que no existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en las medias de los extractos obtenidos a partir del epicarpio y mesocarpio por separado.

El extracto del epicarpio en agua:etanol fue el que mostró mayor contenido de compuestos fenólicos, con diferencias significativas ($p \leq 0.05$) respecto a los obtenidos del epicarpio y mesocarpio tanto para ABTS como DPPH, lo que permite sugerir su aprovechamiento como aditivos en la industria alimentaria.

Estudios complementarios más detallados de las características físicas y químicas del fruto de *P. biflora*, permitirán ampliar el conocimiento de las propiedades y el aprovechamiento sustentable de esta especie de maracuyá con diversas bondades.

5. LITERATURA CITADA

- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC, Association of Official Agricultural Chemists* (15th ed.).
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis International, Association of Official Agricultural Chemists* (17th ed., Vol. 289, Issue 1982).
- Arrazola Paternina, G., Villadiego Luna, F. & Alvis Bermudez, A. (2022). Nutraceutical, thermophysical and textural characteristics of papaya (*Carica papaya* L) and incidence for post-harvest management. *Heliyon*, 8(4), e09231. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09231>
- Axol-Rodriguez, J. J. (Colegio de P. C. C. (2015). *ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN YOGUR ADICIONADO CON *Passiflora biflora* Lam Y *Stevia rebaudiana* Bertoni*. (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados.

- Bendini, A., Cerretani, L., Pizzolante, L., Toschi, T. G., Guzzo, F., Ceoldo, S., Marconi, A. M., Andreatta, F. & Levi, M. (2006). Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *European Food Research and Technology*, 223(1), 102–109. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0150-7>
- Aular & Rodríguez. (2003). Bioagro. *Bioagro*, 15(1), 41–46. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612003000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Barbosa Santos, T., de Araujo, F. P., Neto, A. F., de Freitas, S. T., de Souza Araújo, J., de Oliveira Vilar, S. B., Brito Araújo, A. J. & Lima, M. S. (2021). Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of the Pulp of Two Brazilian Passion Fruit Species: *Passiflora Cincinnata* Mast. And *Passiflora Edulis* Sims. *International Journal of Fruit Science*, 21(1), 255–269. <https://doi.org/10.1080/15538362.2021.1872050>
- Chung, A., Tam, K., Wang, Y., Chen, P. & Yang, S. (2018). *Passiflora biflora* Lam . (Passifloraceae): a Newly Naturalized Plant in Taiwan. *Revista Académica Del Museo Nacional de Taiwán*, 71(January 2019), 76–84. <https://doi.org/10.6532/JNTM.201806>
- Jiménez, A. M., Sierra, C. A., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Heredia, F. J. & Osorio, C. (2011). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, 44(7), 1912–1918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.007>
- Kawasoe, H., Wakamatsu, M., Hamada, S., Arata, Y., Nagayoshi, K., Uchida, R., Yamashita, R., Kishita, T., Yamanouchi, H., Minami, Y. & Kajiya, K. (2021). Analysis of natural colourant extracted from the pericarp of passion fruit. *Lwt- Food Science and Technology*, 136(P2), 110412. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110412>
- Dhawan, K., Kumar, S. & Sharma, A. (2001). Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(2–3), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00339-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00339-7)
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J. & García-Viguera, C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1588–1592. <https://doi.org/10.1021/jf9911390>
- Kawasoe, H., Wakamatsu, M., Hamada, S., Arata, Y., Nagayoshi, K., Uchida, R., Yamashita, R., Kishita, T., Yamanouchi, H., Minami, Y. & Kajiya, K. (2021). Analysis of natural colourant extracted from the pericarp of passion fruit. *Lwt- Food Science and Technology*, 136(P2), 110412. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110412>
- Ramli, A. N. M., Manap, N. W. A., Bhuyar, P. & Azelee, N. I. W. (2020). Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel powder extract and its application towards antibacterial and antioxidant activity on the preserved meat products. *SN Applied Sciences*, 2(10), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03550-z>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Saravanan, S. & Parimelazhagan, T. (2014). In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic

properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. In *Food Science and Human Wellness* (Vol. 3, Issue 2, pp. 56–64). <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.05.001>

He, X., Luan, F., Yang, Y., Wang, Z., Zhao, Z., Fang, J., Wang, M., Zuo, M. & Li, Y. (2020). *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 11(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617>

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE *P. biflora* LAM

Kimberly Lara Sanchez¹, Dora Angélica Avalos de la Cruz¹, Victorino Morales Ramos¹, Carlos
G. García-García ¹, Teodoro Espinosa-Solares²

¹Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km. 348.5 Venta Parada 11, 94500 Córdoba, Ver. México (sanchez.kimberly@colpos.mx; davalos@colpos.mx; vicmor@colpos.mx; carlosgarcia@colpos.mx). ²Universidad Autónoma Chapingo, Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230.

Texcoco, Estado de México, México. (t.espinosa.s@taurus.chapingo.mx). Autora para
correspondencia: davalos@colpos.mx

RESUMEN

Los colorantes artificiales han sido aditivos utilizados para compensar variaciones de los productos como la pérdida de color durante su procesamiento, al tener bajo costo y alta eficacia en concentraciones bajas reemplazaron a los colorantes naturales, pero que, al ser vinculados con efectos tóxicos, alergias e hiperactividad en niños, se ha buscado suplir su uso con colorantes naturales. Las antocianinas han sido reconocidas en la industria al ser usadas en la prevención de enfermedades neuronales y cardio vasculares, obtenidas principalmente de frutos o la piel de frutos rojos como uvas, fresas, ciruelas y la cáscara del fruto de *P. edulis* Sims, por lo que es posible su presencia en el fruto de *P. biflora* Lam. El objetivo de esta investigación fue caracterizar químicamente los extractos secos del fruto de *P. biflora*, para demostrar la presencia de antocianinas y así aprovechar este fruto como potencial colorante natural. Los extractos obtenidos se liofilizaron para eliminar el excedente de solventes, y cuantificar por antocianinas totales y LC-MS/MS el contenido de antocianinas. Los resultados muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de antocianinas por pH diferencial, entre 1933-8706 mg C3G eq 100 g⁻¹, lo cual mostró que los extractos obtenidos con la combinación de solventes aumentaban el contenido de antocianinas, a diferencia de estos por separado. El extracto MWE mostró los valores más altos en ambas técnicas. Se obtuvieron entre 33.68-51.9 mg C3G/100 g de extracto seco por LC-MS/MS, debido a que solo cuantificó el contenido de C3G, y con el método por pH diferencial se cuantificaron las antocianinas totales presentes. Se obtuvieron valores IC₅₀ para actividad antioxidante DPPH y ABTS de 0.90 y 1.05 mg mL⁻¹ respectivamente, menores a los reportados para *P. edulis* f. *edulis* y *P. mollissima*. Se demostró la presencia de antocianinas en los extractos, lo cual permite su aplicación como colorante natural en la industria alimentaria.

Palabras clave: antocianinas, kuromanina, ácido gálico, *Passiflora biflora*.

ABSTRACT

Artificial colorants have been additives used to compensate for variations in products such as loss of color during processing, having low cost and high efficacy in low concentrations, they replaced natural colorants, but being linked to toxic effects, allergies, and hyperactivity in children, they have sought to replace their use with natural colorants. Anthocyanins have been recognized in the industry for their use in the prevention of neuronal and cardiovascular vascular diseases, and have been obtained mainly from fruits or the skin of red fruits such as grapes, strawberries, plums and the skin of the fruit of *P. edulis* Sims, so it is possible that they are present in the fruit of *P. biflora* Lam. The objective of this research is to chemically characterize the dry extracts of the fruit of *P. biflora*, to demonstrate the presence of anthocyanins and thus take advantage of this fruit as a potential natural colorant. The extracts obtained were freeze-dried to eliminate excess solvents, and to quantify by total anthocyanins and LC-MS/MS the anthocyanin content. The results show significant differences ($p \leq 0.05$) in the anthocyanin content by differential pH, obtaining between 1933-8706 mg C3G eq 100 g⁻¹, which showed that the extracts obtained with the combination of solvents increased the anthocyanin content, unlike these separately. The MWE extract was the highest in both techniques. Between 33.68-51.9 mg C3G 100 g⁻¹ of dry extract were obtained by LC-MS/MS, because it only quantified the C3G content, and the differential pH method quantifies the total anthocyanins present. IC₅₀ values for antioxidant activity DPPH and ABTS of 0.90 and 1.05 mg. mL⁻¹ respectively were obtained, being lower than those reported for *P. edulis* f. *edulis* and *P. mollissima*. The presence of anthocyanins in the extracts was demonstrated, which allows its application as a natural colorant in the food industry.

Keywords: anthocyanins, kuromanina, gallic acid, *Passiflora biflora*.

1. INTRODUCCIÓN

Los colorantes artificiales como aditivos tienen el papel de compensar las variaciones naturales que sufren las materias primas durante su procesamiento. Debido al bajo costo de producción y alta eficacia la industria alimenticia les ha dado prioridad sobre los naturales, pero con la creciente preocupación por la seguridad de estos colorantes se han llevado a cabo estudios desde 1970 que han confirmado que algunos colorantes azoicos pueden causar hipersensibilidad, hiperactividad y trastornos por déficit de atención en niños (Buchweitz et al., 2012; Corradini, 2018; Scotter, 2003; Swer et al., 2019).

En respuesta a las reacciones tóxicas y alérgicas asociadas a los colorantes artificiales, ha surgido el interés por el uso de colorantes de origen naturales por su mayor biodegradabilidad y gran cantidad de compuestos benéficos a la salud como los flavonoides y las antocianinas, que a pesar de su menor estabilidad pueden intensificar el color, contribuyendo en la calidad sensorial de los productos y pueden ser encontrados en plantas, frutas y verduras (Baliarsingh et al., 2012; Buchweitz et al., 2012; Nabi et al., 2023).

En este trabajo se obtuvieron diferentes extractos del fruto de *P. biflora* Lam con varios solventes y partes del fruto para su estudio, por lo que el objetivo fue caracterizar químicamente los extractos de *P. biflora* Lam para comparar su contenido de antocianinas por medio de LM-MS/MS y antocianinas totales versus especies reportadas (Nabi et al., 2023).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Análisis de antocianinas

2.1.1. Liofilización de extractos

Para la obtención de extractos sólidos se liofilizaron, para este proceso cada extracto fue colocado en tubos fálcon de 50 mL al 50 % durante 24 h en congelación a una temperatura de -80 °C en un ultracongelador, los extractos etanólicos se colocaron en un evaporador rotatorio (HS-2005S-N HAHNSHIN Korea) hasta que se eliminó el excedente de etanol a una temperatura de 50 °C a 45 rpm, y se procedió a diluir en agua destilada para su correcta congelación en las condiciones descritas.

Una vez que los extractos estuvieron completamente congelados se liofilizaron en un liofilizador al vacío (LABCONCO, FreeZone 4.5) a -40 °C a una presión de 0.35 mbar durante 48 h, los extractos secos se almacenaron en los tubos Falcón dentro de bolsas ziploc con sílicagel desecante a una temperatura de 4 °C para reducir degradaciones.

2.1.2. Cuantificación de antocianinas por el método de antocianinas totales (TA)

El proceso de cuantificación de antocianinas se llevó a cabo de acuerdo al método de pH diferencial AOAC 2005.02 (2006) modificado para su lectura en un lector multiplaca (BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader), el principio de esta técnica consistió en el cambio de color reversible de pigmentos monoméricos de antocianinas por variación en el pH; a pH 1.0 existe la forma oxonio coloreada, y a pH 4.5 predomina la forma hemicetal incolora. La diferencia de absorbancia a 520 nm de los pigmentos es proporcional a la concentración de pigmento, los resultados se expresaron sobre la base de cianidina-3-glucósido.

Se realizaron dos soluciones tampón una a pH 1 (cloruro de potasio, 0.025M ajustado con HCl) y a pH 4.5 (acetato de sodio 0.4M ajustado con HCl), en los cuales se llevó a cabo la dilución de 0.5 mg colorante por mL de cada solución tampon, se diluyeron 40 µL de colorante y 160 µL de

cada pH en la placa de 96 pozos. La absorbancia se determinó por triplicado a 420 y 700 nm para pH 1 y 4.5 respectivamente, estas lecturas fueron leídas frente a un blanco de agua destilada. La medición a 700 nm fue para corregir la turbidez. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de cianidina-3-glucosido (cyd-3-glu o C3G) 100 g⁻¹ utilizando la ecuación 5.

$$\text{Equivalentes de cyd} - 3 - \text{glu}, \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \frac{A * MW * DF * 10^3}{\epsilon * l} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

A= (A_{520nm} -A_{700 nm}) pH 1.0 - (A_{520nm} -A_{700 nm}) pH 4.5; MW (peso molecular por sus siglas en inglés) = 449.2 gmol⁻¹ para cianidina-3-glucosido; DF= Factor de dilución establecido en D; 0.38=longitud lineal en cm; ε=26 900, siendo el coeficiente de extinción molar, en L*mol⁻¹*cm⁻¹, para cyd-3-glu; y 10³= factor de conversión de g a mg (Luna-Vital et al., 2017).

2.1.3. Identificación y cuantificación de fitoquímicos por LC-MS/MS

La identificación de fitoquímicos en los extractos secos fue analizada en un sistema de Cromatografía líquida Ultra-Perfomance (UPLC) (Class I of Waters) acoplado a un espectrofotómetro de masas (Synapt HDMi), utilizando una columna Acquity BEH (1.7 mm, 2.1 x 50 mm) con temperaturas de columna y muestra de 40 y 15 °C, respectivamente. La fase móvil fue compuesta por los solventes agua (A) y acetonitrilo (B), con 0.1 % de ácido fórmico (SIGMA) en ambos solventes. Las condiciones de gradiente de las fases móviles fueron 0-20 min gradiente lineal 1-99% para el solvente B, 20-24 min 99% isocrático, 24-25 min gradiente lineal 90-1% B con un tiempo de ejecución de 30 min. El caudal fue de 0.3 mL/min y se inyectó 5 µL de extracto (Luna-Vital et al., 2017; Ongkowijoyo et al., 2018).

2.2. Capacidad antioxidante de extracto seco

2.2.1. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre (DPPH)

Los extractos secos del fruto de *P. biflora* Lam fueron diluidos en agua destilada. Se evaluaron cuatro concentraciones: 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mg mL⁻¹. La solución de DPPH se preparó agregando 3 mg de DPPH a 41 mL de metanol, se aforó con agua destilada hasta completar 50 mL y la solución se sonicó durante 5 min. En una microplaca se agregaron 20 µL de cada concentración, se colocaron 200 µL de solución DPPH y la placa fue leída a los 0 y 30 min a 520 nm en un lector multiplaca con dispositivo de imagen celular (BioTek Cytation 5). Como control negativo se utilizó 20 µL de metanol y 200 µL de solución DPPH, y una curva de calibración con Trolox (50, 100, 200, 300, 400 y 500 µM). El resultado representa la media de tres experimentos independientes y se expresa como porcentaje de inhibición calculado como se expresa en la ecuación 4, de igual manera se expresan los resultados por IC₅₀ (concentración de extracto necesario para reducir el radical DPPH en un 50%), el cual se calculó mediante una curva de los valores porcentuales de inhibición en función de la concentración del extracto (Ribeiro et al., 2020).

2.2.1. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS

Los extractos secos del fruto de *P. biflora* Lam fueron diluidos en agua destilada. Se evaluaron cuatro concentraciones: 0.1, 0.25, 0.5 y 1.0 mg mL⁻¹. La solución de ABTS se preparó añadiendo 88 µL de persulfato de potasio en solución acuosa 140 mM a 500 µL de solución acuosa de ABTS 7 mM. La solución se incubó a 25 °C durante 12 h en la oscuridad. Luego se diluyeron 500 µL de solución ABTS en 20-25 mL de etanol hasta una absorbancia de 0.7-1.0 a 734 nm. En una microplaca se agregó 20 µL de cada concentración de muestra y 230 µL de solución ABTS, las muestras se incubaron durante 6 min en la oscuridad. La absorbancia de las muestras se leyó a 734

nm utilizando un lector multiplaca con dispositivo de imagen celular (BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader). Como control negativo se utilizó 20 μL de metanol en 230 μL de solución ABTS, y una curva de calibración con Trolox (50, 100, 200, 300, 400 y 500 μM). Los resultados se expresaron como porcentaje de y por IC_{50} , el cual se calculó mediante una curva de los valores porcentuales de inhibición en función de la concentración del extracto (Ribeiro et al., 2020).

2.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) por medio de un diseño factorial 3^2 para estudiar los contenidos de antocianinas por pH diferencial de los extractos obtenidos a partir de fruto de *P. biflora*. La prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$) fue usada para comparar las medias de los parámetros evaluados utilizando el Software estadístico RStudio (RStudio® 4.0.5).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de antocianinas

3.1.1. Liofilización de extractos

La obtención de extractos sólidos por liofilización permitió un manejo más preciso del colorante, permitiendo su uso en las caracterizaciones mencionadas, cabe mencionar que los extractos secos no necesitaron pasar por un proceso de purificación, ya que no se localizaron remanentes del fruto que pudieran perjudicar los análisis.

3.1.2. Cuantificación de antocianinas por el método de antocianinas totales (TA)

En extractos obtenidos a partir de moras se han llegado a cuantificar antocianinas totales desde 67.4 mg C3G eq 100 g^{-1} hasta 256 mg C3G eq 100 g^{-1} en peso fresco por el método de pH diferencial y en extractos obtenidos a partir de arándanos y pulpa de uva alcanzaron valores de 1515 y 1076 mg C3G eq kg^{-1} (151.5 y 107.6 mg C3G eq 100 g^{-1}) de peso seco, por lo que podemos demostrar de acuerdo al Cuadro 4 que el contenido de antocianinas se encuentra por arriba de los

resultados de estos dos estudios, pero dentro de los rangos obtenidos por Orak (2007), quien estudió el contenido de antocianinas de 16 diferentes cultivos de uvas rojas, los valores que reportó oscilaron entre 40.3-990.8 mg C3G eq kg⁻¹ en peso fresco (443.0-9908.0 mg C3G eq 100 g⁻¹) (Chandra Singh et al., 2022; Khanal et al., 2009; Orak, 2007).

Cuadro 4. Cuantificación de Antocianinas totales por pH diferencial de los diferentes extractos.

Muestra	mg C3G eq 100 g ⁻¹
EpW	1933.89±39.73 e
EpE	3686.48±58.06 c
EpWE	7729.66±107.54 b
MW	1860.73±34.40 e
ME	2764.06±148.24 d
MWE	8706.55±106.01 a
FW	1997.50±55.91 e
FE	2636.83±83.37 d
FWE	3657.85±96.06 c

Los valores son presentados como media ± desviación estándar (n=3). Las medias con letras diferentes en cada columna indican diferencia estadísticamente significativa (p≤ 0.05).

El extracto de mesocarpio en agua:etanol (50:50) mostró significativamente una mayor concentración de antocianinas seguido por el extracto de epicarpio en agua: etanol. El contenido de antocianinas de los diferentes extractos se ve influenciado por la concentración de etanol en las soluciones, ya que los extractos en etanol: agua (50:50) condujo a la extracción de antocianinas significativamente más alta con respecto a la obtenida con solo etanol. Estudios han medido la difusividad efectiva y el coeficiente de transferencia de masa durante la extracción de antocianinas, descubriendo que la concentración de etanol aumentaba la difusividad hasta un máximo, el cual se reducía al incrementar la concentración de etanol, siendo un fenómeno que se observó en este estudio, por lo que se determinó que los extractos en agua: etanol son los más aptos para su estudio por LC-MS/MS (Nour et al., 2013; Wang et al., 2021).

3.1.3. Identificación y cuantificación de fitoquímicos por LC-MS/MS

La identificación de fitoquímicos en los extractos secos fue realizada por dos rutas, la ruta dirigida, que cuenta con 68 estándares de compuestos. En el Cuadro 5 se muestran los 23 compuestos fenólicos predominantes en las muestras de EpWE, MWE y FWE, en los cuales se observan variaciones en cuanto a la cuantificación del contenido individual de estos compuestos.

Cuadro 5. Identificación cualitativa y cuantitativa dirigida por LC-MS/MS.

#	Identificación	Muestra		
		FWE	MWE	EpWE
1	Fenilalanina	549.14±20.83	487.10±54.97	367.00±35.04
2	Ácido gálico	14.91±0.38	16.12±1.19	22.28±1.88
3	Ácido Protocatéquico	34.07±0.63	27.14±1.06	36.03±2.56
4	Ácido gentísico	4.85±0.48	3.55±0.83	4.73±0.43
5	Ácido 4-hidroxibenzoico	53.91±1.18	25.48±4.31	47.49±2.20
6	Ácido 4-hidroxifenilacético	15.51±2.04	21.37±2.58	21.05±2.84
7	Ácido vanílico	5.87±0.29	2.96±0.71	4.53±0.25
8	Ácido cafeico	1.82±0.27	1.05±0.46	1.52±0.30
9	Kuromanina	336.85±37.87	519.18±123.58	387.05±28.59
10	Ácido 4-cumárico	57.42±6.41	23.49±7.06	50.85±5.78
11	Ácido ferúlico	13.75±2.44	8.56±3.82	12.13±0.39
12	Ácido sinápico	7.23±1.01	6.03±0.50	6.12±0.31
13	Ácido salicílico	13.25±0.80	9.09±1.50	16.20±3.50
14	Rutina	1.01±0.06*	1.25±0.33*	1.62±0.58*
15	Quercetina-3-glucósido	6.82±0.43	8.86±1.22	10.82±2.18
15	Luteolin-7-O-glucósido	0.92±0.25*	0.33±0.27*	1.94±0.77*
17	Kaempferol-3-O-glucósido	1.16±0.16*	1.08±0.09*	1.47±0.33*
18	Miricetina	19.53±1.21	23.55±3.13	26.72±4.17
19	Secoisolariciresinol	94.74±7.30	68.11±11.81	93.25±4.66
20	Ácido t-cinámico	2.27±0.34	1.14±0.27	2.97±0.88
21	Quercetina	3.20±0.18	3.43±0.41	4.14±0.66
22	Luteolina	9.76±0.73	3.71±1.55	12.34±1.64
23	Naringenina	1.45±0.11	NI	5.71±0.24

La concentración se expresa en $\mu\text{g g}^{-1}$ de extracto seco. Los valores son presentados como media \pm desviación estándar (n=3) “NI”: No identificado. *Valor determinado por debajo del límite de cuantificación.

La presencia de antocianinas se observó en los 3 extractos, pero su contenido fue más alto para el extracto MWE, con un contenido de kuromanina (cianidin-3-O-glucósido) de $519.18 \mu\text{g g}^{-1}$ de extracto seco, además de actuar como pigmento es considerado como agente bioactivo de beneficio

a la dieta humana. La fenilalanina es el compuesto mayoritario para FWE con $549.14 \mu\text{g g}^{-1}$, y en menor contenido para MWE con $487.10 \mu\text{g g}^{-1}$. Se lograron identificar compuestos como ácido gálico, que cuenta con fuertes propiedades antioxidantes, tiene la capacidad de proteger tejidos y órganos del estrés oxidativo, localizándose en mayor contenido para el extracto de epicarpio. El ácido protocatéquico es un ácido fenólico natural de interés por su capacidad antioxidante, antibacterial y antiinflamatorias, además de ser soluble en agua, es usado en la modificación de macromoléculas como antioxidante. El ácido 4-hidroxibenzoico y ácido vanílico son compuestos fenólicos presentes en plantas naturales, incluyendo zanahorias, fresno espinoso y ginseng oriental, han sido estudiados por sus actividades anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobiana y antiinflamatorias. En el caso del ácido 4-hidroxifenilacético, ha sido identificado como agente antioxidante y antimicrobiano (Cásedas et al., 2019; Ekundayo et al., 2022; Liang et al., 2022; Myint et al., 2021; Raj y Singh, 2022; YujiaLiu et al., 2021).

Los ácidos 4-cumarico, ferúlico, sinapínico y cafeico, son ácidos fenólicos presentes en múltiples plantas con varias actividades farmacológicas, como propiedades de protección contra el daño provocado por rayos UVB. El ácido salicílico es un compuesto natural de importancia en la defensa de las plantas contra el estrés biótico y abiótico. Finalmente, otro de los componentes de mayor proporción es Secoisolariciresinol, el cual es un metabolito secundario que está presente en las plantas, y que además cuenta con capacidad antioxidante (Carolina Oliveira dos Santos et al., 2019; Feng et al., 2022; Lodovici et al., 2009; Raish et al., 2022; Singh, 2023).

3.2. Capacidad antioxidante de extracto seco

3.2.1. Capacidad antioxidante por inhibición del radical libre DPPH

La capacidad antioxidante (DPPH) proporcionaron información referente al porcentaje de inhibición que presenta 1 mg mL^{-1} de extracto seco de los diferentes tratamientos, así como la

concentración necesaria para reducir el 50% de radical DPPH (IC₅₀). El porcentaje de inhibición más alto fue el presentado en el extracto EpWE con 52.22%, con un IC₅₀ de 0.90 mg mL⁻¹ siendo un valor más pequeño al reportado por dos Reis et al. (2018), que reportaron un IC₅₀ de 69.8 mg mL⁻¹ y 33.2 mg mL⁻¹ de extracto seco para cáscara y pulpa de *P. edulis f. edulis* respectivamente, lo cual indica que los diferentes extractos de *P. biflora* Lam presentan una capacidad antioxidante más alta a lo reportado por dos Reis et al. así como lo reportado por Domínguez-Rodríguez et al. (2019), quien reportó un IC₅₀ de 10.6 mg mL⁻¹ para extractos de *P. mollissima* como se muestra en el Cuadro 6. De igual manera se observaron valores más pequeños a los reportados por Axol-Rodriguez et al. (2015), quien obtuvo valores de 1.35-5.92 mg mL⁻¹ para extractos obtenidos de la pulpa de *P. biflora* Lam en diferentes solventes, siendo agua el de mayor capacidad antioxidante.

Cuadro 6. Capacidad antioxidante ABTS y DPPH de extractos secos de frutos de *P. biflora*.

Muestra	DPPH		ABTS	
	% Inhibición (1 mg mL ⁻¹)	IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)	% Inhibición (1 mg mL ⁻¹)	IC ₅₀ (mg mL ⁻¹)
EpW	34.04±4.48 b	1.61±0.04 a	48.33±1.31 a	1.05±0.03 e
EpE	34.86±2.83 b	1.41±0.10 ab	42.26±2.29 a	1.27±0.13 de
EpWE	52.22±3.68 a	0.90±0.06 c	18.34±0.78 d	2.72±0.14 a
MW	24.01±0.87 c	1.98±0.27 ad	25.77±5.14 ce	2.19±0.18 bc
ME	34.65±2.39 b	1.48±0.10 ab	34.21±1.68 b	1.61±0.07 bcd
MWE	43.79±5.34 a	1.15±0.17 abc	25.37±0.82 e	2.11±0.10 c
FW	34.96±1.68 b	1.43±0.05 ab	23.43±3.60 dce	2.68±0.22 abc
FE	31.82±4.65 bc	1.62±0.23 abd	25.62±2.06 ce	2.19±0.32 abc
FWE	33.87±4.96 bc	1.47±0.23 ab	29.86±2.24 bce	1.74±0.13 bcd

Los valores son presentados como media ± desviación estándar (n=3). Las medias con letras diferentes en cada columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

3.2.2. Capacidad antioxidante por el método antirradical ABTS

En el cuadro 6 se muestran los resultados obtenidos para capacidad antioxidante por ABTS, referente al porcentaje de inhibición que presenta 1 mg mL⁻¹ de extracto seco de los diferentes tratamientos frente al radical ABTS, así como la concentración necesaria para reducir el 50 % del mismo (IC₅₀). El porcentaje de inhibición varió de 18.34-48.33 % de inhibición, siendo el extracto

EpW el más alto. Para el caso del IC₅₀ se obtuvieron valores de 1.05-2.72 mg mL⁻¹ de extracto seco, siendo menores a los obtenidos por Reis et al. (2018), que reportaron un IC₅₀ de 93.70 mg mL⁻¹ y 45.90 mg mL⁻¹ de extracto seco para cáscara y pulpa de *P. edulis* f. *edulis* respectivamente. Al igual que en el caso de capacidad antioxidante por inhibición del radical libre DPPH se observa una capacidad antioxidante más alta a lo reportado por dos Reis et al. (2018).

4. CONCLUSIONES

Se liofilizaron satisfactoriamente los extractos agua: etanol de las diferentes partes del fruto, para su caracterización cualitativa y cuantitativa por antocianinas totales y LC-MS/MS. El extracto con mayor contenido de antocianinas por ambas técnicas fue el obtenido del mesocarpio en agua: etanol, que, en el caso del método de pH diferencial, al correr la prueba de Tukey se logró identificar que sí existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de antocianinas. Cabe mencionar que, debido al volumen de los extractos y el peso de los extractos secos, fue complejo calcular el rendimiento de extractos secos a partir del extracto líquido, por lo que es necesario trabajar con volúmenes más grandes para la estimación exacta de este parámetro. Sin embargo, se llegó a estimar que se obtuvo entre 15-20 mg de extracto seco por cada gramo de muestra de epicarpio fresco, y 30-35 mg por cada gramo de mesocarpio fresco. Se identificó la presencia de la antocianina cianidin-3-glucósido, logrando comprobar la presencia de este grupo, permitiendo continuar con la aplicación de los extractos como colorante natural. Por medio de la técnica LC-MS/MS se identificaron otros compuestos además de C3G, con capacidad antioxidante, aumentando los beneficios del consumo de este extracto en productos de consumo como lo son bebidas u otra matriz alimentaria.

5. LITERATURA CITADA

AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis of AOAC, Association of official Agricultural Chemistry* (2016th ed.).

- Axol-Rodriguez, J. J. (Colegio de P. C. C. (2015). *ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN YOGUR ADICIONADO CON Passiflora biflora Lam Y Stevia rebaudiana Bertoni*. (Tesis de maestría). Colegio de Postgraduados.
- Baliarsingh, S., Panda, A. K., Jena, J., Das, T. & Das, N. B. (2012). Exploring sustainable technique on natural dye extraction from native plants for textile: Identification of colourants, colourimetric analysis of dyed yarns and their antimicrobial evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 37, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.07.022>
- Buchweitz, M., Nagel, A., Carle, R. & Kammerer, D. R. (2012). Characterisation of sugar beet pectin fractions providing enhanced stability of anthocyanin-based natural blue food colourants. *Food Chemistry*, 132(4), 1971–1979. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.034>
- Carolina Oliveira dos Santos, L., Spagnol, C. M., Guillot, A. J., Melero, A. & Corrêa, M. A. (2019). Caffeic acid skin absorption: Delivery of microparticles to hair follicles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(6), 791–797. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.04.015>
- Cásedas, G., Les, F., González-Burgos, E., Gómez-Serranillos, M. P., Smith, C. & López, V. (2019). Cyanidin-3-O-glucoside inhibits different enzymes involved in central nervous system pathologies and type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*, 120, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.001>
- Chandra Singh, M., Price, W. E., Kelso, C., Arcot, J. & Probst, Y. (2022). Measuring the anthocyanin content of the Australian fruit and vegetables for the development of a food composition database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 112(March), 104697. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104697>
- Corradini, M. G. (2018). Synthetic food colors. In *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21606-5>
- Domínguez-Rodríguez, G., García, M. C., Plaza, M. & Marina, M. L. (2019). Revalorization of Passiflora species peels as a sustainable source of antioxidant phenolic compounds. *Science of the Total Environment*, 696, 134030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134030>
- dos Reis, L. C. R., Facco, E. M. P., Flôres, S. H. & Rios, A. de O. (2018). Stability of functional compounds and antioxidant activity of fresh and pasteurized orange passion fruit (*Passiflora caerulea*) during cold storage. *Food Research International*, 106, 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.019>
- Ekundayo, B. E., Obafemi, T. O., Afolabi, B. A., Adewale, O. B., Onasanya, A., Osukoya, O. A., Falode, J. A., Akintayo, C. & Adu, I. A. (2022). Gallic acid and hesperidin elevate neurotransmitters level and protect against oxidative stress, inflammation and apoptosis in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease in rats. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 5(August), 100193. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100193>
- Feng, X., Peng, F., Yin, Z., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, H., Fan, Y., Xu, N., Huang, H., Ni, K., Liu, X., Lei, Y., Jiang, T., Wang, J., Rui, C., Chen, C., Wang, S., Chen, X., Lu, X., ... Ye, W. (2022). Secondary metabolite pathway of SDG (secoisolariciresinol) was observed to trigger ROS scavenging system in response to Ca²⁺ stress in cotton. *Genomics*, 114(4), 110398. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110398>
- Khanal, R. C., Howard, L. R., Brownmiller, C. R. & Prior, R. L. (2009). Influence of extrusion

- processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science*, 74(2), 52–58. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01063.x>
- Liang, J., Zhang, K., Li, J., Su, J., Guan, F. & Li, J. (2022). Injectable protocatechuic acid based composite hydrogel with hemostatic and antioxidant properties for skin regeneration. *Materials and Design*, 222, 111109. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111109>
- Lodovici, M., Caldini, S., Morbidelli, L., Akpan, V., Ziche, M. & Dolara, P. (2009). Protective effect of 4-coumaric acid from UVB ray damage in the rabbit eye. *Toxicology*, 255(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.011>
- Luna-Vital, D., Li, Q., West, L., West, M. & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Anthocyanin condensed forms do not affect color or chemical stability of purple corn pericarp extracts stored under different pHs. *Food Chemistry*, 232, 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.169>
- Myint, O., Wattanapongpitak, S., Supawat, B., Kothan, S., Udomtanakunchai, C., Tima, S. & Tungjai, M. (2021). Protein binding of 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid to human serum albumin and their anti-proliferation on doxorubicin-sensitive and doxorubicin-resistant leukemia cells. *Toxicology Reports*, 8, 1381–1388. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.07.001>
- Nabi, B. G., Mukhtar, K., Ahmed, W., Manzoor, M. F., Ranjha, M. M. A. N., Kieliszek, M., Bhat, Z. F. & Aadil, R. M. (2023). Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as food colorants in food products. *Food Bioscience*, 52(November 2022), 102403. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403>
- Nour, V., Stampar, F., Veberic, R. & Jakopic, J. (2013). Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry*, 141(2), 961–966. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.105>
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A. & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250(July 2017), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.055>
- Orak, H. H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae*, 111(3), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.019>
- Raish, M., Ahmad, A., Bin Jardan, Y. A., Shahid, M., Alkharfy, K. M., Ahad, A., Ansari, M. A., Abdelrahman, I. A. & Al-Jenoobi, F. I. (2022). Sinapic acid ameliorates cardiac dysfunction and cardiomyopathy by modulating NF-κB and Nrf2/HO-1 signaling pathways in streptozocin induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 145(August 2021), 112412. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112412>
- Raj, N. D. & Singh, D. (2022). A critical appraisal on ferulic acid: Biological profile, biopharmaceutical challenges and nano formulations. *Health Sciences Review*, 5(August), 100063. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2022.100063>
- Ribeiro, D. N., Alves, F. M. S., dos Santos Ramos, V. H., Alves, P., Narain, N., Vedoy, D. R. L., Cardozo-Filho, L. & de Jesus, E. (2020). Extraction of passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) pulp oil using pressurized ethanol and ultrasound: Antioxidant activity and kinetics.

Journal of Supercritical Fluids, 165. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104944>

- Scotter, M. (2003). COLORANTS (COLOURANTS) | Properties and Determinants of Synthetic Pigments. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edi, pp. 1556–1567). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00282-0>
- Singh, S. (2023). Salicylic acid elicitation improves antioxidant activity of spinach leaves by increasing phenolic content and enzyme levels. *Food Chemistry Advances*, 2(October 2022), 100156. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100156>
- Swier, T. L., Chauhan, K., Mukhim, C., Bashir, K. & Kumar, A. (2019). Application of anthocyanins extracted from Sohiong (*Prunus nepalensis* L.) in food processing. *Lwt*, 114(July). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108360>
- Wang, W., Ning, M., Fan, Y., Liu, X., Chen, G. & Liu, Y. (2021). Comparison of physicochemical and umami characterization of aqueous and ethanolic Takifugu obscurus muscle extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 154(March), 112317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112317>
- YujiaLiu, Shi, C., Zhang, G., Zhan, H., Liu, B., Li, C., Wang, L., Wang, H. & Wang, J. (2021). Antimicrobial mechanism of 4-hydroxyphenylacetic acid on *Listeria monocytogenes* membrane and virulence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 572, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.096>

CAPÍTULO III
ESTABILIDAD DEL COLORANTE DE *P. biflora* LAM EN TRES MODELOS DE
BEBIDAS ALIMENTICIAS

Kimberly Lara Sanchez¹, Dora Angélica Avalos de la Cruz¹, Victorino Morales Ramos¹, Carlos
G. García-García ¹, Teodoro Espinosa-Solares²

¹Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km. 348.5 Venta Parada 11, 94500 Córdoba, Ver. México (sanchez.kimberly@colpos.mx; davalos@colpos.mx; vicmor@colpos.mx; carlosgarcia@colpos.mx). ²Universidad Autónoma Chapingo, Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. km 38.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México. (t.espinosa.s@taurus.chapingo.mx). Autora para correspondencia: davalos@colpos.mx

RESUMEN

Estudios han reportado la presencia de antocianinas como cianidin-3-O-glucosido, peonidin-3-glucosido y cianidin-3-rutinosido en extractos obtenidos a partir del fruto de *P. edulis* Sims. Las antocianinas son sustancias abundantes en pigmentos naturales, pero debido a su baja estabilidad durante su procesamiento no han logrado suplir el uso de colorantes artificiales, pero a un pH menor a 3 se ha estabilizado su contenido por lo que su aplicación en bebidas acidificadas representa un potencial producto de aplicación. El objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad del tratamiento acelerado y térmico del colorante de *P. biflora* Lam en tres modelos de bebidas para identificar su potencial uso en bebidas acidificadas. El tratamiento acelerado fue llevado a cabo a una temperatura de 40 °C durante 8 días, donde se obtuvieron porcentajes de degradación de antocianinas de 59.20-66.50 y 14.05-26.07 % por el método de pH y HPLC respectivamente. La bebida del modelo de laboratorio mostró el menor porcentaje, lo cual se atribuye a que fue la bebida con un pH de 3.0, el más bajo brinda mayor estabilidad a las antocianinas. Para el caso del tratamiento térmico se obtuvieron porcentajes de degradación de 67.58-75.22 y 29.28-49.21 % para el método de pH diferencial y HPLC, respectivamente. La bebida isotónica (IB) presentó los porcentajes de degradación más pequeños, siendo una alternativa de aplicación para el colorante del fruto de *P. biflora* Lam.

Palabras clave: Cianidin-3-glucosido, peonidin, cianidin-3-rutinósido, *Passiflora biflora*.

ABSTRACT

Studies have reported the presence of anthocyanins such as cyanidin-3-O-glucoside, peonidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside in extracts obtained from the fruit of *P. edulis* Sims. Anthocyanins are abundant substances in natural pigments, but due to their low stability during processing they have not been able to replace the use of artificial colorants, but at pH less than 3 their content has been stabilized, so their application in acidified beverages represents a potential product of application. The objective of this study was to evaluate the stability of the accelerated and thermal shelf-life treatment of *P. biflora* Lam colorant in three beverage models to identify its potential use in acidified beverages. The accelerated treatment was carried out at a temperature of 40 °C for 8 days, where anthocyanin degradation percentages 59.20-66.50 and 14.05-26.07 % were obtained by pH and HPLC methods, respectively. The beverage of the laboratory model showed the lowest percentage, which is attributed to the fact that it was the beverage with a pH of 3.0, the lowest pH providing greater stability to the anthocyanins. In the case of the thermal treatment, degradation percentages of 67.58-75.22 and 29.28-49.21 % were obtained for the differential pH and HPLC methods, respectively. The isotonic beverage (IB) presented the smallest degradation percentages, being an alternative application for the colorant of the fruit of *P. biflora* Lam.

Keywords: Cyanidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, *Passiflora biflora*.

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los colorantes rojos naturales más comunes se encuentran las antocianinas, que debido a sus propiedades biológicas como antiinflamación, mejorar la vista y capacidad antioxidante han atraído la atención de la industria alimenticia. Debido a su no toxicidad y solubilidad en agua, han permitido su incorporación en sistemas alimentarios acuosos, pero son sensibles a factores como el pH, la temperatura, luz y oxígeno. Buscando alternativas para su aprovechamiento. Su aplicación en bebidas representa una alternativa de aplicación en bebidas acidificadas, permitiendo mayor estabilidad (He et al., 2020; Sari et al., 2012).

Se han empleado antocianinas en bebidas modelos con pH de 3.0 ha representado ser un tratamiento factible para estudiar el efecto de los extractos en colorantes naturales, las pruebas han sido monitoreadas por medio de técnicas cuantitativas de antocianinas como lo es pH diferencial y HPLC para identificar la degradación del colorante durante periodos de tiempo (Aguilera-becerra y Urbano-cáceres, 2014; Buchweitz et al., 2012; Sari et al., 2012).

Por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar los tratamientos acelerado y térmico del colorante en tres bebidas modelo para determinar su potencial aplicación como colorante natural por medio de HPLC y antocianinas totales (Sari et al., 2012; Zhao et al., 2020).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de las bebidas modelo

Tras la caracterización de los diferentes extractos se seleccionó el extracto Mesocarpio en agua:etanol (MWE) para incorporarlo como colorante natural en tres bebidas, dos bebidas comerciales incoloras y un modelo de bebida preparada en laboratorio. La primera, una bebida isotónica (IB) contenía agua, ácido cítrico, saborizante natural sabor fresa kiwi, polifosfato de sodio, sal, sorbato de potasio, citrato de potasio, citrato de sodio, sucralosa y acesulfamo K (mezcla:

de producto 11 mg 100 g⁻¹), EDTA de calcio, pantotenato de calcio (vitamina B5), niacinamida (vitamina B3) y clorhidrato de piridoxina (vitamina B6); la segunda agua comercial Bonafon con sabor a fresa (FB) que contiene, azúcares, ácido cítrico, aroma, ácido málico y concentrado de fresa bonafont levité con stevia (3,4 mg 100 mL⁻¹); la tercera, un modelo de laboratorio (LM), que contenía 0,02 M de ácido cítrico y 0,02 M de citrato de sodio dihidrato, y se incorporó 0,02 M de benzoato de sodio. El pH de las soluciones fue de 3.5, 3.3 y 3 respectivamente.

A partir de la caracterización química de los extractos se determinó que el mayor contenido de antocianinas totales era la muestra MWE, por lo que fue el colorante estudiado. Se añadió el extracto rico en antocianinas a las diferentes bebidas hasta que alcanzaron una absorbancia de 0.70 a 520 nm (7-9 mg mL⁻¹), se utilizó un lector de placas (BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader) (Sari et al., 2012; Zhao et al., 2020).

2.2. Ensayo de tratamiento acelerado

Se tomaron 10 mL de cada modelo de bebida, se colocaron en tubos Falcón estériles de 15 mL y se eliminó el oxígeno de los tubos por desplazamiento de nitrógeno. Los tratamientos se almacenaron a 40°C, por triplicado, durante 8 días en una esterilizadora (Memmert SNB 400) y se tomaron muestras diariamente. Inmediatamente que las muestras fueron extraídas de la esterilizadora se colocaron en congelación a -80 °C para detener el proceso de degradación de las antocianinas. Las muestras fueron analizadas por antocianinas totales y cuantificación de C3G por HPLC (Zhao et al., 2020).

2.3. Ensayo de tratamiento térmico

Se tomaron 10 mL de los tratamientos (IB, FB y LM), se colocaron tubos Falcón de 15 mL y se expusieron a baños de agua (Memmert WTB) a 70, 80 y 90 °C hasta por 6 horas y se tomaron muestras cada hora. Después de la exposición a las diferentes temperaturas, las muestras se

retiraron del baño de agua e inmediatamente se colocaron en hielo para minimizar una mayor degradación. Las muestras fueron cuantificadas por antocianinas totales y HPLC.

2.4. Cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial

El proceso de cuantificación de antocianinas fue llevado a cabo de acuerdo al método de pH diferencial AOAC 2005.02 (2006) modificado para su lectura en un lector de microplacas (BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader), el principio de esta técnica consistió en el cambio de color reversible de pigmentos monoméricos de antocianinas por variación en el pH; a pH 1.0 existe la forma oxonio coloreada, y a pH 4.5 predomina la forma hemiacetal incolora. La diferencia de absorbancia a 520 nm de los pigmentos es proporcional a la concentración de pigmento, siendo expresados los resultados sobre la base de cianidina-3-glucósido.

Se realizaron dos soluciones tampon de pH 1 (cloruro de potasio, 0.025M ajustado con HCl) y a pH 4.5 (acetato de sodio 0.4M ajustado con HCl), en los cuales se llevó a cabo la dilución 40 μ L de cada muestra por 160 μ L de cada buffer, la absorbancia se determinó por triplicado a 420 y 700 nm para pH 1 y 4.5 respectivamente, estas lecturas fueron leídas frente a un blanco de agua destilada. La medición a 700 nm fue para corregir la turbidez. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de cianidina-3-glucosido (cyd-3-glu o C3G) 100 g⁻¹ utilizando la ecuación 5 (Luna-Vital et al., 2017).

2.5. Análisis cuantitativo de antocianinas por HPLC

La cuantificación de antocianinas se llevó a cabo en un equipo de HPLC (Shimadzu Prominence) con una columna Luna® μ m C18, Phenomenex 150x3.9 mm. Se tomó 1 mL de cada muestra de bebida preparada y se filtró con un filtro de jeringa MilliporeTM, con tamaño de poro de 0.45 μ m. Se fijó una longitud de onda y temperatura de funcionamiento de 520 nm y 30 °C respectivamente. La fase móvil se integró de una mezcla de solvente A (agua destilada: ácido

fórmico 99.9:0.1, v/v) y un solvente B (agua destilada: ácido fórmico: acetonitrilo 99.9:0.1:50, v/v) a un gradiente de 10 al 20% del solvente B en 10 min y de 20 al 65% B en 25 min con un caudal de 0.8 mL min⁻¹. Se inyectó una muestra de 10 µL en el equipo y el tiempo de lectura total fue de 10 min.

La cuantificación de antocianinas de las bebidas se realizó con el método estándar externo. Se mezclaron 5 mg de estándar de C3G en 1 mL de agua destilada para obtener una solución estándar de 5 mg mL⁻¹ (5000 ppm). Luego se diluyó para preparar los diferentes puntos de la curva: 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. La curva de C3G constaba de la concentración de la solución estándar de C3G como abscisa y el área del pico como coordenada vertical (Luna-Vital et al., 2018).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cuantificación de antocianinas por pH diferencial y HPLC para el tratamiento acelerado

Las concentraciones de antocianinas se midieron durante los 8 días de almacenamiento para monitorear el cambio de concentración en las diferentes bebidas. En el Cuadro 7 se observan los resultados obtenidos por el método de pH diferencial y HPLC. Estudios de vida útil durante 12 semanas a una temperatura de 25 °C ha reportado hasta un 84.2% de degradación de antocianinas presentes en extracto de pericarpio de maíz morado disuelto en agua, valor obtenido por HPLC, siendo un porcentaje mayor a los obtenidos en estos tratamientos, los cuales fueron llevados a cabo en condiciones más extremas. Cabe resaltar que la diferencia en la cuantificación por los distintos métodos pudo verse influida por la exactitud del equipo de HPLC, en donde el equipo llevó a cabo todo el proceso, así como el hecho de que por pH diferencial se están cuantificando las antocianinas totales, caso contrario a HPLC, en donde solo se cuantificó C3G (Figura 4). A partir de los resultados obtenidos podemos mencionar que para el caso de cuantificación por pH diferencial, los resultados de LM y FB son muy similares, ya que presentaron el menor porcentaje de degradación, y el mayor porcentaje se obtuvo con la bebida IB, pero al realizar el estudio por HPLC podemos

identificar que las antocianinas C3G en las bebidas estudiadas presentaba una baja degradación con valores de 14.05-26.07 %, siendo el modelo de laboratorio (LM) la de menor porcentaje de degradación (Luna-Vital et al., 2018).

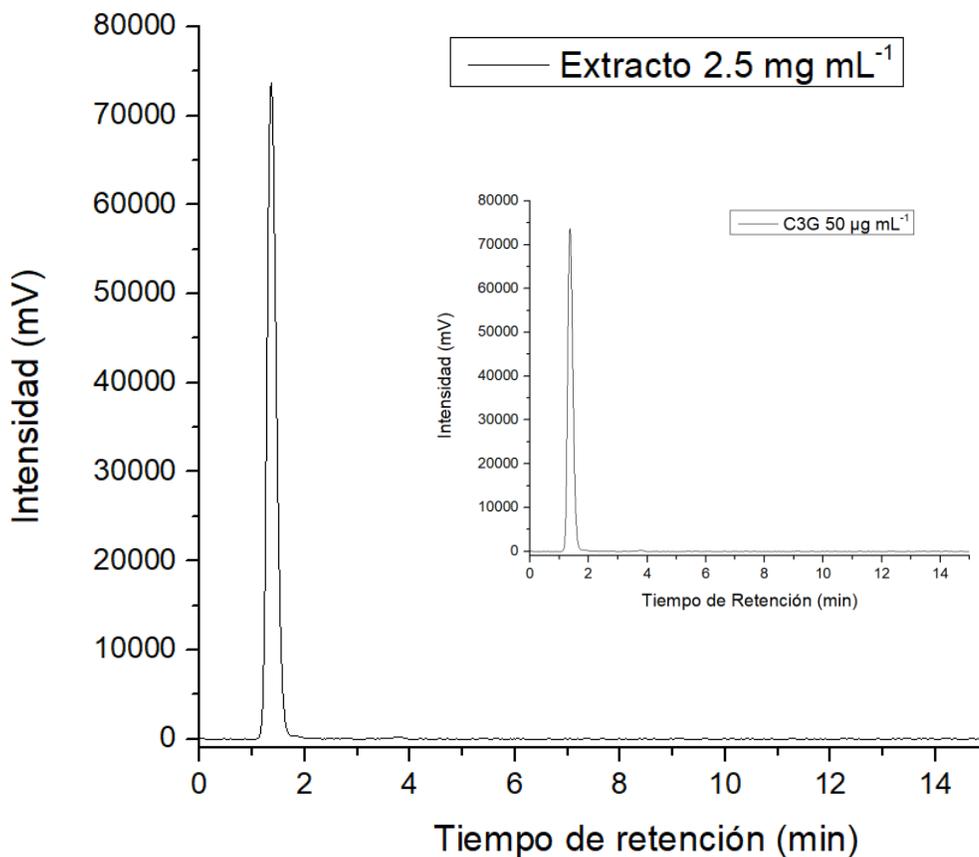


Figura 4. Cromatograma del extracto seco de *P. biflora* Lam y al lado cromatograma del estándar de C3G.

Los tiempos de retención presentados en los cromatogramas de la Figura 4, el pico de la absorbancia para el estándar de cianidin-3-O-glucósido se localizó en el min 1.34, y en el caso del extracto seco, y se observa un pequeño corrimiento de segundos, ya que se ubica en el minuto 1.35, posiblemente atribuido a la pureza del estándar.

Cuadro 7. Concentración de antocianinas en los modelos de bebidas por el método de pH diferencial y HPLC almacenados a 40 °C por 8 días.

Día	Método pH diferencial ($\mu\text{g C3G/mL}$)			HPLC ($\mu\text{g C3G/mL}$)		
	LM	IB	FB	LM	IB	FB
0	55.19 \pm 0.84 a	59.64 \pm 3.59 a	61.55 \pm 4.26 a	73.34 \pm 0.17 a	82.63 \pm 2.91 a	85.31 \pm 0.04 a
1	47.45 \pm 0.51 b	51.66 \pm 2.92 b	46.97 \pm 2.09 b	71.39 \pm 0.59 ab	81.55 \pm 1.15 a	81.90 \pm 2.00 b
2	41.03 \pm 2.89 c	36.39 \pm 3.43 c	42.94 \pm 0.56 bc	72.93 \pm 0.50 ab	80.54 \pm 0.59 ab	82.13 \pm 0.88 b
3	39.84 \pm 4.06 c	38.65 \pm 1.62 c	42.44 \pm 4.61 bc	69.87 \pm 0.95 bc	77.05 \pm 0.89 b	72.18 \pm 0.10 c
4	29.53 \pm 1.22 d	34.54 \pm 3.48 cd	36.42 \pm 2.23 cd	67.83 \pm 2.10 cd	69.25 \pm 0.62 c	69.37 \pm 1.42 d
5	30.40 \pm 0.89 de	24.76 \pm 1.02 de	35.94 \pm 1.02 cd	67.80 \pm 0.98 cd	67.20 \pm 0.63cd	68.77 \pm 1.02 de
6	26.08 \pm 0.37 def	28.84 \pm 2.18 ef	30.27 \pm 5.30 de	65.45 \pm 1.06 de	64.81 \pm 0.47 de	66.32 \pm 0.47 ef
7	24.39 \pm 1.43 ef	22.58 \pm 2.09 ef	27.88 \pm 1.71 de	64.84 \pm 1.79 de	64.44 \pm 0.95 de	64.78 \pm 0.28 fg
8	22.50 \pm 1.11 f	19.96 \pm 1.38 f	24.89 \pm 3.83 e	63.04 \pm 0.78 e	61.63 \pm 0.74 e	63.07 \pm 0.73 g
% de degradación	59.20 \pm 2.59	66.50 \pm 2.13	59.33 \pm 7.91	14.05 \pm 0.87	24.84 \pm 3.57	26.07 \pm 0.86

Los valores son presentados como media \pm desviación estándar (n=3). Las medias con letras diferentes en cada columna indican diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

3.2. Cuantificación de antocianinas por pH diferencial y HPLC para tratamiento térmico

Las concentraciones de antocianinas para el estudio de tratamiento térmico se midieron durante las 6 horas con el fin de monitorear el cambio de concentraciones en las diferentes temperaturas utilizadas para las diferentes bebidas, cabe resaltar que al igual que en el estudio de vida útil se observan diferencias para los resultados obtenidos por el método de pH diferencial y HPLC, resaltando la posible degradación de antocianinas diferentes a C3G que son las cuantificadas por HPLC (Figura 4). En el cuadro 8 se muestran los valores obtenidos por el método de pH diferencial y en el Cuadro 9 los obtenidos por HPLC.

Se han reportado porcentajes de degradación para extracto de pericarpio de maíz morado en agua 70 °C de hasta 26.26 % obtenido por HPLC, el cual se encuentra dentro del rango obtenido por el método de pH diferencial que va desde 19.06-41.3 %, siendo el modelo IB (Bebida isotónica) la muestra con menor degradación de antocianinas durante el tiempo de estudio, y el mayor porcentaje de degradación fue el obtenido para el agua saborizada (FB), pero para los resultados

por HPLC se lograron porcentajes de degradación desde 2.25-18.09, siendo valores más pequeños a los ya reportados. A la temperatura de 80 °C se ha reportado un 45.22 % de degradación, que para el caso de pH diferencial está dentro de los resultados obtenidos entre 32.05-45.93, y para HPLC se observaron valores más pequeños que van desde 2.79-32.11 %. Finalmente, para la temperatura de 90 °C, el porcentaje de degradación reportado fue 75.94 %, y los valores que se obtuvieron en este estudio fueron de 67.58-75.22 % y 29.28-49.21 % para el método de pH diferencial y HPLC, respectivamente (Luna-Vital et al., 2018).

Cuadro 8. Concentración de antocianinas en los modelos de bebidas por el método de pH diferencial, almacenados a 70, 80 y 90 °C durante 6 horas.

Hora	Método pH diferencial (µg C3G/mL)								
	LM 70 °C	FB 70 °C	IB 70 °C	LM 80 °C	FB 80 °C	IB 80 °C	LM 90 °C	FB 90 °C	IB 90 °C
0	65.58±1.08	102.48±0.83	103.08±3.39	63.40±0.95	101.20±0.77	104.49±1.85	61.49±0.69	102.10±2.24	106.92±1.59
1	51.69±1.93	81.74±2.21	65.10±0.99	46.04±3.42	74.51±1.47	67.59±3.54	40.85±0.48	61.36±3.58	74.75±2.92
2	45.40±0.13	71.70±3.49	58.63±1.22	41.03±2.76	56.17±1.31	71.48±2.14	28.62±0.84	54.50±1.14	61.57±2.19
3	45.38±2.39	74.24±3.02	77.00±1.70	37.38±1.05	60.67±1.20	65.95±1.83	23.40±2.25	41.72±1.91	51.93±1.36
4	43.63±2.52	72.47±1.97	73.24±4.72	33.10±2.44	56.51±2.32	65.57±4.98	20.22±3.16	34.75±3.57	44.40±2.67
5	46.68±1.98	69.84±3.71	80.74±0.71	34.70±0.48	56.11±3.26	68.86±2.42	16.86±1.53	31.20±0.33	38.89±2.03
6	48.40±1.18	60.04±3.12	83.44±3.21	35.73±1.96	54.71±0.69	70.93±4.69	15.24±0.49	29.50±3.48	34.64±1.99
% de degradación	26.18±2.16	41.41±3.04	19.06±0.66	43.61±3.89	45.93±1.03	32.05±5.66	75.22±0.52	71.14±2.81	67.58±2.34

Los valores son presentados como media ± desviación estándar (n=3).

Cuadro 9. Concentración de antocianinas en los modelos de bebidas por HPLC, almacenados a 70, 80 y 90 °C durante 6 horas.

Hora	HPLC ($\mu\text{g C3G/mL}$)								
	LM 70 °C	FB 70 °C	IB 70 °C	LM 80 °C	FB 80 °C	IB 80 °C	LM 90 °C	FB 90 °C	IB 90 °C
0	62.72 \pm 0.29	94.57 \pm 2.51	73.90 \pm 2.34	62.98 \pm 0.31	97.35 \pm 0.82	73.56 \pm 0.49	62.67 \pm 0.35	97.71 \pm 0.59	74.28 \pm 2.78
1	60.48 \pm 1.13	89.16 \pm 1.44	76.77 \pm 3.23	57.89 \pm 0.57	85.51 \pm 3.82	78.45 \pm 2.87	55.44 \pm 0.46	79.37 \pm 0.88	85.35 \pm 2.28
2	57.29 \pm 0.38	85.84 \pm 5.37	73.85 \pm 3.62	56.52 \pm 0.26	75.61 \pm 4.08	82.06 \pm 1.59	48.99 \pm 0.56	68.93 \pm 5.17	78.76 \pm 0.75
3	56.69 \pm 1.02	84.94 \pm 1.29	77.73 \pm 0.79	52.11 \pm 0.50	76.43 \pm 0.35	75.79 \pm 2.36	45.26 \pm 1.34	62.29 \pm 2.73	68.48 \pm 0.95
4	54.94 \pm 1.93	82.28 \pm 3.04	77.87 \pm 3.44	50.56 \pm 1.43	74.40 \pm 0.49	79.99 \pm 2.59	42.82 \pm 0.73	57.24 \pm 1.20	67.33 \pm 3.96
5	55.94 \pm 0.20	77.7 \pm 3.23	82.85 \pm 2.50	49.65 \pm 0.70	70.25 \pm 1.00	77.01 \pm 1.89	40.72 \pm 0.72	53.95 \pm 0.55	58.77 \pm 2.26
6	53.86 \pm 0.01	77.45 \pm 1.21	72.33 \pm 4.06	47.89 \pm 0.24	66.09 \pm 0.70	71.51 \pm 0.99	39.05 \pm 0.25	49.63 \pm 1.07	52.48 \pm 0.88
% de degradación	14.12 \pm 0.39	18.09 \pm 1.13	2.25 \pm 2.98	23.96 \pm 0.75	32.11 \pm 0.30	2.79 \pm 0.81	37.69 \pm 0.74	49.21 \pm 1.17	29.28 \pm 3.09

Los valores son presentados como media \pm desviación estándar (n=3).

A partir de los resultados obtenidos, podemos observar que los porcentajes de degradación más pequeños son los observados en el modelo de bebida isotónica (IB), y los más altos fueron para el modelo de bebida saborizada (FB), se requiere un mayor análisis en el estudio de mecanismos de degradación así como modelos computarizados para identificar las posibles reacciones del colorante en los modelos de bebidas, así como el uso de colorímetro para complementar los resultados y poder comparar el potencial como colorante para el colorante obtenido. La aplicación del colorante en el modelo de bebida isotónica permite la estabilización del colorante natural de *P. biflora* Lam, siendo capaz de soportar hasta a temperaturas de 90 °C, pero se recomienda su aplicación en hasta 80 °C para mejorar su eficacia como colorante natural.

4. CONCLUSIONES

El uso de los tres modelos de bebidas permitió medir los porcentajes de degradación para los dos diferentes métodos, tratamiento acelerado y térmico. Es importante resaltar que en el caso del tratamiento térmico se observa una mejor eficiencia del colorante en el modelo de bebida isotónica (IB), permitiendo la posible aplicación del colorante de *P. biflora* Lam en la coloración de bebidas isotónicas, y a su vez enriquecer estas bebidas con productos con capacidad antioxidante natural. En el caso del tratamiento acelerado no se observan grandes cambios entre los tres modelos de

bebidas, pero en el caso del modelo de laboratorio (LM) por HPLC se identifica una menor degradación de antocianinas, lo cual puede ser atribuido a que es la bebida con menor pH de los tres modelos. Se requiere mayor análisis de los estudios para evaluar el mecanismo de degradación causado por las condiciones de almacenamiento, así como el uso de colorimetría para distinguir las variaciones de los tonos de los extractos en el transcurso del tiempo y así llevar a cabo una comparativa con otros estudios que empleen antocianinas como colorante natural.

5. LITERATURA CITADA

- Aguilera-becerra, A. M. & Urbano-cáceres, E. X. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83–93. <https://doi.org/10.19053/01228420.3860>
- Buchweitz, M., Nagel, A., Carle, R. & Kammerer, D. R. (2012). Characterisation of sugar beet pectin fractions providing enhanced stability of anthocyanin-based natural blue food colourants. *Food Chemistry*, 132(4), 1971–1979. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.034>
- Luna-Vital, D., Cortez, R., Ongkowijoyo, P. & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Protection of color and chemical degradation of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) by zinc ions and alginate through chemical interaction in a beverage model. *Food Research International*, 105(October 2017), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.009>
- Luna-Vital, D., Li, Q., West, L., West, M. & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Anthocyanin condensed forms do not affect color or chemical stability of purple corn pericarp extracts stored under different pHs. *Food Chemistry*, 232, 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.169>
- Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D. & Supratman, U. (2012). Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*, 132(4), 1908–1914. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.025>
- Zhao, L., Pan, F., Mehmood, A., Zhang, Y., Hao, S., Rehman, A. U., Li, J., Wang, C. & Wang, Y. (2020). Protective effect and mechanism of action of xanthan gum on the color stability of black rice anthocyanins in model beverage systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3800–3807. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.027>

V. CONCLUSIONES GENERALES

El fruto de *Passiflora biflora* Lam es más pequeño y suave que *P. edulis* Sims, ya que su pericarpio es frágil al daño mecánico. Se identificó una capacidad antioxidante alta en comparación con otras especies ya reportadas del género *Passiflora*, ya que se alcanzó a inhibir un 99 % del radical ABTS y un 92 % de DPPH. Las caracterizaciones cualitativas y cuantitativas permitieron identificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos, así como comprobar la hipótesis, al estar presente la antocianina cianidin-3-O-glucosido, con un contenido de antocianinas similar a los obtenidos en uvas. Los extractos obtenidos con agua etanol presentaron los contenidos de antocianinas más altos para cada parte del fruto debido a que la mezcla de solventes permitió una mejor difusión de estos compuestos a estas concentraciones. El extracto MWE fue el más apto para su aplicación como colorante natural, permitiendo brindar color e incorporando los beneficios como capacidad antioxidante.

La aplicación del colorante en las bebidas modelo han mostrado porcentajes de rendimiento aptos para su uso en este tipo de bebidas. En el modelo IB se observó un menor porcentaje de degradación en tratamientos térmicos, pero para los tratamientos acelerados fue el modelo LM, al cual se atribuyó el tener menos reactivos en su composición, así como el haber tenido el menor pH, otorgando mayor estabilidad a las antocianinas. Estos estudios permitieron demostrar el potencial uso de *Passiflora biflora* Lam en el desarrollo de colorantes en bebidas principalmente acidificadas para mantener la estabilidad de las antocianinas, permitiendo un mayor tiempo de vida útil. Como trabajo futuro se sugiere la purificación del extracto seco con baños ácidos para la obtención de un colorante más concentrado, así como la identificación completa del rendimiento del colorante de este fruto.

VI. LITERATURA CITADA

- Abramsson-Zetterberg, L. & Ilbäck, N. G. (2013). The synthetic food colouring agent Allura Red AC (E129) is not genotoxic in a flow cytometry-based micronucleus assay in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 86–89. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.047>
- Aguilera-becerra, A. M. & Urbano-cáceres, E. X. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83–93. <https://doi.org/10.19053/01228420.3860>
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis of AOAC, Association of Official Agricultural Chemists* (15th ed.).
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis International, Association of Official Agricultural Chemists* (17th ed., Vol. 289, Issue 1982).
- AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis of AOAC, Association of official Agricultural Chemistry* (2016th ed.).
- Arrazola Paternina, G., Villadiego Luna, F. & Alvis Bermudez, A. (2022). Nutraceutical, thermophysical and textural characteristics of papaya (*Carica papaya* L) and incidence for post-harvest management. *Heliyon*, 8(4), e09231. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09231>
- Aular & Rodríguez. (2003). Bioagro. *Bioagro*, 15(1), 41–46. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612003000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Axol-Rodriguez, J. J. (Colegio de P. C. C. (2015). *ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN YOGUR ADICIONADO CON Passiflora biflora Lam Y Stevia rebaudiana Bertoni*. Colegio de Postgraduados.
- Baliarsingh, S., Panda, A. K., Jena, J., Das, T. & Das, N. B. (2012). Exploring sustainable technique on natural dye extraction from native plants for textile: Identification of colourants, colourimetric analysis of dyed yarns and their antimicrobial evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 37, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.07.022>
- Barbosa Santos, T., de Araujo, F. P., Neto, A. F., de Freitas, S. T., de Souza Araújo, J., de Oliveira Vilar, S. B., Brito Araújo, A. J. & Lima, M. S. (2021). Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of the Pulp of Two Brazilian Passion Fruit Species: *Passiflora Cincinnata* Mast. And *Passiflora Edulis* Sims. *International Journal of Fruit Science*, 21(1), 255–269. <https://doi.org/10.1080/15538362.2021.1872050>
- Bendini, A., Cerretani, L., Pizzolante, L., Toschi, T. G., Guzzo, F., Ceoldo, S., Marconi, A. M., Andreatta, F. & Levi, M. (2006). Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* spp. extracts. *European Food Research and Technology*, 223(1), 102–109. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0150-7>
- Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F. & Falcão, L. D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594–599. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.022>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate

- antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Buchweitz, M., Nagel, A., Carle, R. & Kammerer, D. R. (2012). Characterisation of sugar beet pectin fractions providing enhanced stability of anthocyanin-based natural blue food colourants. *Food Chemistry*, 132(4), 1971–1979. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.034>
- Carolina Oliveira dos Santos, L., Spagnol, C. M., Guillot, A. J., Melero, A. & Corrêa, M. A. (2019). Caffeic acid skin absorption: Delivery of microparticles to hair follicles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(6), 791–797. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.04.015>
- Carvajal de Pabón, L. M., Turbay, S., Rojano, B., Álvarez, L. M., Restrepo, S. L., Álvarez, J. M., Bonilla, K. C., Clara Ochoa, O. & Sánchez, N. (2011). Algunas especies de Passiflora y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 354–363.
- Cásedas, G., Les, F., González-Burgos, E., Gómez-Serranillos, M. P., Smith, C. & López, V. (2019). Cyanidin-3-O-glucoside inhibits different enzymes involved in central nervous system pathologies and type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*, 120, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.07.001>
- Chandra Singh, M., Price, W. E., Kelso, C., Arcot, J. & Probst, Y. (2022). Measuring the anthocyanin content of the Australian fruit and vegetables for the development of a food composition database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 112(March), 104697. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104697>
- Chatham, L. A., Howard, J. E. & Juvik, J. A. (2020). A natural colorant system from corn: Flavone-anthocyanin copigmentation for altered hues and improved shelf life. *Food Chemistry*, 310(June 2019), 125734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125734>
- Chen, C.-C., Lin, C., Chen, M.-H. & Chiang, P.-Y. (2019). Stability and Quality of Anthocyanin in Purple Sweet Potato Extracts. *Foods*, 393(8), 1–13. <https://doi.org/10.3390/foods8090393>
- Chung, A., Tam, K., Wang, Y., Chen, P. & Yang, S. (2018). Passiflora biflora Lam . (Passifloraceae): a Newly Naturalized Plant in Taiwan. *Revista Académica Del Museo Nacional de Taiwán*, 71(January 2019), 76–84. <https://doi.org/10.6532/JNTM.201806>
- Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. & McClements, D. J. (2016). Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols. *Food Chemistry*, 212, 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.025>
- Corradini, M. G. (2018). Synthetic food colors. In *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21606-5>
- Damant, A. P. (2011). Food colourants. *Handbook of Textile and Industrial Dyeing*, 2, 252–305. <https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-696-2.50008-9>
- Deng, J., Cheng, W. & Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4), 1430–1435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.031>
- Dhawan, K., Dhawan, S. & Sharma, A. (2004). Passiflora: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.023>
- Dhawan, K., Kumar, S. & Sharma, A. (2001). Anti-anxiety studies on extracts of Passiflora incarnata

Linnaeus. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(2–3), 165–170. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00339-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00339-7)

- Domínguez-Rodríguez, G., García, M. C., Plaza, M. & Marina, M. L. (2019). Revalorization of *Passiflora* species peels as a sustainable source of antioxidant phenolic compounds. *Science of the Total Environment*, 696, 134030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134030>
- dos Reis, L. C. R., Facco, E. M. P., Flôres, S. H. & Rios, A. de O. (2018). Stability of functional compounds and antioxidant activity of fresh and pasteurized orange passion fruit (*Passiflora caerulea*) during cold storage. *Food Research International*, 106, 481–486. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.019>
- Ekundayo, B. E., Obafemi, T. O., Afolabi, B. A., Adewale, O. B., Onasanya, A., Osukoya, O. A., Falode, J. A., Akintayo, C. & Adu, I. A. (2022). Gallic acid and hesperidin elevate neurotransmitters level and protect against oxidative stress, inflammation and apoptosis in aluminum chloride-induced Alzheimer's disease in rats. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 5(August), 100193. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100193>
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J. & García-Viguera, C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1588–1592. <https://doi.org/10.1021/jf9911390>
- Feng, X., Peng, F., Yin, Z., Wang, J., Zhang, Y., Zhang, H., Fan, Y., Xu, N., Huang, H., Ni, K., Liu, X., Lei, Y., Jiang, T., Wang, J., Rui, C., Chen, C., Wang, S., Chen, X., Lu, X., ... Ye, W. (2022). Secondary metabolite pathway of SDG (secoisolariciresinol) was observed to trigger ROS scavenging system in response to Ca²⁺ stress in cotton. *Genomics*, 114(4), 110398. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110398>
- Fonseca, A.M.A., Geraldi, M. V., Maróstica Junior, Mário R., Silvestre, A. J. D. & M., R. (2022). Purple passion fruit (*Passiflora edulis* f. *edulis*): A comprehensive review on the nutritional value, phytochemical profile and associated health effects. *Food Research International*, 160(March). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111665>
- Haddar, W., Ben Ticha, M., Meksi, N. & Guesmi, A. (2018). Application of anthocyanins as natural dye extracted from *Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*: dyeing studies of wool and silk fibres. *Natural Product Research*, 32(2), 141–148. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1342080>
- Harlen, W. C. & Jati, I. R. A. P. (2018). Antioxidant activity of anthocyanins in common legume grains. In *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* (2nd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00008-8>
- He, X., Luan, F., Yang, Y., Wang, Z., Zhao, Z., Fang, J., Wang, M., Zuo, M. & Li, Y. (2020). *Passiflora edulis*: An Insight Into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 11(May), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00617>
- Jiménez, A. M., Sierra, C. A., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Heredia, F. J. & Osorio, C. (2011). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, 44(7), 1912–1918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.007>
- Kawasoe, H., Wakamatsu, M., Hamada, S., Arata, Y., Nagayoshi, K., Uchida, R., Yamashita, R., Kishita, T., Yamanouchi, H., Minami, Y. & Kajiya, K. (2021). Analysis of natural colourant

- extracted from the pericarp of passion fruit. *Lwt- Food Science and Technology*, 136(P2), 110412. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110412>
- Khanal, R. C., Howard, L. R., Brownmiller, C. R. & Prior, R. L. (2009). Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science*, 74(2), 52–58. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01063.x>
- Lea, A. & Henry, B. (2003). Colorants (colourants). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Segunda Edición)*, 1550–1556. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227055X002819>
- Liang, J., Zhang, K., Li, J., Su, J., Guan, F. & Li, J. (2022). Injectable protocatechuic acid based composite hydrogel with hemostatic and antioxidant properties for skin regeneration. *Materials and Design*, 222, 111109. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111109>
- Lodovici, M., Caldini, S., Morbidelli, L., Akpan, V., Ziche, M. & Dolara, P. (2009). Protective effect of 4-coumaric acid from UVB ray damage in the rabbit eye. *Toxicology*, 255(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.011>
- Loypimai, P., Moongngarm, A., Chottanom, P. & Moontree, T. (2015). Ohmic heating-assisted extraction of anthocyanins from black rice bran to prepare a natural food colourant. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.009>
- Luna-Vital, D., Cortez, R., Ongkowijoyo, P. & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Protection of color and chemical degradation of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) by zinc ions and alginate through chemical interaction in a beverage model. *Food Research International*, 105(October 2017), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.009>
- Luna-Vital, D., Li, Q., West, L., West, M. & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Anthocyanin condensed forms do not affect color or chemical stability of purple corn pericarp extracts stored under different pHs. *Food Chemistry*, 232, 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.169>
- Munawar, N. & Jamil, H. M. T. bt H. (2014). The Islamic Perspective Approach on Plant Pigments as Natural Food Colourants. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 121, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2014.01.1120>
- Myint, O., Wattanapongpitak, S., Supawat, B., Kothan, S., Udomtanakunchai, C., Tima, S. & Tungjai, M. (2021). Protein binding of 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid to human serum albumin and their anti-proliferation on doxorubicin-sensitive and doxorubicin-resistant leukemia cells. *Toxicology Reports*, 8, 1381–1388. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.07.001>
- Nabi, B. G., Mukhtar, K., Ahmed, W., Manzoor, M. F., Ranjha, M. M. A. N., Kieliszek, M., Bhat, Z. F. & Aadil, R. M. (2023). Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as food colorants in food products. *Food Bioscience*, 52(November 2022), 102403. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403>
- Nour, V., Stampar, F., Veberic, R. & Jakopic, J. (2013). Anthocyanins profile, total phenolics and antioxidant activity of black currant ethanolic extracts as influenced by genotype and ethanol concentration. *Food Chemistry*, 141(2), 961–966. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.105>

- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A. & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, 250(July 2017), 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.055>
- Orak, H. H. (2007). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. *Scientia Horticulturae*, 111(3), 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.019>
- Pacheco, G., Simão, M. J., Vianna, M. G., Garcia, R. O., Vieira, M. L. C. & Mansur, E. (2016). In vitro conservation of Passiflora—A review. *Scientia Horticulturae*, 211, 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.004>
- Portillo, L., Julián, A. & Santana, M. (2019). Fibras naturales y pigmentos: teñido , tejido y diseño. *Unse*, November, 1–29. https://www.researchgate.net/publication/332528985_Fibras_naturales_y_pigmentos_tenido_tejido_y_diseno
- Raish, M., Ahmad, A., Bin Jordan, Y. A., Shahid, M., Alkharfy, K. M., Ahad, A., Ansari, M. A., Abdelrahman, I. A. & Al-Jenoobi, F. I. (2022). Sinapic acid ameliorates cardiac dysfunction and cardiomyopathy by modulating NF-κB and Nrf2/HO-1 signaling pathways in streptozocin induced diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 145(August 2021), 112412. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112412>
- Raj, N. D. & Singh, D. (2022). A critical appraisal on ferulic acid: Biological profile, biopharmaceutical challenges and nano formulations. *Health Sciences Review*, 5(August), 100063. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2022.100063>
- Ramli, A. N. M., Manap, N. W. A., Bhuyar, P. & Azelee, N. I. W. (2020). Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel powder extract and its application towards antibacterial and antioxidant activity on the preserved meat products. *SN Applied Sciences*, 2(10), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03550-z>
- Ratnavathi, C. V. & Komala, V. V. (2016). Sorghum Grain Quality. In *Sorghum Biochemistry: An Industrial Perspective*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803157-5.00001-0>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribeiro, D. N., Alves, F. M. S., dos Santos Ramos, V. H., Alves, P., Narain, N., Vedoy, D. R. L., Cardozo-Filho, L. & de Jesus, E. (2020). Extraction of passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) pulp oil using pressurized ethanol and ultrasound: Antioxidant activity and kinetics. *Journal of Supercritical Fluids*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104944>
- Sampaio, S. L., Lonchamp, J., Dias, M. I., Liddle, C., Petropoulos, S. A., Glamočlija, J., Alexopoulos, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. & Barros, L. (2021). Anthocyanin-rich extracts from purple and red potatoes as natural colourants: Bioactive properties, application in a soft drink formulation and sensory analysis. *Food Chemistry*, 342(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128526>
- Saravanan, S. & Parimelazhagan, T. (2014). In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. In *Food Science and Human*

Wellness (Vol. 3, Issue 2, pp. 56–64). <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.05.001>

- Sari, P., Wijaya, C. H., Sajuthi, D. & Supratman, U. (2012). Colour properties, stability, and free radical scavenging activity of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit anthocyanins in a beverage model system: Natural and copigmented anthocyanins. *Food Chemistry*, 132(4), 1908–1914. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.025>
- Scotter, M. (2003). COLORANTS (COLOURANTS) | Properties and Determinants of Synthetic Pigments. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Ed., pp. 1556–1567). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00282-0>
- Silva, J. K., Cazarin, C. B. B., Colomeu, T. C., Batista, Â. G., Meletti, L. M. M., Paschoal, J. A. R., Bogusz Júnior, S., Furlan, M. F., Reyes, F. G. R., Augusto, F., Maróstica Júnior, M. R. & de Lima Zollner, R. (2013). Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. *Food Research International*, 53(2), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.043>
- Singh, S. (2023). Salicylic acid elicitation improves antioxidant activity of spinach leaves by increasing phenolic content and enzyme levels. *Food Chemistry Advances*, 2(October 2022), 100156. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100156>
- Spence, C., Corujo, A. & Youssef, J. (2019). Cotton candy : A gastrophysical investigation. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 16(February). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2019.100146>
- Swier, T. L., Chauhan, K., Mukhim, C., Bashir, K. & Kumar, A. (2019). Application of anthocyanins extracted from Sohiong (*Prunus nepalensis* L.) in food processing. *Lwt*, 114(July). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108360>
- Vigueras, A. & Portillo, L. (2016). *Conocimiento y aprovechamiento de cactáceas y otras plantas suculentas* (A. Vigueras & L. Portillo (eds.); 1st ed.). https://www.researchgate.net/publication/326655899_Tenido_de_fibras_naturales_con_gran_a_cochinilla_del_nopal_y_otros_pigmentos
- Wang, W., Ning, M., Fan, Y., Liu, X., Chen, G. & Liu, Y. (2021). Comparison of physicochemical and umami characterization of aqueous and ethanolic Takifugu obscurus muscle extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 154(March), 112317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112317>
- Weber, F., Boch, K. & Schieber, A. (2017). Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.042>
- Yang, W., Kaimainen, M., Järvenpää, E., Sandell, M., Huopalahti, R., Yang, B. & Laaksonen, O. (2021). Red beet (*Beta vulgaris*) betalains and grape (*Vitis vinifera*) anthocyanins as colorants in white currant juice – Effect of storage on degradation kinetics, color stability and sensory properties. *Food Chemistry*, 348(January). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128995>
- YujiaLiu, Shi, C., Zhang, G., Zhan, H., Liu, B., Li, C., Wang, L., Wang, H. & Wang, J. (2021). Antimicrobial mechanism of 4-hydroxyphenylacetic acid on *Listeria monocytogenes* membrane and virulence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 572, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.096>

- Zhao, L., Pan, F., Mehmood, A., Zhang, Y., Hao, S., Rehman, A. U., Li, J., Wang, C. & Wang, Y. (2020). Protective effect and mechanism of action of xanthan gum on the color stability of black rice anthocyanins in model beverage systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 3800–3807. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.027>
- Zhu, W., Jia, Q., Wang, Y., Zhang, Y. & Xia, M. (2012). The anthocyanin cyanidin-3-O- β -glucoside, a flavonoid, increases hepatic glutathione synthesis and protects hepatocytes against reactive oxygen species during hyperglycemia: Involvement of a cAMP-PKA-dependent signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(2), 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.483>