



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN YOGUR  
ADICIONADO CON *Passiflora biflora* Lam Y *Stevia  
rebaudiana* Bertoni**

**JOSÉ DE JESÚS AXOL RODRÍGUEZ**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ

2015

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN YOGUR ADICIONADO CON *Passiflora***

***biflora* Lam Y *Stevia rebaudiana* Bertoni**

La presente tesis titulada: “**Actividad antioxidante de un yogur adicionado con *Passiflora biflora* Lam y *Stevia rebaudiana* Bertoni**” realizada por el alumno: **José de Jesús Axol Rodríguez** bajo dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

**Dra. Dora Angélica Avalos de la Cruz**

ASESOR

**Dr. José Andrés Herrera Corredor**

ASESOR

**Dr. Adolfo Bucio Galindo**

Amatlán de los Reyes, Veracruz. Diciembre de 2015

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE UN YOGUR ADICIONADO CON *Passiflora*

### *biflora* Lam Y *Stevia rebaudiana* Bertoni

José de Jesús Axol Rodríguez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

#### RESUMEN

En este estudio se evaluó la actividad antioxidante de extractos etanólicos, metanólicos, acuosos, acetónicos y combinación con agua (metanol-agua 50:50, acetona-agua 70:30 y etanol-agua 70:30) en pulpa fresca del fruto *Passiflora biflora* Lam y hojas deshidratadas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Para la evaluación de la actividad antioxidante en yogur se utilizaron extractos metanólicos acidificados (pH 2) con HCl. Se emplearon ensayos de inhibición del radical libre (DPPH), de decoloración del radical catiónico (ABTS) y colorimétrico Folin-Ciocalteu. Los resultados obtenidos muestran que el extracto acuoso de *P. biflora* presentó mayor actividad antioxidante  $10,568 \pm 13.1$  (DPPH) y  $14,721 \pm 215.4$  (ABTS)  $\mu\text{M}$  trolox/g, y fenoles totales  $2,770 \pm 2.8$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g. El extracto etanol-agua (70:30) de *S. rebaudiana* mostró mayor actividad antioxidante  $111.2 \pm 0.1$  (DPPH) y  $315.7 \pm 6.1$  (ABTS)  $\text{mM}$  trolox/g, y el extracto metanol-agua (50:50) mayor contenido de fenoles  $74.45 \pm 0.1$   $\text{mg}$  ácido gálico/g. El yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana* presentó valores de pH que oscilan entre 4.2 y 3.5; acidez entre 0.56 y 0.93%; valores de color entre  $L^*$  74.91;  $a^*$  10.58;  $b^*$  0.39 y  $L^*$  87.3;  $a^*$  -1.74 y  $b^*$  3.61. Se observó un descenso de compuestos fenólicos y cambios en actividad antioxidante DPPH y ABTS. La actividad antioxidante presente en el yogur osciló entre  $73.8 \pm 1.3$  y  $585.1 \pm 3.0$   $\mu\text{M}$  trolox/g (DPPH),  $134.8 \pm 3.8$  y  $954.1 \pm 23.0$   $\mu\text{M}$  trolox/g (ABTS). El contenido de compuestos fenólicos totales fluctuó entre  $27.07 \pm 0.83$  y  $83.0 \pm 0.83$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g. El producto final cumplió con las normas de calidad higiénica, no hubo presencia de *Salmonella* ssp., coliformes totales, hongos y levaduras. El conteo de bacterias lácticas estuvo entre 9.04 y 7.17  $\log_{10}$  ufc/g. Los resultados obtenidos muestran el alto potencial antioxidante del fruto de *P. biflora* y las hojas de *S. rebaudiana*, y su aportación a este producto lácteo fermentado.

**Palabras clave:** DPPH, ABTS, fenoles, probiótico.

## ANTIOXIDANT CAPACITY IN YOGURT ENRICHED WITH *Passiflora biflora* Lam

Y *Stevia rebaudiana* Bertoni

José de Jesús Axol Rodríguez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2015

### ABSTRACT

This study evaluated the antioxidant activity of ethanol, methanol, aqueous, acetone extracts and water combination (methanol-water 50:50, acetone-water 70:30 and ethanol-water 70:30) in fruit pulp of *Passiflora biflora* Lam and *Stevia rebaudiana* Bertoni dried leaves. Antioxidant activity in yogurt was evaluated in acidified methanol extracts (pH 2 with HCl). The assays used for determining the antioxidant activity were free radical inhibition (DPPH), cation decolorization (ABTS) and Folin-Ciocalteu. Aqueous extract of *P. biflora* showed the highest antioxidant activity 10,568±13.1 (DPPH), 14,721±215.4 (ABTS) µM trolox/g respectively and total phenolic content 2,770±2.8 µg gallic acid/g. Ethanol-water (70:30) extract of *S. rebaudiana* leaves showed the highest antioxidant activity 111.2±0.1 (DPPH), 315.7±6.1 (ABTS) mM trolox/g respectively and methanol-water (50:50) extract the highest total phenolic content 74.45±0.1 mg gallic acid/g. The yogurt enriched with *P. biflora* and *S. rebaudiana* showed pH values between 4.2 and 3.5; acidity 0.555-0.927%; color values between  $L^*$  74.91;  $b^*$  10.58;  $b^*$  0.39 y  $L^*$  87.3;  $b^*$  -1.74 y  $b^*$  3.61. The total phenolic content and antioxidant activity (DPPH and ABTS) decreased during storage. The yogurt enriched showed antioxidant activity between (DPPH) 73.8±1.3 y 585.1±3.0 µM trolox/g, (ABTS) 134.8±3.8 y 954.1±23.0 µM trolox/g and total phenolic content between 27.07±0.83 y 83.0±0.83 µg gallic acid/g. The result shows absence of *Salmonella* ssp., total coliforms and fungi and yeasts. Lactic bacteria counting results between 9.04 y 7.17 Log<sub>10</sub> ufc/g. The results show the highest antioxidant potential of fruit *P. biflora* and *S. rebaudiana* leaves in this fermented milk product.

**Keywords:** DPPH, ABTS, phenols, probiotic.

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios***

*A Dios quien supo darme fuerza para seguir adelante, y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Gracias Dios por darme una segunda oportunidad de vida.*

### ***A mis padres Josefina y Martín***

*“Todo es perecedero en el mundo; el poder y la persona misma desaparecerán, pero la virtud de un gran padre vivirá para siempre” (Rana Pratap Singh). Gracias por estar conmigo en todo momento, por su apoyo y amor. Por ser los mejores padres del mundo. Hoy lo hemos logrado, los amo.*

### ***A mi familia***

*“La familia es como la música, algunas notas altas, otras bajas, pero siempre es buena canción”. Gracias por todo ese apoyo, especialmente a mi tía Lorena, mis hermanitos Andrés y Héctor con quienes siempre he compartido excelentes momentos.*

### ***A mis amigos y compañeros***

*“Los malos tiempos traen verdaderos amigos”. Luz, Maritza, Joaquín, Daniela, por estar siempre en los buenos y malos momentos, por su amistad y apoyo, y especialmente a Mariel, gracias por todo tu apoyo, consejos y alegrarme mis días. Grandes amistades que no se olvidarán Carol, Adriana, Patricia, Adilene y Mayte.*

## 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. 470599

A la Dra. Dora Angélica Avalos de la Cruz por su amistad, consejos y apoyo brindado durante mi formación profesional y en los momentos más difíciles que se presentaron en esta etapa de mi vida.

A mis asesores del Consejo Particular, Dr. José Andrés Herrera Corredor y Dr. Adolfo Bucio Galindo, por la confianza, el esfuerzo, el tiempo y dedicación brindada.

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, las Líneas Prioritarias de Investigación 12 *Agregación de Valor* y 4 Agronegocios, agroecoturismo y arquitectura del paisaje del Colegio de Postgraduados, la Subdirección de Vinculación, por las facilidades, uso de sus instalaciones y apoyo brindado para el cumplimiento de este proyecto de investigación.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	V
ABSTRACT .....	VI
DEDICATORIA .....	VII
AGRADECIMIENTOS.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
4.1. La leche y productos lácteos.....	4
4.1.1. Características físicas, químicas y nutricionales de la leche.....	4
4.1.2. Los productos lácteos .....	4
4.1.3. El yogur y su elaboración .....	5
4.1.4. Probióticos y sus efectos benéficos .....	6
4.2. Generalidades de <i>Passiflora</i> .....	7
4.2.1. Distribución y diversidad.....	7
4.2.2. Descripción botánica .....	8
4.2.3. Descripción botánica de <i>Passiflora biflora</i> Lam .....	8
4.2.4. Importancia económica y producción .....	10
4.2.5. Características fisicoquímicas y usos farmacológicos de <i>Passiflora</i> .....	10
4.2.6. Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos en <i>Passiflora</i> .....	11
4.3. Generalidades de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	12
4.3.1. Origen y distribución .....	12
4.3.2. Descripción botánica .....	13
4.3.3. Valor nutricional y medicinal de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	14
4.3.4. Características de los glucósidos de <i>S. rebaudiana</i> .....	18
4.3.5. Importancia económica y producción de estevia.....	18
4.3.6. Capacidad antioxidante de las hojas de <i>S. rebaudiana</i> .....	19
CAPITULO I .....	21
Fisicoquímica y actividad antioxidante del fruto de <i>passiflora biflora</i> lam.....	21
RESUMEN .....	22
ABSTRACT .....	23
1. INTRODUCCIÓN .....	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
2.1. Material vegetal y ubicación del experimento.....	25
2.2. Caracterización física y química del fruto de <i>P. biflora</i> .....	25
2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante en frutos de <i>P. biflora</i> Lam.....	27
2.3.1. Preparación de extractos .....	27
2.3.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de inhibición del radical libre (DPPH).....	27
2.3.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS .....	28
2.3.4. Determinación de compuestos fenólicos .....	28
2.3.5. Análisis de resultados .....	28
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
3.1. Caracterización física y química del fruto de <i>Passiflora biflora</i> Lam.....	29
3.2. Capacidad antioxidante del fruto de <i>P. biflora</i> .....	34

3.2.1. Capacidad antioxidante por inhibición del radical libre DPPH en frutos de <i>P. biflora</i>	34
3.2.2. Capacidad antioxidante por el método del radical ABTS en frutos de <i>P. biflora</i>	35
3.2.3. Compuestos fenólicos en frutos de <i>P. biflora</i>	37
4. CONCLUSIONES	37
5. LITERATURA CITADA	38
CAPITULO II	42
Actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales en hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	42
RESUMEN	42
ABSTRACT	43
1. INTRODUCCIÓN	44
2. MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.1. Material Vegetal y ubicación del experimento	46
2.2. Preparación de extractos de hojas de <i>S. rebaudiana</i>	46
2.3. Ensayo de inhibición del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH)	46
2.4. Ensayo de decoloración del radical catiónico 2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)	47
2.5. Determinación de compuestos fenólicos totales	47
2.6. Análisis estadístico	48
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1. Inhibición del radical libre DPPH en <i>S. rebaudiana</i>	48
3.2. Decoloración del radical catiónico ABTS en <i>S. rebaudiana</i>	51
3.3. Compuestos fenólicos en <i>S. rebaudiana</i>	52
4. CONCLUSIONES	52
5. LITERATURA CITADA	53
CAPITULO III	55
potencial antioxidante de un yogur probiótico enriquecido con <i>passiflora biflora</i> lam y <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	55
RESUMEN	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUCCIÓN	57
2. MATERIALES Y MÉTODOS	58
2.1. Material vegetal y ubicación del experimento	58
2.2. Preparación de extractos acuosos de <i>S. rebaudiana</i> B. y base para yogur	59
2.3. Preparación y formulación del yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i>	59
2.4. Determinación de pH, acidez titulable y color del yogur	60
2.5. Preparación de extractos metanólicos del yogur	60
2.6. Determinación de compuestos fenólicos	61
2.7. Determinación de actividad antioxidante por el ensayo DPPH	61
2.8. Determinación de actividad antioxidante por el ensayo ABTS	61
2.9. Análisis microbiológicos del yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i>	62
2.11. Análisis estadístico	63
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
3.1. pH, acidez titulable y color del yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i>	63

3.2. Compuestos fenólicos totales en yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> .....	66
3.3. Actividad antioxidante por el ensayo DPPH en yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> .....	68
3.4. Actividad antioxidante por el ensayo ABTS en yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> .....	69
3.5. Recuento de coliformes totales, hongos y levaduras, <i>Salmonella</i> spp. y bacterias lácticas en yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> .....	70
4. CONCLUSIONES.....	71
5. LITERATURA CITADA.....	72
V. CONCLUSIONES GENERALES.....	75
VI. LITERATURA CITADA.....	76

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales microorganismos probióticos y efectos benéficos a la salud. ....	7
Cuadro 2. Flavonoides y fenoles totales en especies de <i>Passiflora</i> .....	12
Cuadro 3. Actividad antioxidante en algunas especies de <i>Passiflora</i> .....	12
Cuadro 4. Composición de las hojas secas de <i>S. rebaudiana</i> B. (g 100 g <sup>-1</sup> BS).....	15
Cuadro 5. Contenido mineral (mg 100 g <sup>-1</sup> BS) en hojas de <i>S. rebaudiana</i> B. ....	16
Cuadro 6. Contenido de aminoácidos (g 100 g <sup>-1</sup> BS) en hojas de <i>S. rebaudiana</i> .....	17
Cuadro 7. Contenido de vitaminas solubles (mg 100 g <sup>-1</sup> BS) en hojas de <i>S. rebaudiana</i> .....	17
Cuadro 8. Longitud, peso y proporción por componentes de <i>P. biflora</i> y otras especies de passiflora.....	29
Cuadro 9. Comparación del color de <i>P. biflora</i> y <i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i> en dos estados de madurez. ....	31
Cuadro 10. Humedad, pH, acidez titulable y sólidos solubles totales de <i>P. biflora</i> y otras especies.....	32
Cuadro 11. Proteína, lípidos, azúcares, fibra y cenizas de <i>P. biflora</i> y <i>P. edulis</i> f. <i>edulis</i> .....	33
Cuadro 12. Actividad antioxidante y fenoles totales en pulpa de <i>P. biflora</i> Lam. ....	36
Cuadro 13. Actividad antioxidante y fenoles totales en hojas de <i>S. rebaudiana</i> B. ....	50
Cuadro 14. pH, acidez titulable (AT) y color en formulaciones de yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> .....	65
Cuadro 15. Actividad antioxidante en yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> . ....	67
Cuadro 16. Calidad microbiológica del yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> después de 14 días de almacenamiento a 4°C (UFC/g). ....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Passiflora biflora</i> Lam. 1) Flor, 2) Botones florales en pares, y 3-4) Frutos maduros y verdes.....	9
Figura 2. Tallos y hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	14
Figura 3. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH en extractos de <i>S. rebaudiana</i> .....	49
Figura 4. Comparación de la actividad antioxidante DPPH y ABTS en extractos de <i>S. rebaudiana</i> B. ....	51
Figura 5. Comportamiento del pH y la acidez titulable del yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> durante almacenamiento a 4°C.....	64
Figura 6. Porcentaje de inhibición del radical DPPH en yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> .....	68
Figura 7. Recuento de bacterias lácticas en yogur adicionado con <i>P. biflora</i> y <i>S. rebaudiana</i> después de 14 días de almacenamiento a 4°C.....	71

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La industria de los alimentos actualmente desarrolla nuevos productos, que además de nutrir ayudan al mejoramiento de la salud, llamados productos funcionales (Hinestroza *et al.*, 2011).

Los productos lácteos y particularmente el yogur, son la fuente de probióticos más reconocida y su consumo se ha incrementado particularmente por su sabor, alto contenido nutricional y por las propiedades benéficas y funcionales de las bacterias lácticas que éste contiene (Tamine, 2005).

Aunado a esto, el uso de edulcorantes artificiales como aditivos alimenticios en la industria de alimentos ha incrementado, tras su aparición e interés por los efectos beneficiosos atribuidos a los mismos, frente a diferentes situaciones y patologías (obesidad, diabetes, caries, etc.); sin embargo, diversos estudios parecen constatar la ineficacia de su uso reflejado negativamente en la salud humana (García *et al.*, 2013).

Es por ello que a nivel mundial aumenta el uso de edulcorantes naturales, como es el caso de la estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), edulcorante natural que posee componentes activos como el esteviósido, rebaudiósidos A, B, C, D, E y dulcósidos A y B (Kujur *et al.*, 2010), que son usados como sustitutos de la sacarosa, para el tratamiento de diabetes mellitus, la obesidad, la hipertensión y prevención de caries. Estudios toxicológicos han demostrado que el esteviósido no tiene efectos mutagénicos, teratogénicos o cancerígenos (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011).

Este trabajo de investigación propone alternativas de valor agregado a la leche utilizando edulcorantes naturales y frutos tropicales no tradicionales con potencial productivo como *Pasiflora biflora* L., cuyos efectos positivos a la salud se basan en sus compuestos: vitaminas, minerales, antioxidantes polifenólicos y fibra dietética (López-Vargas *et al.*, 2013).

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Actualmente existe la necesidad de dar alternativas de diversificación de productos alimenticios saludables, nutritivos, naturales e inocuos, con procesos de producción que integren buenas prácticas de manufactura e higiene, que fomenten el cuidado al medio ambiente y sean sustentables. De acuerdo a datos del INEGI (2012), la prevalencia global de la diabetes mellitus está aumentando rápidamente como resultado del envejecimiento de la población, la urbanización y los cambios asociados al estilo de vida. Respecto al comportamiento de esta enfermedad en México, de 1998 al 2012 se ha observado una tendencia hacia el incremento en 4.7%, pasando de una tasa de morbilidad de 342.1 a 358.2 casos por cada 100 mil habitantes. Lo cual nos lleva al desarrollo de nuevos productos funcionales, que permitan disminuir las situaciones y patologías que se presentan en la sociedad.

### **III.OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un yogur con probióticos (*Bifidobacterium bifidum*), y evaluar su calidad fisicoquímica y su actividad antioxidante al añadir *Stevia rebaudiana* Bertoni y *Passiflora biflora* Lam.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar la calidad física, química y el potencial antioxidante del fruto de *P. biflora* Lam.
- Evaluar la actividad antioxidante de las hojas deshidratadas de *S. rebaudiana* Bertoni.
- Caracterizar el proceso de elaboración, la calidad física, química y microbiológica del producto final.
- Determinar la vida de anaquel y potencial antioxidante del yogur durante un periodo de almacenamiento (14 días) a 4 °C.

#### **HIPÓTESIS**

Un yogur con probióticos, edulcorado con *Stevia rebaudiana* Bertoni y saborizado con *Passiflora biflora* L., tendrá una actividad antioxidante superior a la bebida sin estos componentes y un mayor valor nutritivo.

## **IV. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1. La leche y productos lácteos**

La leche ha sido un alimento de gran importancia para el hombre desde la domesticación de los animales y el comienzo de la agricultura para el pastoreo. Es el alimento de origen animal más versátil y forma parte de la dieta en muchas formas físicas diferentes. Además de la propia leche, se desarrolló una tecnología rural que permitió la fabricación de queso, leches fermentadas, nata y mantequilla. Posteriormente, los sucesivos avances tecnológicos se aplicaron a la fabricación de helado, leches concentradas y en polvo y, más recientemente para la de productos lácteos UHT, nuevos postres y nuevos productos funcionales (Varnam y Sutherland, 1995).

#### **4.1.1. Características físicas, químicas y nutricionales de la leche**

Es un líquido opaco blanco mate, amarillento según el contenido de  $\beta$  carotenos. Presenta un pH a 20 °C de 6.5–6.7, una acidez valorable de 15-18 °D, densidad de 1.028-1.036 g/mL y una temperatura de congelación de -0.51 °C. Abundante en inmunoglobinas y con una composición promedio de 79% agua, 10% proteínas, 7% grasa, 3% lactosa y 1% cenizas. Contiene la mayoría de las vitaminas liposolubles A, D, E y K que se encuentran interaccionando con los glóbulos de grasa, por su parte, en el suero se localizan las hidrosolubles, tales como riboflavina, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, biotina, niacina, tiamina, folatos y ácido pantoténico (Badui, 2006; Luquet, 1991).

#### **4.1.2. Los productos lácteos**

A partir de la leche fresca se elaboran distintos derivados; algunos de ellos, como los quesos, se conocen desde hace muchos siglos y su preparación se practica desde entonces como un método de conservación, mientras que otros se han desarrollado en las últimas décadas gracias a los avances tecnológicos.

En el mercado se encuentra una gama enorme de productos lácteos: leche entera, descremada, deslactosada y descremada/deslactosada, en versiones pasteurizada y ultrapasteurizada; leche en polvo entera o descremada; condensada; evaporada; mantequilla; queso; suero de la leche; crema; leche fermentada, como yogur, búlgara, kéfir; dulce/natilla como la cajeta; caseínas (ácida, láctica, renina); caseinatos para uso comestible e industrial; lactosa; sólidos de mantequilla; ingredientes lácteos enzimáticamente modificados; y más.

La leche está sujeta a contaminaciones microbiológicas que la hacen un producto altamente perecedero, por el tipo de nutrientes y ser un alimento muy completo, con un pH casi neutro y alta actividad del agua. Los distintos derivados que de ella se obtienen representan una forma más estable, con una vida de anaquel mucho mayor que la materia prima de origen (Badui, 2006).

#### **4.1.3. El yogur y su elaboración**

La leche usada para yogur se tiene que estandarizar a un nivel menor de grasa y mayores contenidos de lactosa, proteínas, minerales y vitaminas; para eso se pueden añadir sólidos lácteos no grasos (leche deshidratada descremada, suero de leche, entre otros), de tal forma que la gravedad específica aumenta de 1.03 g/ml a 1.4 g/ml y paralelamente los sólidos no grasos suben a 12%. Se añaden gomas, estabilizantes, saborizantes y edulcorantes.

La pasteurización destruye la mayoría de la microflora innata de la leche, lo que permite un campo libre para los cultivos lácticos que se añaden posteriormente; la interacción de la caseína k y la b-lactoglobulina provocada por el tratamiento térmico controlado (85°C/25 minutos) y favorecida por el pH y la presencia de calcio, crea una nueva estructura que tiene una mejor capacidad de absorción de agua que dará como resultado un gel más firme y terso, de mayor viscosidad que no presenta sinéresis.

La homogeneización, después de la pasteurización, estabiliza la grasa en pequeñas partículas que previenen el cremado durante la fermentación, y mejora la textura por la interacción entre

las caseínas y los glóbulos de grasa. En estas condiciones, la leche se inocula con diversos microorganismos, como por ejemplo, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que actúan de una manera sinérgica a 40-45°C.

El ácido láctico, producido a partir de la lactosa, baja el pH hasta 5 en donde se inicia la formación del coágulo. El sabor y aroma se deben al ácido láctico, además del acetaldehído, la acetona, el diacetilo y a otros compuestos con grupos carbonilo. Son muchas las variables que afectan las propiedades de estos derivados, tales como el calentamiento, el contenido proteínico, la homogenización, la acidez alcanzada en la fermentación, el tipo de cultivo y la presencia de estabilizantes (Badui, 2006).

#### **4.1.4. Probióticos y sus efectos benéficos**

Los probióticos fueron definidos en el 2001 por la FAO y WHO, como microorganismos vivos que brindan un beneficio saludable al consumidor, los microorganismos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más usados como probióticos (Singh *et al.*, 2011). Estas bacterias son sacarolíticas (capacidad para metabolizar azúcares), gram-positivas, de forma alargada, habitan en el intestino grueso. El intestino humano, específicamente el intestino grueso y colon, tienen una composición bacteriana compleja que consta de más de 50 géneros de bacterias, las cuales pueden ser perjudiciales (productoras de toxinas), benéficas (sintetizadoras de vitaminas) o ambos (microbios de la familia *Streptococcus*) (Cook *et al.*, 2012).

En el Cuadro 1 se muestran los efectos saludables que se le atribuyen a los probióticos como; regulación de la microbiota intestinal, estreñimiento leve, prevención y tratamiento de diarreas, intolerancia a la lactosa, efectos moduladores sobre el sistema inmunitario y cáncer (Amores *et al.*, 2004).

**Cuadro 1.** Principales microorganismos probióticos y efectos benéficos a la salud.

<b>Microorganismo</b>	<b>Efecto benéfico</b>
<i>L. acidophilus</i> LC1	-Equilibrio en la flora intestinal y efecto en el sistema nervioso.
<i>L. acidophilus</i> NCFCO1748	-Reducción de la actividad de enzimas pro-cancerígenas, diarrea y constipación.
<i>L. acidophilus</i> NCFM	-Reducción de la actividad de enzimas pro-cancerígenas.
<i>L. jonsonni</i> LA1	-Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras.
<i>L. rhamnosus</i> GG	-Inmunoestimulador, diarrea, inflamación del intestino.
<i>L. bulgaricus</i>	-Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>L. casei</i>	-Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos.
<i>B. bifidum</i>	-Diarrea por rotavirus, equilibrio de la microbiota.
<i>S. thermophilus</i>	-Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>S. boulardii</i>	-Prevención de diarrea y tratamiento de colitis.

Fuente: Amores *et al.* (2004).

## **4.2. Generalidades de *Passiflora***

### **4.2.1. Distribución y diversidad**

El género *Passiflora* no es un elemento dominante de la flora neo-tropical, su extraña morfología floral y sus brillantes colores llamaron la atención de los primeros exploradores españoles en el Nuevo Mundo. Se distribuye en América, China, Australia, Nueva Zelanda y la Polinesia (Figura 1); sin embargo, el 90% de las pasifloras se localizan en América. Colombia es el país que representa la mayor riqueza, con 135 especies, en segundo lugar se encuentra Brasil, seguido de México, donde se encuentran 83 especies aproximadamente (Mendizábal, 2005; Dhawan *et al.*, 2004).

#### **4.2.2. Descripción botánica**

El género *Passiflora* está conformado por más de 500 especies, la mayoría de ellas son nativas de las regiones tropicales de América, más de 200 de Brasil (Dhawan *et al.*, 2004). Las plantas son bejucos que crecen a través de un sistema de tutorado y con zarcillos auxiliares. El tallo tiene características leñosas y herbáceas en las zonas distales, son escaladas, muy raramente arborescentes, hojas alternas, a veces simples, enteras, lobuladas o palmadas. Las flores son bisexuales o unisexuales, de colores brillantes, forman una corona visible de gran diversidad. Perianto con cáliz de 4-5 sépalos libres o soldados; corola 4-5 pétalos libres, raramente nulos, a menudo con corona que nace sobre el hipanto dentro de la corola, formada por una o más filas de filamentos. Androceo con 5 estambres, libres o soldados, nectario. Gineceo, ovario súpero, carpelos de 3-5 soldados, unilocular, nectario discoidal alrededor del ovario, óvulos parietales, estilos libre o unidos. El fruto puede ser una baya o cápsula. Las semillas con arilo, endospermo carnoso y embrión recto (Carvajal *et al.*, 2011; Dhawan *et al.*, 2004). La polinización se efectúa por los insectos. *Passiflora* es un género exótico y muchas especies se cultivan por su hermosa flor ornamental.

#### **4.2.3. Descripción botánica de *Passiflora biflora* Lam**

Es una planta herbácea trepadora, tallos delgados, fuertemente angulosos y estriados longitudinalmente, glabrescentes; con 2 perfiles lanceolado-atenuados de ramas vegetativas en las axilas de las hojas anchas y oblongas. Las flores por lo general dispuestas por pares sobre pedúnculos de 1 a 1.5 cm de largo, brácteas cetáceas de unos 2 mm de largo; flores verde-blanquecinas o verde-amarillentas de 2.5 a 3.5 cm de diámetro; sépalos ovado-lanceolados de 9 a 12 mm de largo, verdes por fuera blancos por dentro; pétalos blancos a veces teñidos de morado en la base; corola formada por 2 series de filamentos, los exteriores gruesos, algo encintados, 3-4-angulosos y dilatados hacia el ápice, de 6 a 8 mm de largo, amarillos, los

interiores filiformes, de 2 a 3(5) mm de largo; androginóforo de 5 a 8 mm de largo, la porción libre de los filamentos de unos 4 mm de largo, anteras de alrededor de 4 mm de largo; ovario subgloboso a ovoide, cilíndrico o anguloso, a veces recorrido por engrosamientos longitudinales, glabrescente a densamente tomentoso, estilos de 3 a 5 mm de largo, estigmas de 1 mm de diámetro; fruto globoso o subgloboso, de 1 a 2 cm de diámetro, glabro a pubérulo, de color morado a negro en la madurez; semillas obovoides, de 2.5 a 3.2 mm de largo y 2 a 2.5 mm de ancho, con 6 a 7(9) elevaciones transversales ligeramente tuberculadas (Calderón y McDougal, 2004).



**Figura 1.** *Passiflora biflora* Lam. 1) Flor, 2) Botones florales en pares, y 3-4) Frutos maduros y verdes.

#### **4.2.4. Importancia económica y producción**

La importancia económica de *Passiflora* radica básicamente en tres ámbitos; como plantas de ornato, consumo de sus frutos y como fuente de sustancias medicinales. De este fruto se aprovecha el jugo, que puede ser consumido directamente en fresco o procesado, en la elaboración de refrescos, néctares, yogur, mermeladas, licores y helados (De la Cruz *et al.*, 2010). Las especies más importantes, por lo que se refiere a la producción de frutos comestibles son: *Passiflora edulis* Sims (*maracuyá morado*), *Passiflora edulis* Sims var. *flavicarpa* Degener (*maracuyá amarillo*), *Passiflora ligularis* Juss (*granada china*), *Passiflora mollissima* Bailey (sinónimo de *Tacsonia mollissima* HBK), *Passiflora quadrangularis* L. (*granadilla gigante*) y *Passiflora laurifolia* L. (*limón de agua*) (Schwentenius *et al.*, 1995; Carvajal *et al.*, 2011).

En México este cultivo se produce en baja escala, la superficie es pequeña, los lotes de producción son reducidos y las prácticas agrícolas y uso de materiales mejorados son empíricas. Veracruz cuenta con las condiciones agro-ecológicas que satisfacen los requerimientos del cultivo. De acuerdo al SIAP-SAGARPA (2014) Veracruz se encuentra en el primer lugar de producción de *Passiflora edulis* (454 t), los principales municipios productores son; Coatepec, Cosautlán de Carvajal, Teocelo y Martínez de la Torre. Seguido de los Estados de Nayarit (31.5 t), Jalisco (29.4 t) y Guerrero (28.7 t).

#### **4.2.5. Características fisicoquímicas y usos farmacológicos de Passiflora**

La composición de la fruta de *Passiflora* es de 50-60 % de cáscara, de 30-40 % de jugo y de 10-15 % de semilla. Los aspectos funcionales y nutricionales en la pulpa del maracuyá comercial y algunas especies silvestres está relacionado con la presencia de carbohidratos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, minerales y vitaminas A y C (Costa y Cavalcante, 2010).

Las propiedades farmacológicas de diferentes extractos obtenidos de hojas de especies de *P. incarnata*, *P. caerulea*, *P. edulis*, *P. alata* y *P. actinea* han demostrado la existencia de efecto sedativo, antiansiedad y como anticonvulsivo (Bendini *et al.*, 2006). Dhawan *et al.* (2004) indicaron el efecto farmacológico presente en las hojas, flores, raíces y fruto de las principales especies conocidas de maracuyá. Las especies estudiadas son abundantes en alcaloides indólicos (passiflorina, harmina, harmanol, armelina), flavonoides (vitexina, isovitexina, neohesperidina, saponarina, crisina, BZF), estigmasterol, sitosterol, lignanos (ácido caféico y ferrúlico) y cianoglicosídeos, usados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso.

#### **4.2.6. Capacidad antioxidante y compuestos fenólicos en *Passiflora***

La capacidad antioxidante de las frutas y vegetales proviene de compuestos como vitamina C, E,  $\beta$ -caroteno y polifenoles de plantas (flavonoles, flavanoles, antiocianinas y fenilpropanoles) (Acevedo *et al.*, 2004). Su consumo está asociado en la protección contra enfermedades degenerativas como cáncer, cardiovasculares y cerebrovasculares (Pineda *et al.*, 1999).

Los compuestos fenólicos son un grupo de antioxidantes naturales, sustancias que evidencian su rol protector sobre la salud humana, estudios han demostrado que los radicales libres presentes en el organismo humano causan daño oxidativo a diferentes moléculas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Muñoz *et al.*, 2007; García *et al.*, 2004).

En los Cuadros 2 y 3 se observa al contenido de flavonoides, fenoles totales y actividad antioxidante de algunas especies de *Passiflora*. Muñoz *et al.* (2007) compararon la capacidad antioxidante de *P. mollissima* Bailey (sinónimo de *Tacsonia mollissima* HBK) y *P. quadrangularis* L. (granadilla gigante), durante el ensayo DPPH *P. mollissima* presentó mayor actividad antioxidante 285.33 mg ácido ascórbico/100g y 41.18  $\mu$ mol trolox/g respecto a *P. quadrangularis* con 0.35 mg ácido ascórbico/100g y 0.05  $\mu$ mol trolox/g.

**Cuadro 2.** Flavonoides y fenoles totales en especies de *Passiflora*.

<b>Especie</b>	<b>mg rutina/g</b>	<b>mg vitexina/g</b>	<b>Fenoles totales <math>\mu\text{g}</math> ácido gálico/g</b>
<i>P. ligularis</i>	6.86 $\pm$ 0.10	11.2 $\pm$ 0.5	30.80 $\pm$ 2.49
<i>P. edulis</i>	4.86 $\pm$ 0.12	13.1 $\pm$ 0.3	17.28 $\pm$ 1.70
<i>P. incarnata</i>	10.51 $\pm$ 0.15	23.6 $\pm$ 0.5	14.00 $\pm$ 1.85

Fuente: Marroquín *et al.* (2010).

**Cuadro 3.** Actividad antioxidante en algunas especies de *Passiflora*.

<b>Especie</b>	<b>DPPH <math>\text{CI}_{50}</math> (mg/mL)</b>	<b>ABTS <math>\text{CI}_{50}</math> (mg/mL)</b>	<b>TEAC (mmol/g)</b>
<i>P. ligularis</i>	5.48 $\pm$ 0.13	8.34 $\pm$ 0.20	12.39
<i>P. edulis</i>	4.96 $\pm$ 0.03	6.03 $\pm$ 0.05	4.97
<i>P. incarnata</i>	4.77 $\pm$ 0.07	6.35 $\pm$ 0.07	3.82

Fuente: Marroquín *et al.* (2010).

### **4.3. Generalidades de *Stevia rebaudiana* Bertoni**

#### **4.3.1. Origen y distribución**

*Stevia rebaudiana* es una planta originaria de la región de Amambay en el Noreste de Paraguay y sus colindancias con Brasil y Argentina. Estudios revelan que *Stevia* se ha utilizado desde la antigüedad para diversos fines, las tribus Guaraní del Paraguay y Brasil la utilizaban como edulcorante y tés medicinales para tratar el ardor de estómago y otras dolencias (Brandle y Telmer, 2007).

En 1943 se exportaron las primeras semillas de *Stevia* al Reino Unido, pero éstas no pudieron ser cultivadas; en 1968 fueron exportadas a Japón, donde fue cultivada y se dio a conocer y se convirtió en el primer país de Asia en comercializar el esteviósido como edulcorante en los alimentos y en la industria de los medicamentos (Yadav *et al.*, 2011; Lemus-Mondaca *et al.*, 2011). Actualmente su cultivo se ha extendido a otras regiones del mundo, incluyendo Canadá, Asia y Europa (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011).

#### **4.3.2. Descripción botánica**

La estevia es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las Asteráceas y generalmente se propaga comercialmente de manera sexual (Jarma *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2011). *Stevia* es un género de cerca de 230 especies, de las cuales solo las especies *rebaudiana* y *phlebophylla* son las únicas que producen glucósidos de esteviol bajos en calorías, llamados comúnmente esteviósidos, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino es de 300 veces mayor que el azúcar de caña (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011).

*S. rebaudiana* (Figura 2) es una hierba semiperenne, con una altura de crecimiento de un metro, tiene un sistema radicular extensivo, tallos quebradizos y hojas elípticas. Las hojas son sésiles, de 3 a 4 cm de largo, elongado-lanceoladas o de forma espatulada con la punta roma. El haz de la hoja es ligeramente pubescente granular. El tallo es leñoso y ligeramente pubescente en la parte inferior. Los rizomas son raíces ligeramente ramificadas. Las flores son pentámeras, pequeñas y blancas con una “garganta” púrpura pálido. Los pequeños floretes blancos se presentan en pequeños corimbos de 2 a 6 flores, organizados en panículas desatadas. El fruto es un aquenio delgado y plumoso (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Tallos y hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Fuente: Lemus-Mondaca *et al.* (2011).

#### **4.3.3. Valor nutricional y medicinal de *Stevia rebaudiana***

Lemus-Mondaca *et al.* (2011) reportaron que las propiedades nutricionales y medicinales presentes en la hoja de estevia se atribuye a su principal composición, la cual es una buena fuente de carbohidratos, proteína, fibra cruda y minerales tales como calcio, fósforo, sodio, potasio, magnesio y zinc (Cuadro 4 y 5), lo que se relaciona con bienestar y reducción de ciertas enfermedades.

**Cuadro 4.** Composición de las hojas secas de *S. rebaudiana* B. (g 100 g<sup>-1</sup> BS)

Componente	Referencia						
	Mishra <i>et al.</i> (2010)	Goyal <i>et al.</i> (2010)	Serio (2010)	Savita <i>et al.</i> (2004)	Abou-Arab <i>et al.</i> (2010)	Tadhani y Subhash (2006)	Kaushik <i>et al.</i> (2010)
Humedad	7	4.65	ND	7	5.37	ND	7.7
Proteína	10	11.2	11.2	9.8	11.40	20.4	12
Grasa	3	1.9	5.6	2.5	3.73	4.34	2.7
Ceniza	11	6.3	ND	10.5	7.41	13.1	8.4
Carbohidrato	52	ND	53	52	61.9	35.2	ND
Fibra cruda	18	15.2	15	18.5	15.5	ND	ND

BS=Base seca; ND= No determinado. Fuente: Lemus-Mondaca *et al.* (2011).

**Cuadro 5.** Contenido mineral (mg 100 g<sup>-1</sup>BS) en hojas de *S. rebaudiana* B.

<b>Mineral</b>	<b>Referencia</b>					
	Mishra <i>et al.</i> (2010)	Goyal <i>et al.</i> (2010)	Serio (2010)	Tadhani y Subhash (2006)	Kaushik <i>et al.</i> (2010)	Abou-Arab <i>et al.</i> (2010)
Calcio	464.4	544	600	1550	722	17.7
Fósforo	11.4	318	318	350	ND	ND
Sodio	190	89.2	ND	160	32.7	14.93
Potasio	1800	1780	1800	2510	839	21.15
Magnesio	349	349	500	ND	ND	3.26
Zinc	1.5	1.5	ND	6.39	ND	1.26

BS=Base seca; ND= No determinado. Fuente: Lemus-Mondaca *et al.* (2011).

En el aceite de las hojas de *S. rebaudiana* se han identificado seis ácidos grasos; palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. De los cuales los dos últimos son considerados como ácidos grasos esenciales (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011). También se identificaron en las hojas de aminoácidos y vitaminas (Cuadro 6 y 7), que hacen de la planta un recurso valioso para productos que promueven la salud.

**Cuadro 6.** Contenido de aminoácidos (g 100 g<sup>-1</sup> BS) en hojas de *S. rebaudiana*.

<b>Aminoácido esencial</b>		<b>Aminoácido no esencial</b>	
Arginina	0.45	Aspartamo	0.37
Lisina	0.70	Serina	0.46
Histidina	1.13	Glutamina	0.43
Fenilalanina	0.77	Prolina	0.17
Leucina	0.98	Glicina	0.25
Metionina	1.45	Alanina	0.56
Valina	0.64	Cistina	0.40
Treonina	1.13	Tirosina	1.08
Isoleucina	0.42		
Total	7.67	Total	3.72

Fuente: Lemus-Mondaca *et al.*, 2011, reportado por Abou-Arab *et al.*, 2010.

**Cuadro 7.** Contenido de vitaminas solubles (mg 100 g<sup>-1</sup> BS) en hojas de *S. rebaudiana*.

<b>Vitamina</b>	
Vitamina C	14.98±0.07
Vitamina B2	0.43±0.02
Vitamina B6	0.00±0.00
Ácido fólico	52.18±0.21
Niacina	0.00±0.00
Tiamina	0.00±0.00

Fuente: Lemus-Mondaca *et al.*, 2011, reportado por Kim *et al.*, 2011.

La estevia y el esteviósido se han aplicado como sustitutos de la sacarosa para el tratamiento de diabetes mellitus, la obesidad, la hipertensión y prevención de caries, dichos estudios han demostrado que los componentes de esta planta tienen beneficios terapéuticos. Estudios toxicológicos han indicado que el esteviósido no tiene efectos mutagénicos, teratogénicos o cancerígenos, ya que no se han observado reacciones cuando se utiliza como edulcorante (Chatsudthipong y Mauanprasat, 2009; Lemus-Mondaca *et al.*, 2011; Pól *et al.*, 2007).

#### **4.3.4. Características de los glucósidos de *S. rebaudiana***

El glucósido de estevia es un edulcorante natural y saludable, bajo en calorías y con alto poder endulzante (Wang *et al.*, 1997). De los 9 glucósidos de diterpeno conocidos, el esteviósido y el rebaudiósido A predominan y muestran capacidad edulcorante 300 veces más que la sacarosa.

La explotación comercial de esta planta se ha venido haciendo desde los años 70, cuando investigadores japoneses desarrollaron una serie de procesos para la extracción y el refinado de los edulcorantes de la hoja (Dacome *et al.*, 2005). El esteviósido es descrito como un glucósido compuesto por tres moléculas de glucosa adjuntas a una aglicona, la mitad esteviol. El esteviol es la aglicona común y columna vertebral de los glucósidos dulces de estevia, los cuales comprenden esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E, F y dulcósido (Geuns, 2003).

#### **4.3.5. Importancia económica y producción de estevia**

El rápido desarrollo de la industria de los edulcorantes y la búsqueda de alternativas menos riesgosas que los edulcorantes artificiales ha permitido que el cultivo de *S. rebaudiana* prospere en países como Brasil, China, Japón, Corea, Tailandia e Israel. China actualmente cultiva el 90% de la producción global de esta planta.

El consumo internacional se concentra en la Unión Europea, E. U. de Norteamérica, China, Australia y especialmente Japón, a pesar de tener fábricas para la extracción de esteviósidos, es insuficiente para satisfacer su mercado interno (se estima que el consumo anual de esteviósidos en Japón es de 50 toneladas al año con un valor aproximado de 240 millones de dólares).

Brasil cuenta con la mayor planta de tratamiento de hoja seca para extracción del esteviósido. Actualmente se producen 3000 toneladas de cristal de esteviósido en el mundo, el cual se consume en su totalidad. Rusia y varios países Latinoamericanos han incorporado este nuevo edulcorante a su dieta (Vázquez, 2012).

#### **4.3.6. Capacidad antioxidante de las hojas de *S. rebaudiana***

Los compuestos antioxidantes presentes en plantas comestibles han sido promovidos como aditivos alimenticios, ya que no presentan efecto tóxico. Existen diferentes antioxidantes presentes en plantas y es difícil medir cada componente antioxidante por separado. Por lo tanto, varios métodos han sido desarrollados para evaluar la actividad antioxidante de los frutos o de otras plantas y tejidos animales. Entre ellos, la capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC), el potencial total de absorción de radicales (TRAP), capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC) y (FRAP) son comúnmente utilizados y son los métodos representativos frecuentemente utilizados en las investigaciones científicas (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011).

Algunos autores han reportado valores de la capacidad antioxidante en *S. rebaudiana*, en términos de porcentaje de inhibición radicales DPPH e IC<sub>50</sub> (concentración requerida para una inhibición del 50% de DPPH), donde una actividad de eliminación de radicales DPPH mayor está asociada con un valor IC<sub>50</sub> inferior. Phansawan y Pongbangpho (2007) estudiaron capacidad antioxidante de cinco plantas medicinales diferentes; *Pueraria mirifica*, *S.*

*rebaudiana* Bertoni, *Curcuma longa* Linn., *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. y *Cassia alata* Linn., donde la mayor capacidad antioxidante se encontró en *S. rebaudiana* B.

## CAPITULO I

### FISICOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL FRUTO DE *Passiflora biflora* Lam

José de Jesús Axol-Rodríguez<sup>1</sup>, Dora Angélica Avalos-de la Cruz<sup>1</sup>, Carlos Gilberto García-García<sup>1</sup>, José Andrés Herrera-Corredor<sup>1</sup> y Adolfo Bucio-Galindo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km. 348, Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz. C.P. 94946. México

([axol.jose@colpos.mx](mailto:axol.jose@colpos.mx); [davalos@colpos.mx](mailto:davalos@colpos.mx); [carlosgarcia@colpos.mx](mailto:carlosgarcia@colpos.mx);

[jandreshc@colpos.mx](mailto:jandreshc@colpos.mx)). <sup>2</sup>Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. Carretera libre

Cárdenas-Coatzacoalcos km. 21, Poblado C-27, Cárdenas, Tabasco. C.P. 86500. México

([adbucio@colpos.mx](mailto:adbucio@colpos.mx)). Autora para correspondencia: [davalos@colpos.mx](mailto:davalos@colpos.mx).

## RESUMEN

*Passiflora biflora* Lam es un fruto tropical nativo de América del sur, la planta es herbácea, trepadora, de tallos delgados. El objetivo de éste estudio fue evaluar las características físicas y químicas, y actividad antioxidante del fruto. Los solventes utilizados para los extractos fueron etanol, metanol, agua, acetona, etanol-agua (70:30), metanol-agua (50:50) y acetona-agua (70:30). 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) a los resultados de capacidad antioxidante de los extractos y comparaciones múltiples de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). El fruto midió  $26.7 \pm 4.2$  mm de longitud,  $22.4 \pm 3.3$  mm de diámetro; el peso fue de  $7.7 \pm 1.7$  g. Los parámetros del color fueron luminosidad  $L^* = 36.28 \pm 6.64$ , pureza de color  $C^*_{ab} = 6.96 \pm 2.7$ , y el tono  $h_{ab} = 110.65 \pm 6.8$ . El contenido de humedad fue de  $84.5 \pm 0.04$  %, pH  $4.84 \pm 0.04$ , acidez  $1.04 \pm 0.06$  %, sólidos solubles totales  $10.0$  °Brix y azúcares totales  $11.80 \pm 1.02$  mg/g y reductores  $7.16 \pm 0.4$  mg/g. Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante respecto a los solventes utilizados en la extracción. El contenido total de compuestos fenólicos para el extracto acuoso fue  $2,687 \pm 3.70$  µg ácido gálico/g y capacidad antioxidante DPPH  $10,568 \pm 13.17$  µM trolox/g y ABTS  $14,721 \pm 215.44$  µM trolox/g, en el cual se obtuvieron los mejores resultados en relación a los demás solventes; en los extractos acetónicos y metanólicos fue de  $1,814 \pm 2.14$  y  $2,014 \pm 2.57$  µg ácido gálico/g, DPPH  $7,144 \pm 8.98$  y  $6,851 \pm 14.94$  µM trolox/g y ABTS  $10,050 \pm 168.97$  y  $9,256 \pm 116.98$  µM trolox/g, respectivamente. Se observó que la combinación solvente-agua 50:50 y 70:30 mejoró la extracción para cuantificar capacidad antioxidante. Este fruto silvestre representa un potencial como antioxidante natural en la industria alimentaria, y permite agregar valor a productos agroalimentarios no tradicionales.

**Palabras clave:** colorante natural, agroproductos no tradicionales, fenoles, DPPH, ABTS.

## ABSTRACT

*Pasiflora biflora* is a tropical fruit native of South America, is shrubs or herbs, mostly climber with thin stems. The objective in this study was determinate the physicochemical characteristics and antioxidant activity of *P. biflora* Lam fruit were evaluated. The solvents used for extracting the antioxidant compounds were ethanol, methanol, water, acetone, ethanol-water (70:30), methanol-water (50:50) and acetone-water (70:30). The assays used for determining the antioxidant activity were free radical inhibition (DPPH), cation decolorization (ABTS) and Folin-Ciocalteu. An analysis of variance (ANOVA) to the results of antioxidant activity of the extracts and Tukey multiple comparisons ( $p \leq 0.05$ ) was performed. The fruit was small:  $26.70 \pm 4.2$  mm in length,  $22.4 \pm 3.3$  mm in diameter,  $7.66 \pm 1.7$  g in weight. Color values of skin were  $L^* = 36.2 \pm 6.6$ , Chroma  $C^*_{ab} = 6.96 \pm 2.7$ , and Hue =  $110.65 \pm 6.8$ . The moisture content, pH, titratable acidity, total soluble solids, total sugars and reducing sugars contents were  $84.5 \pm 0.04$  %,  $4.84 \pm 0.04$ ,  $1.04 \pm 0.06$  %, 10.0 °Brix,  $11.80 \pm 1.02$  mg/g and  $7.16 \pm 0.4$  mg/g respectively. Significant difference ( $p \leq 0.05$ ) were observed in phenolic contents and antioxidant activity among the solvents used. The total phenolic content was  $2.687 \pm 3.70$  mg gallic acid/g, antioxidant capacity (DPPH)  $10,568 \pm 13.17$   $\mu$ M trolox/g and  $215.44 \pm 14,721$   $\mu$ M trolox/g (ABTS) for the aqueous extract, which showed the highest efficiency and antioxidant activity in relation to the other extracts. Methanol and acetone extracts presented phenolic content between  $2.14 \pm 1.814$  and  $2.014 \pm 2.57$  g gallic acid /g, antioxidant activity (DPPH)  $7,144 \pm 6,851 \pm 8.98$  and  $14.94$   $\mu$ M trolox/g, (ABTS)  $10,050 \pm 9,256$  and  $116.98 \pm 168.97$   $\mu$ M trolox/g respectively. The combination solvent-water 50:50 and 70:30 resulted in extracts with the highest antioxidant capacity. This wild fruit is a natural antioxidant source for the food industry, and can help in the development of value-added food products formulated with non-traditional agricultural products.

**Keywords:** natural food coloring, non-traditional products, phenols, DPPH, ABTS.

## 1. INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas y verduras ha tomado importancia por los beneficios que tienen estos alimentos en la salud humana, particularmente atribuido a los compuestos bioactivos y antioxidantes. La actividad antioxidante es una estimación global de la capacidad antioxidante de un alimento y un parámetro para valorar la calidad nutricional de un producto, considera compuestos como las vitaminas C, E,  $\beta$ -caroteno y polifenoles de plantas (flavonoles, flavanoles, antocianinas y fenilpropanoles) (Acevedo *et al.*, 2004). Los fenoles, especialmente los flavonoides y las antocianinas, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, y se ha demostrado un efecto benéfico en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas (Tril *et al.*, 2014). El género *Passiflora* comprende alrededor de 500 especies, distribuidas principalmente en las regiones templadas y tropicales de América, y menor proporción en Asia, Australia y África tropical (Dhawan *et al.*, 2004). Estas plantas son bejucos que crecen a través de un sistema de zarcillos auxiliares. Las especies más importantes por la producción de frutos comestibles son *P. edulis* Sims (maracuyá morado), *P. edulis* Sims var. *flavicarpa* Degener (maracuyá amarillo), *P. ligularis* Juss (granada china), *P. mollissima* Bailey (sinónimo de *Tacsonia mollissima* HBK), *P. quadrangularis* L. (granadilla gigante) y *P. laurifolia* L. (limón de agua) (Schwentesi *et al.*, 1995). La composición del fruto de *Passiflora* es 50-60 % de cáscara, 30-40 % de jugo y 10-15 % de semilla; se caracteriza por su contenido de carbohidratos, ácidos orgánicos y vitamina A (Carvajal *et al.*, 2011). Se aprovecha principalmente el jugo en fresco o procesado, en la elaboración de refrescos, néctares, yogur, mermeladas, licores y helados (De la Cruz *et al.*, 2010).

Investigaciones sobre el género *Passiflora* han reportado que las especies *P. edulis*, *P. incarnata*, *P. quadrangularis* y *P. mollissima*, tienen capacidad antioxidante, compuestos bioactivos, proteínas, carbohidratos, aminoácidos, vitamina C y fibra cruda; en la cascara los

polisacáridos xilosa, glucosa, galactosa y fructosa (Saravanan y Parimelazhagan, 2014). En *P. biflora* las referencias bibliográficas son escasas. El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar las características físicas, químicas y actividad antioxidante del fruto de *P. biflora* Lam considerando su potencial como alimento, coadyuvante, colorante y otros subproductos.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal y ubicación del experimento**

Los frutos de *P. biflora* fueron cosechados de una plantación del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, 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. Los frutos se recolectaron por la mañana, clasificados de acuerdo a tamaño y color, se realizaron las determinaciones correspondientes y posteriormente almacenadas a 4 °C en bolsas herméticas para posteriores análisis y usos.

### **2.2. Caracterización física y química del fruto de *P. biflora***

A una muestra de 60 frutos sin pedúnculo se les determinó el peso en una balanza de precisión (SCOUTTM Pro OHAUS), longitud y diámetro con un vernier digital de 15 cm (Pie de Rey Calibrador Digital Vernier STAINLESS HARDENED), las proporciones de los componentes cáscara, pulpa y semilla para tres diferentes tamaños.

El pH se midió con un potenciómetro (Conductronic PC 28 digital); la acidez titulable por el procedimiento AOAC (2006) utilizando 1 g de pulpa, los resultados se expresaron en porcentaje de ácido cítrico. La humedad se determinó por pérdida de peso en estufa (Riossa ECF 82D) a 110 °C hasta peso contante. Los sólidos solubles totales (SST, °Brix) con un refractómetro manual (ATAGO), los resultados se reportaron como % de SST o °Brix con corrección por temperatura (-0.0001 °Brix por cada °C arriba de 20 °C y +0.0001 °Brix por

debajo) (AOAC, 1990). Los azúcares totales y reductores se cuantificaron mediante el método de Dubois *et al.* (1956), a una longitud de onda de 490 nm en el espectrómetro (Genesys 10S UV-visible Thermo Scientific); la curva estándar se realizó con glucosa, cuya ecuación correspondiente fue  $D0 = 9.2213Q$  ( $r^2 = 0.9876$ ), donde Q indica la concentración de azúcares y DO la absorbancia. El contenido de proteína se determinó por el método Kjeldahl (AOAC, 2000); la fibra por digestión secuencial de la muestra con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio (AOAC, 1997). Los lípidos por Soxhlet (AOAC, 2000). La vitamina C se cuantificó mediante la reducción del 2,6 diclorofenol-indofenol (AOAC, 1990) cuya sal sódica es de color rosa en medio ácido y azul en medio alcalino; los resultados se expresan en mg/100 g. Las cenizas por el método de calcinación directa (AOAC, 1996) con la incineración a 550°C por dos horas en la mufla (Marca Scorpion Scientific®, A-52230, México).

Se evaluó la textura en frutos inmaduros (madurez fisiológica) y maduros (madurez organoléptica) de *P. biflora* con el Texturómetro EZ-SX short (DeBendorf, Suiza); se utilizó un punzón de 3 mm de diámetro a una velocidad de 2 mm/s hasta 25 % del fruto en forma horizontal, a una temperatura de 20 °C, los resultados se expresan en kg.

La determinación del color de los frutos frescos se realizó en dos estados de maduración (fisiológica y organoléptica) con un colorímetro (Minolta modelo CR-400/410), considerando las coordenadas colorimétricas del espacio CIE  $L^*a^*b^*$ , donde  $L^*$  luminosidad (valores comprendidos entre 0 para el negro y 100 para el blanco),  $a^*$  la tendencia del color verde (-) al rojo (+) y  $b^*$  la tendencia del color azul (-) al amarillo (+) (CIE, 1978). El equipo fue calibrado con el color blanco, se midió en tres puntos de la superficie y se reportan los valores promedio. Las lecturas se realizaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Las coordenadas polares de color, croma (C) y ángulo de tono ( $h^\circ$ ), se calcularon mediante las ecuaciones  $C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  y  $h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$  para  $a^*$  y  $b^*$  positivos, y  $h^\circ = 180 + \arctan(b^*/a^*)$  para  $a^*$  negativo y  $b^*$  positivo.

## **2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante en frutos de *P. biflora* Lam**

### **2.3.1. Preparación de extractos**

El extracto se obtuvo de acuerdo a la metodología propuesta por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2007), se pesó 1 g de pulpa del fruto y se adicionaron 10 mL de solvente (metanol, etanol, acetona, agua, metanol-agua 50:50, etanol-agua 70:30 y acetona-agua 70:30). Se mantuvo en agitación constante durante 1 hora, se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

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

La actividad antioxidante del fruto se determinó mediante el método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). Se preparó una solución DPPH (Aldrich®, Alemania) 0.1 mM en etanol, a 2.9 mL de esta solución se añadieron 0.1 mL de extracto del fruto a diferentes concentraciones. La absorbancia se midió a 517 nm después de 30 minutos de iniciada la reacción en el espectrómetro (Genesys 10S UV-visible Thermo Scientific).

Para la curva de calibración se utilizó trolox (Aldrich®, Rusia) (Ácido-6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del radical DPPH y  $\mu\text{M}$  trolox/g. Se calcularon con la siguiente fórmula:  $\% \text{ Inhibición} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$ , donde  $A_0$  es la absorbancia del control (sin extracto) y  $A_t$  la absorbancia de la muestra. Para el cálculo del  $\text{IC}_{50}$  se graficó el porcentaje de inhibición vs concentraciones de extractos del fruto. Los análisis se realizaron por triplicado.

### **2.3.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS**

Se determinó de acuerdo al método de Re *et al.* (1999) y Da Silva *et al.* (2013), basado en la capacidad inhibitoria del radical ABTS. El radical fue generado usando 440  $\mu\text{L}$  de persulfato de potasio (J.T. Baker®, EUA) 140 mM. La solución fue diluida en etanol hasta obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm. 3 mL de ABTS (Sigma®, Canadá) se mezclaron con 30  $\mu\text{L}$  de extracto del fruto y la absorbancia se midió después de 6 minutos a 734 nm. Para la curva de calibración se utilizó trolox (Aldrich®, Rusia). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}$  trolox/g. Los análisis se realizaron por triplicado.

### **2.3.4. Determinación de compuestos fenólicos**

Para la determinación de compuestos fenólicos en el fruto de *P. biflora* se siguió el método descrito por Saravanan y Parimelazhagan (2014). 100  $\mu\text{L}$  de extracto se depositaron en tubos de ensaye, se añadieron 1 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-aldrich®, EUA) 50% v/v, se agitó vigorosamente la solución y se dejó reaccionar 1 minuto, posteriormente se añadieron 2.5 mL de solución de carbonato de sodio al 20%, después de 60 minutos se midió la absorbancia a 725 nm con el espectrómetro (Genesys 10s UV, Thermo Scientific). La curva de calibración se realizó con ácido gálico (Fermot®, México) (20 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{g}$  de ácido gálico por gramo de muestra. Los análisis se realizaron por triplicado.

### **2.3.5. Análisis de resultados**

Se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los resultados de la capacidad antioxidante de extractos de la pulpa del fruto de *P. biflora* con el uso de varios solventes. Para comparar las medias de los parámetros evaluados se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el Software Statistical Analysis System (SAS® 9.3).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Caracterización física y química del fruto de *Passiflora biflora* Lam

Las características físicas del fruto de *Passiflora biflora* Lam se muestran en el cuadro 8. Es un fruto de los más pequeños del género *Passiflora*, de  $26.70 \pm 4.2$  mm de largo,  $22.41 \pm 3.3$  mm de diámetro, y un peso de  $7.66 \pm 1.7$  g; la proporción de sus componentes cáscara, pulpa y semilla es 22%, 52% y 26%, respectivamente. Aular y Rodríguez (2003) reportaron en tres especies de *Passiflora*, *P. edulis*, *P. cincinnata* y *P. giberti*, el peso y proporción de componentes (Cuadro 8), donde se observa que *P. biflora* es más pequeño con relación a los demás frutos y presenta un 10% más en contenido de pulpa, 20% menos cáscara y 10% más semilla.

**Cuadro 8.** Longitud, peso y proporción por componentes de *P. biflora* y otras especies de *Passiflora*.

Parámetro	Referencia: Aular y Rodríguez (2003)			
	<i>P. biflora</i> *	<i>P. edulis</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. giberti</i>
<i>Dimensión y peso</i>				
Largo (mm)	<b>26.70±4.2</b>	ND	ND	ND
Diámetro (mm)	<b>22.41±3.3</b>	ND	ND	ND
Peso (g)	<b>7.66±1.7</b>	73.72	53.06	13.51
<i>Proporción por componentes (%)</i>				
Cáscara	<b>22</b>	42.37	53.06	49.63
Pulpa	<b>52</b>	41.86	33.39	42.63
Semilla	<b>26</b>	14.82	15.82	16.96

\*Los valores son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3), datos propios.

El fruto de *P. biflora* en estado verde es coriáceo, cuando madura es de textura blanda, puede ser aprovechado en su totalidad dado que presenta una cáscara más delgada y frágil al daño mecánico. La fuerza de penetración fue de  $0.60\pm 0.1$  kg en estado maduro y  $2.18\pm 0.2$  kg en estado verde, dicha disminución de fuerza de penetración en los dos estados se encuentra afectada por la degradación de los componentes de la pared celular. De acuerdo a Sañudo *et al.* (2008) la pared celular experimenta variaciones estructurales durante el proceso de maduración, disminución de pectinas en la cáscara del fruto y como consecuencia el ablandamiento del fruto y el cambio en la resistencia.

El color de *P. biflora* es morado oscuro, como lo muestran las coordenadas colorimétricas, croma y tono (Cuadro 9), con una tendencia al negro, rojo y azul,  $C^*_{ab}=6.96\pm 2.7$  y  $h_{ab}=110.65\pm 6.8$ , con unos muy pequeños puntos claros casi imperceptibles en maduro por el color oscuro, en verde son más visibles y más claros. El color púrpura se presenta en otras especies como en *Passiflora edulis* Sims. fo *edulis* que indica un estado de completa madurez (Jiménez *et al.*, 2001). En general para ambas especies para llegar desde la inmadurez a la maduración completa disminuyen los valores de  $L$ ,  $a$ ,  $b$ ;  $C$  y  $h$  pasando de los tonos verdes a los púrpuras.

**Cuadro 9.** Comparación del color de *P. biflora* y *P. edulis* Sims f. *edulis* en dos estados de madurez.

Referencia: Jiménez *et al.* (2011)

Parámetro	<i>P. biflora</i> Lam*		<i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i>	
	Madurez fisiológica	Madurez organoléptica	Madurez fisiológica	Madurez organoléptica
<i>L</i> *	48.09±3.0	36.28±6.4	55.5±11.8	20.1±3.9
<i>a</i> *	-19.18±1.6	1.25±3.1	-18.9±5.4	4.4±2.8
<i>b</i> *	25.50±4.1	-4.8±2.7	40.5±10.3	3.0±1.2
<i>C</i> * <sub>ab</sub>	31.94±4.2	6.96±2.7	45.2±9.4	5.5±2.8
<i>h</i> <sub>ab</sub>	127.21±2.4	110.65±6.8	116.1±8.7	38.2±7.8

\*Los valores son expresados como media ± desviación estándar (n=3), datos propios.

**Cuadro 10.** Humedad, pH, acidez titulable y sólidos solubles totales de *P. biflora* y otras especies.

Especie de <i>Passiflora</i>	Humedad (%)	pH	Acidez titulable		Autor (es)
			(% ácido cítrico)	°Brix (SST)	
<i>P. biflora</i> Lam*	84.5±0.04	4.84±0.02	1.04±0.06	10±0.0	
<i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i>	82.1±0.1	2.77±0.20	2.51±0.60	17.4±0.7	Jiménez <i>et al.</i> 2011
<i>P. ligularis</i> (granadilla)	84.6	3.7	0.23	14.3	Aguilar <i>et al.</i> 2014
<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	ND	ND	4.7	14.1	Aular <i>et al.</i> 2000
<i>P. alata</i> Dryand	ND	ND	0.7	18.4	Vasconcellos y Cereda (1994)
<i>P. laurifolia</i> L	ND	ND	1.99	10.49	Martins (1998)
<i>P. cincinnata</i> Mast	ND	ND	3.4	10.3	González (1996)
<i>P. mollisima</i> HBK Baley	ND	ND	1.93	14.07	Aular y Rodríguez (2003)
<i>P. mixta</i>	ND	ND	1.19	13.55	Aular y Rodríguez (2003)
<i>P. quadrangularis</i> L	ND	ND	1.10	15.10	Aular y Rodríguez (2003)

\*Los valores son expresados como media ± desviación estándar (n=3), datos propios. ND (no determinado).

La humedad, el pH, la acidez titulable y los SST de *P. biflora* y otras especies (Jiménez *et al.*, 2011; Aguilar *et al.*, 2014) se presentan en el Cuadro 10. La humedad de *P. biflora* es comparable a las otras especies, es menos ácido y con bajo contenido de SST.

El Cuadro 11 muestra el contenido de proteína, lípidos, azúcares totales y reductores, fibra y cenizas de *P. biflora* y los reportados por Jiménez *et al.* (2011) para *P. edulis* Sims fo *edulis*.

El contenido de proteína, lípidos, fibra y cenizas de *P. biflora* es superior a lo reportado para *P. edulis* fo *edulis*; así mismo, es uno de los frutos con menor porcentaje de azúcares.

El contenido de vitamina C fue de 12.5 mg/100 g (Cuadro 11), muy bajo de acuerdo a lo reportado por Contreras-Calderón *et al.* (2011) de 61.5, 71.7 y 51.1 mg/100 g en *P. mollissima*, *P. taminiana* y *P. quadrangularis* respectivamente. Las vitaminas son sustancias orgánicas presentes en pequeñas cantidades en los alimentos, y tiene diversas funciones en el organismo, algunas son reguladoras del metabolismo mineral, crecimiento celular y actúan como antioxidantes (Bernal *et al.*, 2011).

**Cuadro 11.** Proteína, lípidos, azúcares, fibra y cenizas de *P. biflora* y *P. edulis* f. *edulis*.

Componente	<i>P. biflora</i>	Referencia: Jiménez <i>et al.</i> (2011)
	Lam*	<i>P. edulis</i> Sims f. <i>edulis</i>
Proteínas (%)	2.40±0.00	0.9±0.1
Lípidos (%)	0.50±0.08	0
Azúcares totales (mg/g)	11.80±1.02	16.5±0.1 (%)
Azúcares reductores (mg/g)	7.16±0.4	ND
Fibra (%)	11.02±0.03	0.1
Cenizas (%)	0.83±0.01	0.5±0.1
Vitamina C (mg/100 g)	12.5	ND

\*Los valores son expresados como media ± desviación estándar (n=3). ND (no determinado).

### 3.2. Capacidad antioxidante del fruto de *P. biflora*

#### 3.2.1. Capacidad antioxidante por inhibición del radical libre DPPH en frutos de *P.*

##### *biflora*

Los radicales libres se producen en los sistemas biológicos, causan varios trastornos degenerativos como la mutagénesis, carcinogénesis, cardiovasculares y el envejecimiento. Los antioxidantes son compuestos que combaten radicales libres y se encuentran naturalmente en alimentos (Singh y Singh, 2008).

En el Cuadro 12 se muestra la actividad antioxidante de la pulpa de *P. biflora*, por el ensayo del radical libre DPPH. La actividad antioxidante en *P. biflora* fue de  $6,502 \pm 12.94$  y  $10,568 \pm 13.17$   $\mu\text{M}$  trolox/g, de acuerdo al solvente usado, y el  $\text{IC}_{50}$   $5.92 \pm 0.16$  y  $1.35 \pm 0.01$  mg/mL y un porcentaje de inhibición del 48.77 y 87.54 %. Con el extracto acuoso se obtuvo la mayor actividad antioxidante ( $p \leq 0.05$ ) y con el extracto etánolico la menor.

Marroquín *et al.* (2012) obtuvieron en hojas de tres especies *P. edulis*, *P. incarnata* y *P. ligularis*  $\text{IC}_{50}$  de 4.61, 4.95 y 1.65 mg/mL y 4.97, 3.82 y 2.40 mmol trolox/g, inferiores a los de este estudio de *P. biflora*. Saravanan y Parimelazhagan (2014) reportaron en pulpa del fruto de *P. ligularis*,  $\text{IC}_{50}$  19.13  $\mu\text{L}/\text{mL}$  y 78.27% de inhibición del radical DPPH, con extractos de éter de petróleo, cloroformo, acetona y metanol.

Cabrera-Navarro *et al.* (2014) y Carvajal de Pabón *et al.* (2011) obtuvieron en extractos hidroalcohólicos de hojas de *P. ligularis* 11.94  $\mu\text{M}$  Eq Trolox/g materia seca y para extractos metanólicos 233.097  $\mu\text{M}$  Eq Trolox/100 g extracto seco. Da Silva *et al.* (2013) indicó que las hojas de *P. edulis* presentaron un  $\text{IC}_{50}$  de 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y Chirinos *et al.* (2013) en *P. mollissima* (tumbo) 174.3  $\mu\text{mol}$  trolox/g

### 3.2.2. Capacidad antioxidante por el método del radical ABTS en frutos de *P. biflora*

En el Cuadro 12 se observan los resultados obtenidos de *P. biflora* por el método ABTS para extractos con diferentes solventes, los cuales mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), con valores entre  $9256 \pm 116.98$  y  $14208 \pm 215.44$   $\mu\text{M}$  trolox/g, los valores mayores se obtuvieron con el extracto acuoso y menores en el extracto metanólico. Resultados comparables se observaron en los extractos etanólicos, metanol-agua (50:50) y etanol-agua (70:30).

La combinación de los solventes con agua (50:50 y 70:30) proporcionaron mayor actividad antioxidante. Marroquín *et al.* (2012) en hojas de *P. edulis*, *P. incarnata* y *P. ligularis* indicaron una actividad antioxidante ABTS  $\text{IC}_{50}$  de 5.39, 6.49 y 2.22 mg/mL y 4.97, 3.82 y 12.39 mmol Trolox/g. Saravanan y Parimelazhagan (2014) reportaron 9800.94  $\mu\text{mol}$  trolox equi/g en extractos de *P. ligularis*, y 83.1  $\mu\text{mol/g}$  de acuerdo a Chirinos *et al.* (2013).

Contreras-Calderón *et al.* (2011) cuantificaron en pulpa y semillas de *P. mollissima*, *P. taminiana* y *P. quadrangularis* actividad antioxidante de 131, 144 y 16.13 TEs/g peso fresco; y Da Silva *et al.* (2013) para *P. edulis* 19.2  $\mu\text{mol/TE g}^{-1}$ .

**Cuadro 12.** Actividad antioxidante y fenoles totales en pulpa de *P. biflora* Lam.

<b>Solvente</b>	<b>DPPH IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>DPPH % Inhibición</b>	<b>DPPH (<math>\mu</math>M trolox/g)</b>	<b>ABTS (<math>\mu</math>M trolox/g)</b>	<b>Fenoles totales (<math>\mu</math>g ácido gálico/g)</b>
Metanol	3.16 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	51.3 <sup>f</sup>	6,851 $\pm$ 14.94 <sup>f</sup>	9,256 $\pm$ 116.98 <sup>f</sup>	2,014 $\pm$ 2.57 <sup>f</sup>
Etanol	2.68 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	48.8 <sup>g</sup>	6,502 $\pm$ 12.94 <sup>g</sup>	11,054 $\pm$ 250.56 <sup>d</sup>	2,028 $\pm$ 2.14 <sup>e</sup>
Acetona	5.92 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	53.5 <sup>e</sup>	7,144 $\pm$ 8.98 <sup>e</sup>	10,050 $\pm$ 168.97 <sup>e</sup>	1,814 $\pm$ 2.57 <sup>g</sup>
Metanol-agua (50:50 v/v)	1.91 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	61.3 <sup>c</sup>	8,209 $\pm$ 32.56 <sup>c</sup>	11,557 $\pm$ 118.14 <sup>c</sup>	2,272 $\pm$ 2.14 <sup>c</sup>
Etanol-agua (70:30 v/v)	2.03 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	60.3 <sup>d</sup>	8,076 $\pm$ 6.59 <sup>d</sup>	11,323 $\pm$ 41.01 <sup>dc</sup>	2,133 $\pm$ 3.77 <sup>d</sup>
Acetona-agua (70:30 v/v)	1.43 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	77.1 <sup>b</sup>	10,378 $\pm$ 8.98 <sup>b</sup>	14,208 $\pm$ 72.93 <sup>b</sup>	2,770 $\pm$ 2.85 <sup>a</sup>
Agua	1.35 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>	78.5 <sup>a</sup>	10,568 $\pm$ 13.17 <sup>a</sup>	14,721 $\pm$ 215.44 <sup>a</sup>	2,687 $\pm$ 3.70 <sup>b</sup>

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

### 3.2.3. Compuestos fenólicos en frutos de *P. biflora*

El contenido de compuestos fenólicos en la pulpa de *P. biflora* se muestra en el Cuadro 12. El extracto acetona-agua presentó los valores más altos de compuestos fenólicos ( $2,770 \pm 2.85$   $\mu\text{g}$  GAE/g) y el extracto acetónico el más bajo ( $1814 \pm 2.57$   $\mu\text{g}$  GAE/g). Hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre los extractos, la combinación 50:50 y 70:30 mostraron mayor actividad antioxidante.

Marroquín *et al.* (2012) reportaron en *P. edulis*, *P. incarnata* y *P. ligularis* compuestos fenólicos de 11.73, 22.38 y 31.93  $\mu\text{g}$  de ácido gálico/g. Por su parte Saravanan y Parimelazhagan (2014) y Cabrera-Navarro *et al.* (2014) obtuvieron compuestos fenólicos en *P. ligularis*, de 640.70, 137.90, 125.70 y 102.40 mg ácido gálico/g en extractos con acetona, metanol, cloroformo y éter de petróleo respectivamente. Los resultados de Contreras-Calderón *et al.* (2011) para compuestos fenólicos en *P. mollisima*, *P. taminiana* y *P. quadrangularis* fueron 635, 1018 y 70.7 mg ácido gálico/100 g respectivamente.

## 4. CONCLUSIONES

Se logró determinar las características físicas, químicas y actividad antioxidante del fruto de *P. biflora* Lam. El extracto acuoso de *P. biflora* mostró la mayor actividad antioxidante por el ensayo del radical libre DPPH y ABTS. El extracto acetona-agua presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos y el extracto acetónico una baja actividad antioxidante con respecto a los demás solventes utilizados. Así, la combinación de solventes con agua en una relación 50:50 y 70:30 mostraron mayor actividad antioxidante en los extractos. Las características fisicoquímicas, antioxidantes y nutricionales del fruto *P. biflora* permiten sugerir su aprovechamiento en la elaboración de co-productos y aditivos en la industria alimentaria. Es necesario hacer estudios relacionados a la fisiología en el proceso de maduración y postcosecha.

## **Agradecimiento**

Al CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), la LGAC2 Innovación y desarrollo de procesos agroalimentarios para el bienestar social de la Maestría en Ciencias en Innovación Agroalimentaria Sustentable, Línea Prioritaria de Investigación 4: Agronegocios, Agroecoturismo y Arquitectura de Paisaje, Línea Prioritaria de Investigación 12: Agregación de Valor, Subdirección de Vinculación del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

## **5. LITERATURA CITADA**

- Acevedo, B., Montiel, M. y Avanza, J., 2004. Estudio cinético de la degradación de la actividad antioxidante hidrosoluble de jugos cítricos por tratamiento térmico. FACENA, Volumen 20, pp. 91-95.
- Aguilar, J. Espinoza, M. Cabanillas, J., E. Gómez, L. Valverde, D. Benavides, 2014. Effect of the concentration of albedo and sucrose in physicochemical, rheological properties and general acceptability in puree of granadilla (*Passiflora ligularis*). Agroindustrial Science, Volumen 4, pp. 7-18.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis of AOAC International, Association of Official Agricultural Chemists: (15th ed.) Washington, DC..
- AOAC, 1996. Official methods of analysis international, Association of Official Analytical Chemists: (16th ed.) Washington, DC..
- AOAC, 1997. Official methods of analysis of AOAC International, Association of Official Analytical Chemists: (16th ed.) Washington, DC.
- AOAC, 2000. Official methods of analysis of AOAC International, Association of Official Analytical Chemists: (17th ed.) Gaithersburg, MD.
- AOAC, 2006. Official methods of analysis of AOAC international, Association of Official Analytical Chemists: (18th ed.) Gaithersburg, USA..
- Aular, J., C. R. y Durigan, J., 2000. Influencia da idade na colheita sobre as características dos frutos e do suco de maracujá-amarelo. Revista Brasileira de Fruticultura, Volumen 22, pp. 6-8.
- Aular, J. y Y. Rodríguez, 2003. Algunas características físicas y químicas del fruto de cuatro especies de passiflora. Bioagro, 1(15), pp. 41-46.

- Bernal, J., L. Mendiolo, E. Ibañez, y A. Cifuentes, 2011. Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volumen 55, pp. 758-774.
- Brand, W., M. Cuvelier y C. Berset, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, Volumen 28, pp. 25-30.
- Cabrera, N. S., A. Sandoval y F. Forero, 2014. Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos e hidroalcohólicos de granadilla (*Passiflora ligularis*). *Acta Agronómica*, 63(3), pp. 1-11.
- Carvajal de Pabón, L, S. Turbay, B. Rojano, L. M. Alvarez, S. L. Restrepo, J. M. Alvarez, 2011. Algunas especies de Passiflora y su capacidad antioxidante. *Rev. Cubana Plantas Medicinales*, 16(4), pp. 354-363.
- Carvajal, L. M., S. Turbay, B. Rojano, L. Álvarez, S. Restrepo, J. Álvarez, K. Bonilla, C. Ochoa, N. Sánchez, 2011. Algunas especies de passiflora y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), pp. 354-363.
- Chirinos, R.; R. Pedreschi, H. Rogez, Y. Larondelle, D. Campos, 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, Volumen 47, pp. 145-152.
- Contreras, C. J., J. Calderón J., E. Guerra H. y B. García V., 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, Volumen 44, pp. 2047-2053.
- Da Silva, J., C. Betim, T. Colomeu, A. G. Batista, L. Meletti, J. Rizzato, S. Bogusz, M. Fontes, F. Reyes, F. Augusto, M. Maróstica, R. Lima, 2013. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. *Food research International*, Volumen 53, pp. 882-890.
- De la Cruz, J., M. Vargas, O. Del Angel, y H. García, 2010. Estudio de las características sensoriales, fisicoquímicas y fisiológicas en fresco y durante el almacenamiento refrigerado de maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa. Degener), para tres cultivares de Veracruz México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 2(11), pp. 130-142.
- Dhawan, K., S. Dhawan y Sharma, A., 2004. Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, Volumen 84, pp. 1-23.
- Dubois, M., Galles, K. A., Hamilton, J. K., P. A. Rebers y F. Smith, Fred, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry Journal*, 28(3), pp. 350-356.

- González, A., 1996. Biología floral e caracterização físico-química dos frutos de dois accesos de *Passiflora cincinata* Mast. nas condições de Jaboticabal, Brasil: s.n.
- Jiménez, M. A., C. Sierra, F. Rodríguez P., M. González M. F. Heredia, 2011. Physicochemical characterisation of gulupa ( *Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, Volumen 44, pp. 1912-1918.
- Lemus, M. R., A. Vega G., L. Zura B. y K. Ah H., 2011. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, Volumen 132, pp. 1121-1132.
- Marroquín, M., S. Curz y A. Cáceres, 2012. Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. *Acta Hort.* 964, ISHS, pp. 93-98.
- Martins, M., 1998. Biología reprodutiva e qualidade dos frutos de maracujazeiro (*Passiflora laurifolia* L.) na região de jaboticabal, SP., Brasil: FCAV-UNESP- Jaboticabal..
- Pérez, J. J. y C. Saura F., 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, pp. 1050-1160.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, y C. Rice E., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, Volumen 26, pp. 1231-1237.
- Saravanan, S. y T. Parimelazhagan, 2014. In vitro antioxidant, microbial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. *Food Science and Human Wellness*, Volumen 3, pp. 56-64.
- Schwentesius, R. y M. A. Gómez C., 1997. La producción y el mercado mundial del maracuyá, México: Centro de Investigaciones económicas, sociales y tecnológicas de la agroindustria y agricultura mundial. Universidad Autónoma Chapingo. 222p.
- Sañudo B. A., J. Siller C., T. Osuna E., D. Muy R., G. López Á. y J. Labavitch, 2008. Control de la maduración en frutos de papaya (*Carica papaya* L.) con 1-metilciclopropeno y ácido 2-cloroetil fosfónico. *Rev. Fitotec. Mex.* 31 (2): 141 – 147.
- Singh, S. y R. P. Singh, 2008. In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Rev Int*, 24(4), pp. 392-415.
- Szefer, P. y Nriagu, J., 2007. Mineral components in foods. New York; CRC Press, p. 10.
- Tril, U., J. Fernández L., J. A. Pérez A. y M. Viuda M., 2014. Chemical, physicochemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of rich-fibre powder extract

obtained from tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Industrial Crops and Products*,  
Volumen 55, pp. 155-162.

Vasconcellos, M. y E. Cereda, 1994. O cultivo de maracujá doce *Passiflora alata* Dryand.  
Maracujá. Produção e Mercado.. Universidad Estadual do Sudoeste da Bahia. Cruz  
das Almas., pp. 71-83.

## CAPITULO II

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN HOJAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni

#### RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bertoni se ha usado como endulzante natural en la elaboración de bebidas y otros alimentos, debido a su principal compuesto endulzante el esteviósido presente en las hojas. Estudios realizados muestran un potencial antioxidante en las hojas de *S. rebaudiana*. El objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Los solventes para los extractos fueron etanol, metanol, agua, acetona, etanol-agua (70:30), metanol-agua (50:50) y acetona-agua (70:30), con la finalidad de observar el mejor medio de extracción. Para ello se realizaron ensayos de inhibición del radical libre DPPH, decoloración del radical catiónico ABTS y Folin-Ciocalteu. Los resultados muestran diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en relación al solvente utilizado. El contenido total de compuestos fenólicos más alto fue de  $74.45 \pm 0.17$  mg ácido gálico/g para el extracto metanol-agua (50:50) y el más bajo para el extracto acetónico  $5.88 \pm 0.40$  mg ácido gálico/g. La actividad antioxidante (DPPH) fue de  $111.2 \pm 0.10$  mM trolox/g y (ABTS)  $315.7 \pm 6.1$  mM trolox/g para el extracto etanol-agua (70:30), el cual mostró la mayor eficiencia y actividad antioxidante respecto a los demás extractos. Los extractos acetónicos mostraron la menor actividad antioxidante  $46.3 \pm 0.21$  mM trolox/g (DPPH) y  $58.6 \pm 2.0$  mM trolox/g (ABTS). Las hojas de *S. rebaudiana* presentan un alto potencial antioxidante, que se le ha atribuido a la inhibición de radicales libres y superóxidos, lo que significa un potencial para ser usado como antioxidante natural en la industria alimentaria y farmacéutica.

**Palabras clave:** DPPH, ABTS, esteviósidos, extracto acuoso.

## ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bertoni has been used as a natural sweetener in the preparation of drinks and other foods, stevioside is the main compound sweetener present in the leaves. Studies shows a potential antioxidant in *S. rebaudiana* leaves. The objective of this research was determine the content of phenolic compounds and antioxidant activity. The solvents used for extracting the antioxidant compounds were ethanol, methanol, water, acetone, ethanol-water (70:30), methanol-water (50:50) and acetone-water (70:30). The assays used for determining the antioxidant activity were free radical inhibition (DPPH), cation decolorization (ABTS) and Folin-Ciocalteu. Significant difference ( $p \leq 0.05$ ) were observed phenolic content and antioxidant activity among the solvents used. The total phenolic content was  $74.45 \pm 0.17$  mg gallic acid/g for methanol-water (50:50) extracts which showed the highest content and  $5.88 \pm 0.40$  mg gallic acid/g for acetone extracts. The antioxidant activity (DPPH) was  $111.2 \pm 0.10$  mM trolox/g and (ABTS)  $315.7 \pm 6.1$  mM trolox/g for ethanol-water (70:30) extracts which showed the highest efficiency and antioxidant activity in relation to the other extracts. The antioxidant activity (DPPH) for acetone extracts was  $46.3 \pm 0.21$  mM trolox/g and (ABTS)  $58.6 \pm 2.0$  mM trolox/g. The combination solvent-water 50:50 and 70:30 resulted in extracts with the highest antioxidant capacity. *S. rebaudiana* leaves has a high antioxidant potential, which has been attributed to scavenging radical free and superoxide, it is present a potential to be used as a natural antioxidant in food and pharmaceutical industry.

**Keywords:** DPPH, ABTS, stevioside, aqueous extract.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las Asteráceas, crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil, Paraguay y Argentina, y generalmente se propaga comercialmente de manera sexual (Jarma *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2011). Actualmente su cultivo se ha extendido a otras regiones del mundo, incluyendo Canadá, Asia y Europa. De las 230 especies de *Stevia*, *rebaudiana* y *phlebophylla* son las únicas que producen glúcidos de esteviol (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011) bajos en calorías, llamados comúnmente esteviósidos, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino es de 300 veces mayor que el azúcar de caña. Además compuestos químicos de interés también han sido aislados del género *Stevia*, como longipinenos provenientes de *S. pilosa*, *S. viscida* y *S. lucida* (Jarma *et al.*, 2010).

*Stevia rebaudiana* Bertoni fue clasificada botánicamente por Moisés Santiago Bertoni, en 1899. Inicialmente era llamada *Eupatorium rebaudianum*, en 1905 cambio a *S. rebaudiana* Bertoni. Su principal componente dulce fue aislado en 1909 y en 1931 se realizó el primer extracto purificado para la producción de esteviósidos, así mismo en 1952 se estableció la estructura química de los glucósidos de diperteno componentes endulzantes de *Stevia* (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011; Barriocanal *et al.*, 2008), los cuales comprenden esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E, F y dulcósido (Geuns, 2003).

Estudios revelan que *Stevia* se ha utilizado desde la antigüedad para diversos fines, las tribus Guaraní del Paraguay y Brasil la utilizaban como edulcorante y tés medicinales para tratar el ardor de estómago y otras dolencias (Blande y Telmer, 2007). La estevia ha despertado interés científico debido a su dulzura y las propiedades terapéuticas que se la han atribuido. Japón fue el primer país de Asia en comercializar esteviósido como edulcorante en alimentos y en la industria de los medicamentos. Además la estevia y el esteviósido se han aplicado como sustitutos de la sacarosa, para el tratamiento de diabetes mellitus, la obesidad, la hipertensión

y prevención de caries, dichos estudios han demostrado que los componentes de ésta planta tienen benéficos terapéuticos. Aunado a esto, estudios toxicológicos han indicado que el esteviósido no tiene efectos mutagénicos, teratogénicos o cancerígenos, ya que no se han observado reacciones cuando se utiliza como edulcorante (Chatsudthipong y Mauanprasat 2009; Lemus-Mondaca *et al.*, 2011; Pól *et al.*, 2007).

De acuerdo a Mishara *et al.* (2010), la hoja de estevia presenta una densidad de  $0.443 \text{ g mL}^{-1}$ , capacidad de retención de agua de  $4.7 \text{ g mL}^{-1}$ , capacidad de absorción de grasa de  $4.5 \text{ g mL}^{-1}$ , valor de emulsificación de  $5.0 \text{ g mL}^{-1}$ , índice de hinchamiento  $5.01 \text{ g g}^{-1}$ , solubilidad  $0.365 \text{ g g}^{-1}$  y pH 5.95, que le confieren propiedades funcionales en la elaboración de productos viscosos como sopas y productos de panadería. Su valor nutricional se debe a una buena fuente de carbohidratos, proteína, fibra cruda y minerales tales como, calcio, fosforo, sodio, potasio, magnesio y zinc, lo cual atribuye bienestar y reducción de ciertas enfermedades, debido a que dichos compuestos presentan un papel importante y esencial en el metabolismo humano y reserva de energía para diversos aspectos estructurales y actividades antiinflamatorias (Bernal *et al.*, 2011).

Así mismo, algunos autores reportan valores de capacidad antioxidante en hojas y tallos de *Stevia*, expresados como porcentaje de inhibición del radical DPPH y  $IC_{50}$  (concentración requerida para inhibir al 50% el radical DPPH). Resultados que muestran un alto potencial antioxidante (Thomas y Glade, 2010). Existe información reportada de *S. rebaudiana* Bertoni como potencial antioxidante. En este estudio se evaluó el uso de diferentes solventes como medio de extracción y su combinación con extractos acuosos, mediante ensayos DPPH y ABTS, y cuantificación de compuestos fenólicos totales en las hojas de *S. rebaudiana*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material Vegetal y ubicación del experimento

Las hojas de *S. rebaudiana* fueron recolectadas de plantas cultivadas en el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, 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. Las hojas de estevia fueron deshidratadas en horno (Felisa FE-294AD, México) a una temperatura de 60 °C durante 12 horas. Posteriormente fueron almacenadas en bolsas de papel y en oscuridad a temperatura ambiente hasta su análisis.

### 2.2. Preparación de extractos de hojas de *S. rebaudiana*

Para la preparación de los extractos de hojas deshidratadas de *Stevia* se realizaron extracciones sólido-líquido siguiendo la metodología propuesta por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2007) con diferentes solventes y combinación con agua, se utilizó metanol, metanol-agua (50:50), acetona, acetona-agua (70:30), etanol, etanol-agua (70:30) y un último extracto acuoso. Se tomaron 0.1 g de hojas deshidratadas de *Stevia* y se mezcló con 10 mL de cada solvente y se mantuvo en agitación por 1 hora en oscuridad, posteriormente el extracto se centrifugo a 6000 rpm durante 20 min. Se recuperó el sobrenadante y almaceno a -20°C hasta su análisis.

### 2.3. Ensayo de inhibición del radical libre 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH)

La capacidad antioxidante (DPPH) de los extractos de la hoja de *S. rebaudiana* se determinó de acuerdo al método descrito por Blois (1958) y Molyneux (2004). Se preparó un solución DPPH (Aldrich®, Alemania) 0.1 mM en etanol y a 2.9 mL de esta solución se le añadieron 0.1 mL de extracto a diferentes concentraciones. La absorbancia se midió a 517 nm después de 30 minutos de iniciada la reacción en espectrómetro (Genesys 10S UV-visible Thermo Scientific, E. U. A.). Para la curva de calibración se utilizó trolox (Aldrich®, Rusia) (Ácido-6-hidroxi-2,

5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición del radical DPPH y mM trolox/g. Se calcularon con la siguiente fórmula: % Inhibición =  $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100$ . Donde  $A_0$  es la absorbancia del control (sin extracto) y  $A_t$  la absorbancia de la muestra. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **2.4. Ensayo de decoloración del radical catiónico 2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)**

Se determinó de acuerdo al método de Re *et al.* (1999) basado en la capacidad inhibitoria del radical ABTS•+. El radical fue generado usando 440 µL de persulfato de potasio (J.T. Baker®, EUA) 140 mM y una solución ABTS (Sigma®, Canadá) 7 Mm. La solución fue diluida en etanol hasta obtener una absorbancia de  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm. 2 mL de ABTS se mezclaron con 20 µL de extracto de hojas de *S. rebaudiana* y la absorbancia se midió después de 6 minutos a 734 nm. Para la curva de calibración se utilizó trolox (Aldrich®, Rusia). Los resultados se expresaron como mM Trolox/g. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **2.5. Determinación de compuestos fenólicos totales**

Para la determinación de compuestos fenólicos totales en los extractos de hojas de *S. rebaudiana* se siguió el método colorimétrico Folin-Ciocalteu descrito por Shukla *et al.* (2012). 0.5 mL de extracto se diluyeron con 23 mL de agua destilada y se añadieron 0.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-aldrich®, EUA), se agitó vigorosamente la solución y se dejó reaccionar 3 minutos, posteriormente se añadieron 1.5 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, después de 60 minutos se midió la absorbancia a 760 nm con espectrómetro (Genesys 10S UV-visible Thermo Scientific, E. U. A.). La curva de calibración se realizó con ácido gálico (Fermort®, México). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g. Los análisis se realizaron por triplicado.

## 2.6. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los resultados de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos de las hojas deshidratadas de *S. rebaudiana*. Para comparar las medias de los parámetros evaluados se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el Software Statistical Analysis System (SAS® 9.3)

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Inhibición del radical libre DPPH en *S. rebaudiana*

El ensayo DPPH proporciona información básica sobre la actividad antirradical de los extractos. La reacción se lleva a cabo entre el radical DPPH estable y el antioxidante. En el Cuadro 13 se muestran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de las hojas de *S. rebaudiana*.

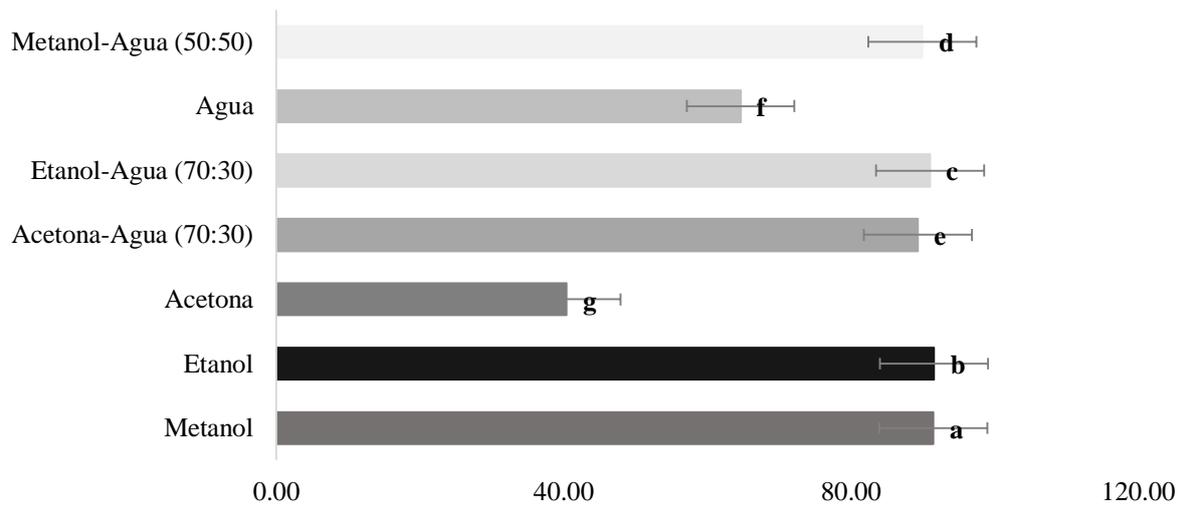
La actividad antioxidante (DPPH) fue de  $46.3 \pm 0.021$  y  $112.0 \pm 0.06$  mM trolox/g de acuerdo al solvente usado y un porcentaje de inhibición del 40.46 y 91.63 % (Figura 3). El extracto etanólico presentó la mayor actividad antioxidante y el extracto acetónico la menor con respecto a los demás extractos.

Los valores de  $IC_{50}$  se muestran en el Cuadro 13 para el extracto metanólico y acetónico de 0.563 y 2.739 mg/mL. Ruiz *et al.* (2015) reportaron un porcentaje de inhibición del radical (DPPH) del 86.4 % en extractos metanólicos de hojas de *S. rebaudiana*.

Kim *et al.* (2011) obtuvieron en extractos acuosos de hojas y tallos de *S. rebaudiana* un 42.86 y 10.40 % de inhibición (DPPH). Shukla *et al.* (2012) reportaron en extractos acuosos de *S. rebaudiana* un  $IC_{50}$  de 83.45  $\mu$ g/mL y 72.37 % de inhibición.

Tadhani *et al.* (2007) en extractos acuosos y metanólicos reportaron en hojas de estevia un  $IC_{50}$  de 752.6 y 904.4  $\mu$ g/mL y un porcentaje de inhibición de 39.86 y 33.17%, y para tallos en

extractos acuosos y metanólicos un  $IC_{50}$  de 541.3 y 527.9  $\mu\text{g/mL}$  y un porcentaje de inhibición del 55.42 y 56.82%. Ahmad *et al.* (2010) indicaron en extractos metanólicos y etanólicos de hojas de estevia un porcentaje de inhibición del 77.67 y 67.08 %.



**Figura 3.** Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH en extractos de *S. rebaudiana*.

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre medias.

**Cuadro 13.** Actividad antioxidante y fenoles totales en hojas de *S. rebaudiana* B.

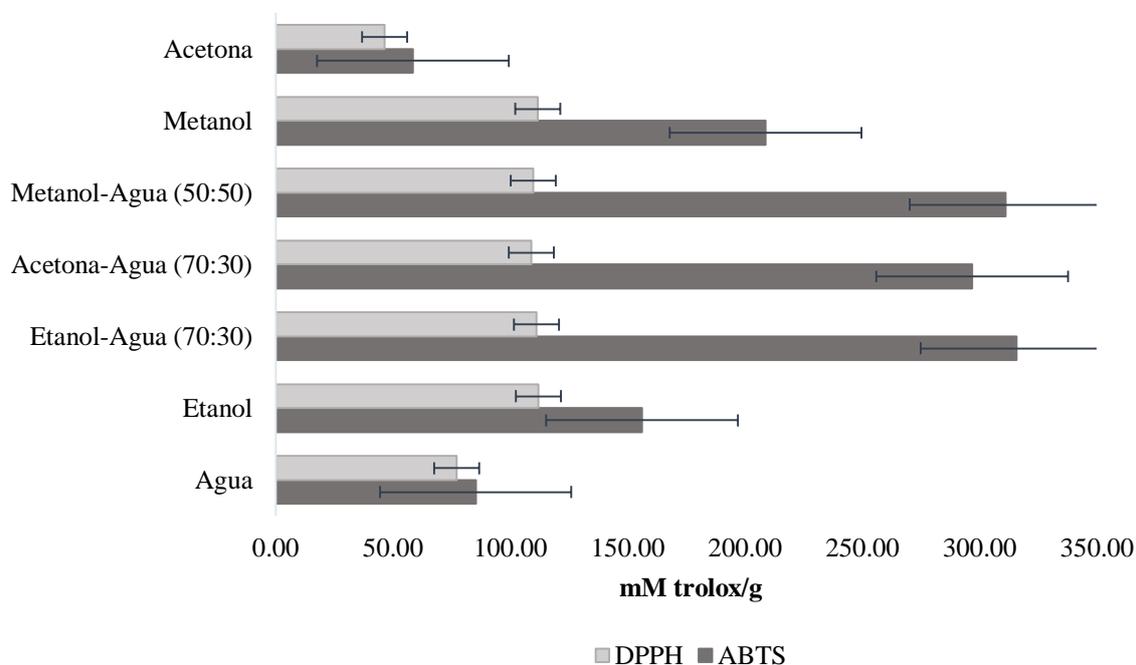
<b>Solvente</b>	<b>DPPH IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>	<b>DPPH (mM trolox/g)</b>	<b>ABTS (mM trolox/g)</b>	<b>Fenoles totales (mg ácido gálico/g)</b>
Metanol	0.563 <sup>g</sup>	111.8±0.01 <sup>b</sup>	208.8±7.2 <sup>d</sup>	61.34±0.23 <sup>d</sup>
Etanol	0.603 <sup>e</sup>	112.0±0.06 <sup>a</sup>	156.2±2.0 <sup>e</sup>	41.67±0.17 <sup>e</sup>
Acetona	2.739 <sup>a</sup>	46.3±0.21 <sup>g</sup>	58.6±2.0 <sup>g</sup>	5.88±0.40 <sup>g</sup>
Metanol-agua (50:50 v/v)	0.645 <sup>d</sup>	109.8±0.06 <sup>d</sup>	311.1±1.8 <sup>b</sup>	74.45±0.17 <sup>a</sup>
Etanol-agua (70:30 v/v)	0.593 <sup>f</sup>	111.2±0.10 <sup>c</sup>	315.7±6.1 <sup>a</sup>	70.52±0.23 <sup>b</sup>
Acetona-agua (70:30 v/v)	0.692 <sup>c</sup>	109.0±0.28 <sup>e</sup>	297.0±1.6 <sup>c</sup>	64.30±0.26 <sup>c</sup>
Agua	0.998 <sup>b</sup>	77.2±0.62 <sup>f</sup>	85.3±0.5 <sup>f</sup>	18.07±0.08 <sup>f</sup>

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

### 3.2. Decoloración del radical catiónico ABTS en *S. rebaudiana*

La capacidad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC), es un método que utiliza un espectrofotómetro para medir la pérdida de color cuando se añade un antioxidante a la solución ABTS (verde-azul). En el Cuadro 13 se muestran los resultados de la actividad antioxidante en las hojas de *S. rebaudiana*. Los resultados obtenidos (ABTS) fueron de  $315.0 \pm 6.1$  y  $58.6 \pm 2.0$  mM trolox/g de acuerdo al solvente usado.

El extracto Etanol-Agua (70:30) presentó la mayor actividad antioxidante y el extracto acetónico la menor respecto a los demás extractos. En la Figura 4 podemos observar la comparación de la actividad antioxidante utilizando los métodos DPPH y ABTS en mM trolox/g en los diferentes extractos de hojas de *Stevia*, siendo el método ABTS el que reporta mayor cuantificación de la actividad antioxidante respecto al método DPPH. Ruiz *et al.* (2015) reportaron en hojas de *S. rebaudiana* una actividad antioxidante (ABTS) de 623.7 mM trolox/g.



**Figura 4.** Comparación de la actividad antioxidante DPPH y ABTS en extractos de *S. rebaudiana* B.

### 3.3. Compuestos fenólicos en *S. rebaudiana*

El contenido de compuestos fenólicos en hojas de *S. rebaudiana* Bertoni se muestran en el Cuadro 13. El extracto metanol-agua (50:50) obtuvo el valor más alto de compuestos fenólicos ( $74.45 \pm 0.17$  mg ácido gálico/g) y el extracto acetónico el más bajo ( $5.88 \pm 0.40$  mg ácido gálico).

Ruiz *et al.* (2015) reportaron en extractos metanólicos de hojas de *S. rebaudiana* B. una concentración de 28.4 mg ácido gálico/g. Shukla *et al.* (2012) obtuvieron en extractos acuosos y etanólicos de hojas de *Stevia* 56.74 y 61.50 mg ácido gálico/g. Por su parte Tadhmi *et al.* (2007) encontraron en extractos metanólicos de hojas y tallos de *Stevia* 25.18 y 35.86 mg ácido gálico/g. Finalmente Muanda *et al.* (2010) obtuvieron 25.25 y 20.85 mg de ácido gálico/g en extractos acuosos y metanol-agua.

## 4. CONCLUSIONES

El extracto etanol-agua (70:30) de *S. rebaudiana* B. mostró la mayor actividad antioxidante por el ensayo del radical libre DPPH y decoloración catiónico ABTS. El extracto metanol-agua (50:50) presentó el mayor contenido de fenoles y el extracto acetónico la menor actividad antioxidante respecto a los demás extractos analizados.

El potencial antioxidante, demostrado en varios estudios en las hojas y tallos de *S. rebaudiana* B. han despertado interés en esta fuente natural de edulcorantes para mejorar la eficiencia de diferentes productos como agentes nutracéuticos y farmacológicos.

El consumo de *S. rebaudiana* puede desempeñar un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con un aumento de radicales libres en las células, como cáncer, cardiovasculares y envejecimiento.

Los resultados de este estudio indican la presencia de compuestos antioxidantes en las hojas de *Stevia* y gran actividad oxidativa, a través de su acción antioxidante en ensayos in vitro.

Estudios realizados in vivo sobre sus propiedades antioxidantes y la identificación de diferentes fotoquímicos garantizan el uso de *Stevia* en la mejora de la salud humana.

## 5. LITERATURA CITADA

- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B., Farooq, S. 2010. Efficient free radical scavenging activity of Ginkgo biloba, *Stevia rebaudiana* and *Parthenium hysterophorous* leaves through DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). International Journal of Phytomedicine, Volumen 2, pp. 231–239.
- Barriocanal, L., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J., Jimenez, N. 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans, a pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and type 2 diabetics. Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volumen 51, pp. 37-41.
- Bernal, J., Mendiolo, J., Ibañez, E., Cifuentes, A., 2011. Advanced analysis of nutraceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volumen 55, pp. 758-774.
- Blande, J. y Telmer, P., 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry, Volumen 68, pp. 1855-1863.
- Chatsudthipong, V. y Mauanprasat, C., 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness.. Pharmacology and Therapeutics, Volumen 121, pp. 41-54.
- Geuns, J. M., 2003. Molecules of interest: Stevioside. Phytochemistry, Volumen 64, pp. 913-921.
- Jarma, A., Combalt, E., Cleves, J., 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. Agronomía Colombiana, Volumen 28, pp. 199-208.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K., 2011. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry, Volumen 132, pp. 1121-1132.
- Mishara, P., Singh, R., Kumar, U., Prakash, V., 2010. *Stevia rebaudiana*: A magical sweetener. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, Volumen 5, pp. 62-74.
- Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 26(2), pp. 211-219.
- MS., B., 1958. Antioxidant determinations by the use of a estable free radical. Nature, 26(1), pp. 199-200.

- Muanda, F., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. 2010. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT – Food Science and Technology*, Volumen 44, pp. 1856-1872.
- Pérez, J. J. y C. Saura F., 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, pp. 1050-1160.
- Pól, J., Hahnová, B., Hyotylainen, 2007. Characterisation of *Stevia Rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, Volumen 1150, pp. 85-92.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, y C. Rice E., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, Volumen 26, pp. 1231-1237.
- Ruiz, J., Mongue, Y., Matus, Á., Segura, M., 2015. Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutrición Hospitalaria*, 31(3), pp. 1163-1170.
- Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V., 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*, Volumen 64, pp. 807-811.
- Tadhani, M., Patel, V., Subhash, R. 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volumen 20, pp. 323–329.
- Thomas, J., y Glade, M. 2010. *Stevia*: It's not just about calories. *The Open Obesity Journal*, Volumen 2, pp. 101–109.
- Yadav, A., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P., 2011. A review on the improvement of *Stevia rebaudiana* ( Bertoni). *Canadian Journal of Plant Science*, Volumen 28, pp. 1-27.

## CAPITULO III

### POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE UN YOGUR PROBIÓTICO ENRIQUECIDO

#### CON *Passiflora biflora* Lam Y *Stevia rebaudiana* Bertoni

#### RESUMEN

Los productos lácteos fermentados cuentan con una gran aceptación por su contenido básico de nutrientes y de beneficio a la salud. El fruto *P. biflora* y las hojas de *S. rebaudiana* presentan un alto potencial antioxidante y nutrimental; carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas, implicados con la prevención de enfermedades crónico degenerativas. El objetivo fue desarrollar y evaluar las características físicas, químicas y potencial antioxidante de un yogur con adición de una base tipo jalea de *Passiflora* y *Stevia* durante 1, 7 y 14 días de almacenamiento a 4°C. Se obtuvieron cuatro formulaciones con diferentes concentraciones; 10% (Yps1), 25% (Yps2), 40% (Yps3) y un control con 0% (YpsC). La actividad antioxidante del yogur incrementó con la concentración. Así, el ensayo DPPH el día 1 para Yps1 y Yps3 fue de  $136.0 \pm 3.6$  y  $416.7 \pm 4.9$   $\mu\text{M}$  trolox/g; el día 14 de  $305.5 \pm 5.4$  y  $585.1 \pm 3.0$   $\mu\text{M}$  trolox/g; y el control YpsC fue  $73.8 \pm 1.3$   $\mu\text{M}$  trolox/g. El contenido de compuestos fenólicos en el día 1 para Yps1 y Yps3 fue  $40.7 \pm 0.3$  y  $84.3 \pm 0.8$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g y el día 14 de  $42.6 \pm 0.2$  y  $76.1 \pm 0.8$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g, para el control YPSC fue  $27.0 \pm 0.8$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g. El ensayo ABTS mostró mayor cuantificación de la actividad antioxidante con valores entre  $134.8 \pm 3.84$  y  $954.1 \pm 23.0$   $\mu\text{M}$  trolox/g. Los análisis microbiológicos de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas confirmaron la ausencia de bacterias patógenas. Las bacterias lácticas decrecieron respecto al tiempo de almacenamiento entre 9.04 y 7.17  $\log_{10}$  ufc/g, el YpsC (control) presentó mayor cantidad de bacterias lácticas. El yogur presentó un alto potencial antioxidante con la adición de *P. biflora* y *S. rebaudiana*.

**Palabras clave:** DPPH, ABTS, fenoles, probióticos.

## ABSTRACT

Fermented milk products are widely accepted by the population, they are considered food with a basic nutrient content and some beneficial health effects. *Passiflora biflora* fruit and *Stevia rebaudiana* leaves have a high antioxidant potential (tannins and flavonoids) and nutrition; carbohydrates, proteins, minerals and vitamins, involved with prevention of degenerative diseases. The objective was to develop and evaluate the characteristics of pH, acidity, colour and antioxidant potential of a yogurt with addition of a base type jelly *Passiflora* and *Stevia* during storage at 4° C for 1, 7 and 14 days. We obtained four formulations with different concentrations of the base type jelly; 10% (Yps1), 25% (Yps2), 40% (Yps3) and a 0% control (YpsC). The antioxidant activity of yogurt increased depending on the concentration. The DPPH trial showed that on day 1; YPS1 and YPS3 presented  $136.0 \pm 3.6$  and  $167.4 \pm 9.9$   $\mu\text{M}$  trolox/g respectively and on day 14; YPS1 and YPS3 a  $305.5 \pm 5.4$  and  $585.1 \pm 3.0$   $\mu\text{M}$  trolox/g respectively, compared to the YPSC control with  $73.8 \pm 1.3$   $\mu\text{M}$  trolox/g. The content of phenolic compounds in day 1; YPS1 and YPS3 presented  $40.7 \pm 0.3$  and  $84.3 \pm 0.8$   $\mu\text{g}$  Gallic acid/g respectively and on day 14; YPS1 and YPS3  $42.6 \pm 0.2$  and  $76.1 \pm 0.8$   $\mu\text{g}$  Gallic acid/g respectively. The ABTS assay sample showed greater quantification of antioxidant activity. Microbiological analyses show the safety of the product according to the Mexican standards that specify the physical, chemical and microbiological characteristics in fermented dairy products. Lactic acid bacteria decreased with respect to the storage time, being the YpsC that presented the highest content of lactic acid bacteria. Yogurt presented a high antioxidant potential with the addition of *P. biflora* and *S. rebaudiana*.

**Keywords:** DPPH, ABTS, phenols, probiotic.

## 1. INTRODUCCIÓN

La leche ha sido un alimento de gran importancia para el hombre desde la domesticación de los animales y el comienzo de la agricultura para pastoreo. Es el alimento de origen animal más versátil y forma parte de la dieta en muchas formas físicas diferentes. Además de la propia leche, se han desarrollado tecnologías que permiten la fabricación de queso, leches fermentadas, nata y mantequilla (Varnam y Sutherland, 1995).

El yogur es una de las leches fermentadas más populares en el mundo, debido a los beneficios que se le atribuyen a su consumo (Michael *et al.*, 2010). Las bacterias lácticas utilizadas en su elaboración *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y próbicas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son suplementos microbianos vivos, que tienen un efecto benéfico en el equilibrio de la flora intestinal del huésped, control de enfermedades gastrointestinales y niveles de colesterol en la sangre, mejoran la digestibilidad en personas intolerantes a lactosa, además de poseer actividad anticancerígena (Cook *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2011).

En años recientes, se han realizado investigaciones respecto a la elaboración de yogures enriquecidos con extractos vegetales y especias (ajo, canela, cardamomo, nuez moscada, cebolla, soya, hojas de té, entre otros), edulcorantes naturales (*S. rebaudiana* B.), fibras dietarias como prebióticos a partir de la fruta *Passiflora*, manzana, plátano y algunos otros con función antioxidante e hipoglucémico, añadiendo polifenoles vegetales y oligosacáridos (Ming *et al.*, 2013). Así mismo, se ha evaluado este producto lácteo después de almacenado cuatro semanas, el cual sufre cambios fisicoquímicos y reológicos que afectan su calidad organoléptica (Chougrani *et al.*, 2009).

Do Espírito *et al.* (2012) observó que la adición de fibra dietaria promueve la reducción inicial del pH en la elaboración de yogur suplementado con manzana, plátano y maracuyá en los primeros 14 días de almacenamiento, de los 14 a 28 días se mantiene estable, lo que concuerda

con Mohapatra *et al.* (2010), Nawirska y Kwasniewska (2005) y Salgado *et al.* (2010), en la adición de fibra que incrementó en 1 g/100 g los sólidos totales. Buriti *et al.* (2014) concluyeron que la adición de pulpa de frutas tropicales en la elaboración de bebidas fermentadas de leche de cabra incrementó el contenido de sólidos, grasa y pH; resultados comparables reportaron Ramírez y Delahaye (2009).

Extractos de plantas y vegetales con potencial antioxidante han sido utilizados como ingredientes funcionales en la industria de los alimentos, incluyendo el sector lácteo. Es por ello que a nivel mundial se está haciendo uso de edulcorantes naturales y frutos tropicales, como la estevia y la pasiflora. Este edulcorante natural posee componentes activos como el esteviósido, rebaudiósidos A, B, C, D, E y dulcósidos A y B (Kujur *et al.*, 2010), usados como sustitutos de la sacarosa.

Estudios toxicológicos han demostrado que el esteviósido no tiene efectos mutagénicos, teratogénicos o cancerígenos (Lemus-Mondaca *et al.*, 2011). Las pasifloras tienen efectos positivos a la salud por su contenido de vitaminas, minerales, antioxidantes polifenólicos y fibra dietética (López-Vargas *et al.*, 2013). El objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar una bebida láctea probiótica con *P. biflora* edulcorada con *S. rebaudiana* y determinar sus características físicas, químicas y actividad antioxidante, en 1, 7 y 14 días de almacenamiento a 4°C.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Material vegetal y ubicación del experimento**

Las hojas de *S. rebaudiana* B. y el fruto de *P. biflora* Lam fueron recolectados de cultivos pertenecientes al Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, a 650 msnm, 18° 50' Latitud Norte y 96° 51' Longitud Oeste. El clima de la zona es templado húmedo con lluvias en verano y temperatura media de 22 °C, máxima de 35 °C y mínima de 10 °C. Las hojas se deshidrataron

en horno (Felisa FE-294AD, México) a 60 °C durante 24 horas y almacenadas en bolsas de papel, a temperatura ambiente en obscuridad hasta su uso. El fruto se recolectó en madurez organoléptica y se procedió a su selección, lavado y desinfección, finalmente se almacenó en bolsas herméticas plásticas a 4 °C hasta su procesamiento.

## **2.2. Preparación de extractos acuosos de *S. rebaudiana* B. y base para yogur**

Los extractos acuosos de *S. rebaudiana* se prepararon de acuerdo a Narayanan *et al.* (2014). 5 g de hojas deshidratadas de *Stevia* se mezclaron con 200 mL de agua destilada y se mantuvo en agitación durante 1 hora a 60 °C. Posteriormente el extracto obtenido se filtró (Whatman No. 4) y centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos. El extracto se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La elaboración de la base para yogur se realizó con el fruto de *P. biflora* siguiendo el método de Ventura *et al.* (2013) con modificaciones, para ello se trituró y mantuvo en cocción la pulpa en agua destilada en una relación 1:1 durante 15 minutos a una temperatura de 90 °C, posteriormente se extrajo el jugo, el cual se calentó con agitación por 10 minutos más, se añadió el extracto acuoso de estevia (6%) y ácido cítrico (2%) hasta obtener un pH de 3.5, finalmente se añadió pectina (1.5%) hasta obtener un gel consistente tipo jalea, de color rojo oscuro.

## **2.3. Preparación y formulación del yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana***

Para la elaboración de yogur se utilizó un cultivo iniciador liofilizado de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y bacterias próbicas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (lyofast®, Sacco, Italia). El yogur se preparó con leche entera en polvo (Alpura®, México) reconstituida 120 g/L de agua destilada, perfectamente homogenizada, a 40°C se inoculó e incubó a 43°C por 5 horas hasta alcanzar un pH de 4.5; posteriormente se enfrió a 20 °C y se mezcló durante 15 minutos. Se realizaron 4 formulaciones con *Passiflora*

edulcorados con 6% de extracto acuoso de estevia: 10% (Yps1), 25% (Yps2), 40% (Yps3) y un control con 0% (YpsC). El producto se envasó y almacenó a 4°C en oscuridad. Se evaluaron a 1, 7 y 14 días de su elaboración.

#### **2.4. Determinación de pH, acidez titulable y color del yogur**

Se determinó el pH de cada muestra de yogur con un potenciómetro digital portátil (Eco Testr pH2 OAKTON, E.U.A). La acidez titulable se determinó de acuerdo a la AOAC (1995). El color se evaluó utilizando un colorímetro (CR-400; Minolta, Tokyo, Japón) considerando espacios de color CIELAB ( $L^* a^* b^*$ ), donde  $L^*$  expresa la luminosidad (claro u oscuro, sus valores van de 0 para el negro a 100 para el blanco),  $a^*$  indica la tendencia del color rojo (positivo) al verde (negativo), y  $b^*$  la tendencia del color amarillo (positivo) al azul (negativo). Las lecturas se realizaron a temperatura ambiente ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ). Las coordenadas polares de color croma (C) y ángulo de tono ( $h^\circ$ ) se calcularon mediante las ecuaciones  $C=(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$  y  $h^\circ=\arctan (b^*/a^*)$  para  $a^*$  y  $b^*$  positivos, y  $h^\circ=180+\arctan (b^*/a^*)$  para  $a^*$  negativo y  $b^*$  positivo. Las muestras se analizaron por triplicado.

#### **2.5. Preparación de extractos metanólicos del yogur**

Los extractos metanólicos se prepararon de acuerdo a Karaaslan *et al.* (2011). 10 g de yogur se mezclaron con 20 mL de metanol acidificado a pH 2 con HCl. La mezcla se dejó una noche a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm 20 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual se almacenó a -20°C hasta su uso. Los extractos metanólicos se utilizaron para los ensayos de actividad antioxidante y fenoles totales.

## **2.6. Determinación de compuestos fenólicos**

El contenido de compuestos fenólicos totales en las muestras de yogur se determinó de acuerdo a Shori y Baba (2011). Los extractos metanólicos de yogur (1 mL) se mezclaron con agua destilada (5 mL) en tubos. Después se añadió 0.5 mL de Folin-Ciocalteu (Sigma-aldrich®, EUA) al 50% v/v y se agitó vigorosamente y se dejó reaccionar durante 5 minutos. Finalmente se adicionó 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 5% a cada muestra y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 60 minutos. La absorbancia fue medida a 725 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Scientific). Para la curva de calibración se utilizó ácido gálico (Fermont®, México) de 20 a 100 µg mL<sup>-1</sup>. Los resultados se expresaron en µg de ácido gálico por gramo de muestra. Los análisis se realizaron por triplicado.

## **2.7. Determinación de actividad antioxidante por el ensayo DPPH**

La actividad antioxidante de las muestras de yogur se determinó mediante el método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo) descrito por Blois (1958) y Karaaslan *et al.* (2011). Se preparó una solución DPPH (Aldrich®, Alemania) 0.1 mM en etanol, a 2.9 mL de esta solución se añadieron 0.1 mL de extracto metanólico de yogur. La absorbancia se midió a 517 nm en el espectrómetro (Genesys 10S UV-visible Thermo Scientific), después de 30 minutos de iniciada la reacción a temperatura ambiente. Para la curva de calibración se utilizó trolox (Aldrich®, Rusia). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del radical DPPH y µM trolox/g. Se calcularon con la siguiente fórmula: % Inhibición =  $((A_0 - A_t) / A_0) \times 100$ , donde A<sub>0</sub> es la absorbancia del control (sin extracto) y A<sub>t</sub> la absorbancia de la muestra. Los análisis se realizaron por triplicado.

## **2.8. Determinación de actividad antioxidante por el ensayo ABTS**

La capacidad inhibitoria del radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) se determinó de acuerdo al método de Re *et al.* (1999) y Da Silva *et al.* (2013). El

radical fue generado usando 440  $\mu\text{L}$  de persulfato de potasio (J.T. Baker®, EUA) 140 mM. La solución fue diluida en etanol hasta obtener una absorbancia de  $0.70\pm 0.02$  a 734 nm. 2300  $\mu\text{L}$  de ABTS (Sigma®, Canadá) se mezclaron con 30  $\mu\text{L}$  de extracto metánolico de las muestras de yogur y la absorbancia se midió después de 6 minutos a 734 nm. Para la curva de calibración se utilizó trolox (Aldrich®, Rusia). Los análisis se realizaron por triplicado.

## **2.9. Análisis microbiológicos del yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana***

Los análisis microbiológicos se realizaron en los días 1 y 14 siguiendo los procedimientos descritos por las Normas Oficiales Mexicanas para el conteo de microorganismos.

Para la determinación de *Salmonella* se tomaron 25 g de muestra y se mezclaron con 225 mL de caldo lactosado (BD Bioxon®, México) estéril y se incubó a  $35\pm 2$  °C durante 24 horas. Para el enriquecimiento selectivo se utilizó caldo tetrionato (BD Bioxon®, México) y caldo selenito cistina (Difco™, E.U.A). El Aislamiento diferencial de *Salmonella* se realizó por estriado en placa en agar sulfito bismuto (BD Bioxon®, México), agar XLD (BD Bioxon®, México) y agar entérico Hektoen (Difco™, E.U.A) y se incubó a  $35\pm 2$  °C durante 24 horas.

Posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas a las colonias con características morfológicas presuntivamente positivas para *Salmonella*.

Los coliformes totales se determinaron en cuenta en placa, se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada (Difco™, E.U.A) estéril, posteriormente se inoculó 1 mL de la dilución en agar bilis rojo violeta (BD Bioxon®, México). Se incubó a 37 °C por 24 horas. Hongos y levaduras se determinaron mediante la inoculación de 1 mL de dilución en agar papa dextrosa (BD Bioxon®, México) y se dejó incubar a 25 °C durante 3, 4 y 5 días. Los análisis se realizaron por duplicado.

## **2.10. Bacterias lácticas en el yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana***

El conteo de bacterias lácticas en yogur se realizó a los días 1, 7 y 14 de almacenamiento a 4°C. Se determinó en cuenta en placa con agar MRS (Difco™, E.U.A). Se realizaron diluciones seriadas en NaCl al 0.8% estéril, posteriormente se inoculó 1 mL de dilución en agar MRS. Se incubó a 37°C durante 24 horas. Los análisis se realizaron por duplicado.

## **2.11. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los resultados obtenidos de las características de pH, acidez, color, actividad antioxidante y análisis microbiológicos del yogur con *P. biflora* y *S. rebaudiana*. Para comparar las medias de los parámetros evaluados se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Se utilizó el Software Statistical Análisis System (SAS® 9.3).

# **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **3.1. pH, acidez titulable y color del yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana***

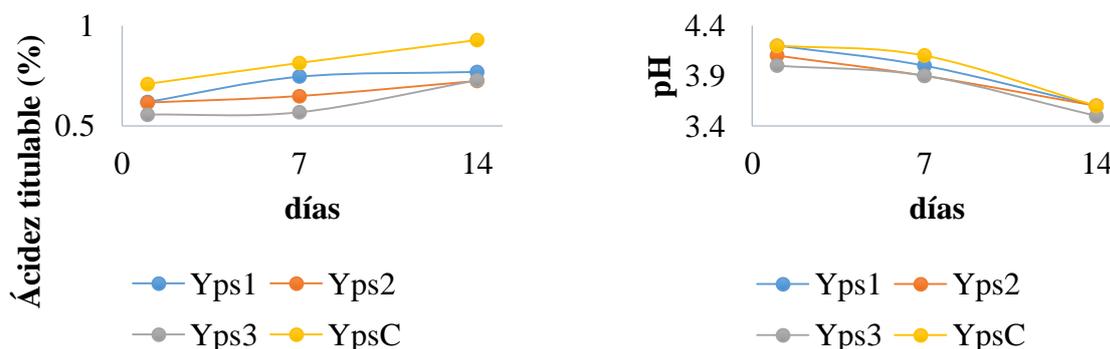
En el Cuadro 14 se observa el comportamiento del pH, % de acidez titulable y color de las diferentes formulaciones de yogur respecto al tiempo de almacenamiento a 4 °C. Se observó un descenso inicial significativo ( $p \leq 0.05$ ) del pH para todas la formulaciones en el día 1, de 4.20 (YpsC) a 4.00 (Yps3) al adicionar Passiflora y Stevia. En el día 7 los cambios de pH fueron significativos. En el día 14 el descenso de pH no fue significativo en las formulaciones las cuales mostraron valores de 3.60 a 3.66 (Figura 5). El pH indica la concentración de H<sup>+</sup>, generados a través de ácidos orgánicos por las bacterias lácticas.

De acuerdo a Shori y Baba (2011) un descenso de pH es resultado probablemente de la acumulación de ácido acético, ácido cítrico, ácido butírico, acetaldehídos, ácido fórmico y ácido láctico, generados por la descomposición de azúcares (lactosa) y proteínas.

La acidez titulable (AT) mostró un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) de 0.71% (YpsC) y 0.56% (Yps3) a 0.93% (YpsC) y 0.73% (Yps3) durante el periodo de almacenamiento. La AT refleja la cantidad de iones hidrógeno presentes en la muestra de leche fermentada, con la excepción de los unidos a los iones alcalinos, y evalúa la capacidad fermentadora de las bacterias lácticas (Geidam *et al.*, 2007). Por lo tanto, la adición de *P. biflora* y *S. rebaudiana* pareció no afectar la fermentación de las bacterias lácticas.

Illupalayam *et al.* (2014); Karaaslan *et al.* (2011) y Shori y Baba (2007), reportaron igualmente un descenso de pH e incremento del ácido láctico durante un periodo de almacenamiento de 7 y 28 días en refrigeración (4°C), utilizando extractos de especias (*Cinnamon*), uva y *Cinnamomun verum*.

En relación a los cambios de color, se observó el descenso significativo ( $p \leq 0.05$ ) de los valores de la luminosidad  $L^*$  y el color  $b^*$ , el cromatismo  $C$  y ángulo de tono  $h^\circ$  en las formulaciones Yps1, Yps2 y Yps3, respecto al control YpsC en el cual se incrementaron durante el almacenamiento (4 °C). Mohammad *et al.* (2014) reportaron cambios de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  en yogur, durante un periodo de almacenamiento de 16 días a 5 °C.



**Figura 5.** Comportamiento del pH y acidez titulable del yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana* durante su almacenamiento a 4°C.

**Cuadro 14.** pH, acidez titulable (AT) y color en formulaciones de yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana*.

Almacenamiento				Color				
(Días)	Formulación	pH	% AT	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>Croma</i>	<i>h</i> °
1	<i>Yps1</i>	4.16 <sup>ab</sup>	0.618±0.05 <sup>b</sup>	90.1±1.1 <sup>b</sup>	0.7±0.7 <sup>c</sup>	5.5±0.2 <sup>b</sup>	5.55±0.2 <sup>d</sup>	82.18±0.4 <sup>b</sup>
	<i>Yps2</i>	4.10 <sup>b</sup>	0.615±0.02 <sup>b</sup>	83.1±0.2 <sup>c</sup>	5.9±0.2 <sup>b</sup>	2.1±0.1 <sup>c</sup>	6.36±0.3 <sup>c</sup>	19.93±0.2 <sup>c</sup>
	<i>Yps3</i>	4.00 <sup>c</sup>	0.555±0.01 <sup>c</sup>	77.1±0.8 <sup>c</sup>	10.5±0.7 <sup>a</sup>	0.6±0.1 <sup>d</sup>	10.55±0.7 <sup>a</sup>	3.60±0.6 <sup>d</sup>
	<i>YpsC</i>	4.20 <sup>a</sup>	0.708±0.05 <sup>a</sup>	93.8±0.5 <sup>a</sup>	-3.3±0.2 <sup>d</sup>	7.6±0.4 <sup>a</sup>	8.37±0.4 <sup>b</sup>	113.4±1.2 <sup>a</sup>
7	<i>Yps1</i>	4.00 <sup>b</sup>	0.744±0.02 <sup>b</sup>	86.2±0.3 <sup>a</sup>	0.6±0.1 <sup>c</sup>	3.8±0.4 <sup>a</sup>	3.89±0.4 <sup>c</sup>	80.48±0.7 <sup>b</sup>
	<i>Yps2</i>	3.93 <sup>bc</sup>	0.648±0.09 <sup>c</sup>	80.7±0.1 <sup>b</sup>	6.0±0.3 <sup>b</sup>	1.5±0.1 <sup>b</sup>	6.21±0.3 <sup>b</sup>	14.40±0.4 <sup>c</sup>
	<i>Yps3</i>	3.90 <sup>c</sup>	0.567±0.02 <sup>d</sup>	74.8±1.4 <sup>c</sup>	10.6±0.1 <sup>a</sup>	0.5±0.9 <sup>b</sup>	10.63±0.1 <sup>a</sup>	2.96±0.5 <sup>d</sup>
	<i>YpsC</i>	4.10 <sup>a</sup>	0.813±0.05 <sup>a</sup>	87.6±1.2 <sup>a</sup>	-2.2±0.2 <sup>d</sup>	4.0±0.6 <sup>a</sup>	4.60±0.6 <sup>c</sup>	118.8±1.8 <sup>a</sup>
14	<i>Yps1</i>	3.60 <sup>a</sup>	0.768±0.01 <sup>b</sup>	90.1±1.1 <sup>b</sup>	0.5±0.2 <sup>c</sup>	2.6±0.8 <sup>b</sup>	2.67±0.8 <sup>d</sup>	78.42±0.7 <sup>b</sup>
	<i>Yps2</i>	3.60 <sup>a</sup>	0.723±0.05 <sup>b</sup>	83.1±0.2 <sup>c</sup>	5.0±0.4 <sup>b</sup>	1.3±0.1 <sup>c</sup>	5.23±0.4 <sup>b</sup>	14.45±0.8 <sup>c</sup>
	<i>Yps3</i>	3.50 <sup>b</sup>	0.726±0.01 <sup>b</sup>	77.1±0.8 <sup>d</sup>	10.5±0.7 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>d</sup>	10.59±0.7 <sup>a</sup>	2.10±0.6 <sup>d</sup>
	<i>YpsC</i>	3.66 <sup>a</sup>	0.927±0.02 <sup>a</sup>	93.8±0.5 <sup>a</sup>	-1.4±0.1 <sup>d</sup>	3.6±0.2 <sup>a</sup>	4.00±0.2 <sup>c</sup>	115.7±1.9 <sup>a</sup>

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

### 3.2. Compuestos fenólicos totales en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana*

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) se muestra en el Cuadro 15. Se observó un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) de CFT en el día 1,  $27.0 \pm 0.83$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g (YpsC) a  $83.0 \pm 0.83$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g (Yps3) al adicionar *P. biflora* y *S. rebaudiana*. Durante el tiempo de almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  hubo un incremento significativo de CFT en las formulaciones YpsC (de  $27.08 \pm 0.83$  a  $32.16 \pm 0.88$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g) y Yps1 (de  $40.73 \pm 0.39$  a  $42.64 \pm 0.22$   $\mu\text{g}$  ácido gálico/g).

El incremento de CFT puede relacionarse con el contenido ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, vitaminas A y C en las especies de *Passiflora* (Costa y Cavalcante, 2010). Así mismo, las diferencias entre el incremento o descenso de CFT en las formulaciones, puede explicarse por la formación o degradación de fenoles poliméricos por acción de las bacterias lácticas (Dalling, 1986). El estudio realizado Shori y Baba (2011) mostró igualmente un incremento en los compuestos fenólicos en bioyogures de *C. verum* (canela) al día 14 de almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  y un descenso de CFT al día 21.

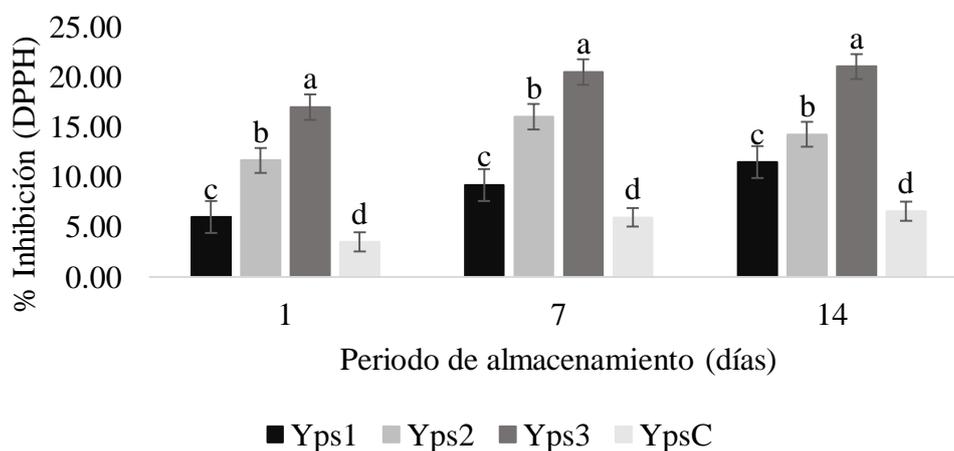
**Cuadro 15.** Actividad antioxidante en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana*.

Almacenamiento (Días)	Formulación	Fenoles totales ( $\mu\text{g}$ ácido gálico/g)	DPPH ( $\mu\text{M}$ trolox/g)	ABTS ( $\mu\text{M}$ trolox/g)
1	<i>Yps1</i>	40.73 $\pm$ 0.39 <sup>c</sup>	136.0 $\pm$ 3.6 <sup>c</sup>	292.6 $\pm$ 13.3 <sup>c</sup>
	<i>Yps2</i>	63.78 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	280.7 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>	532.6 $\pm$ 23.9 <sup>b</sup>
	<i>Yps3</i>	83.08 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	416.0 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	712.5 $\pm$ 24.3 <sup>a</sup>
	<i>YpsC</i>	27.08 $\pm$ 0.83 <sup>d</sup>	73.24 $\pm$ 1.3 <sup>d</sup>	134.8 $\pm$ 3.84 <sup>d</sup>
7	<i>Yps1</i>	40.61 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	224.9 $\pm$ 12.0 <sup>c</sup>	428.8 $\pm$ 42.8 <sup>c</sup>
	<i>Yps2</i>	59.21 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	396.9 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	637.7 $\pm$ 34.2 <sup>b</sup>
	<i>Yps3</i>	76.54 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	523.8 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	809.5 $\pm$ 33.6 <sup>a</sup>
	<i>YpsC</i>	28.73 $\pm$ 0.85 <sup>d</sup>	142.3 $\pm$ 12.3 <sup>d</sup>	233.3 $\pm$ 12.1 <sup>d</sup>
14	<i>Yps1</i>	42.64 $\pm$ 0.22 <sup>c</sup>	305.5 $\pm$ 5.4 <sup>c</sup>	478.5 $\pm$ 16.1 <sup>c</sup>
	<i>Yps2</i>	60.92 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	392.3 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	721.3 $\pm$ 15.4 <sup>b</sup>
	<i>Yps3</i>	76.10 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	585.1 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	954.1 $\pm$ 23.0 <sup>a</sup>
	<i>YpsC</i>	32.16 $\pm$ 0.88 <sup>d</sup>	153.9 $\pm$ 15.1 <sup>d</sup>	301.2 $\pm$ 14.1 <sup>d</sup>

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

### 3.3. Actividad antioxidante por el ensayo DPPH en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana*

La actividad antioxidante  $\mu\text{M}$  trolox/g (DPPH) y porcentaje de inhibición en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana* se muestran en el Cuadro 15 y la Figura 6. Se observó un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) de  $73.8 \pm 1.3$  (YpsC) a  $416.7 \pm 4.9$  (Yps3)  $\mu\text{M}$  trolox/g al día 1. El porcentaje de inhibición osciló entre  $3.4 \pm 0.05\%$  (YpsC) y  $16.9 \pm 0.19\%$  (Yps3). La adición de *P. biflora* y *S. rebaudiana* aumentó la actividad antioxidante en todas las formulaciones. Durante el almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$  se incrementó la actividad antioxidante ( $p \leq 0.05$ ). Dicho aumento puede deberse a diferentes reacciones de oxidación, hidrólisis de proteínas y formación de ácido orgánico (ácido láctico) que pudieron influir en la actividad antioxidante a través de múltiples mecanismos de reacción (Sah *et al.*, 2015). Así mismo, durante el almacenamiento pudieron formarse péptidos que actúan como potentes compuestos antioxidantes.



**Figura 6.** Porcentaje de inhibición del radical DPPH en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana*.

De acuerdo a Li *et al.* (2013), durante el almacenamiento puede haber formación de péptidos antioxidantes, liberados de la hidrólisis de las proteínas de la leche (caseína): Tyr-Val-Pro-Glu-

Pro-Phe, Phe-Pro-Tyr-Cys-Ala-Pro, Phe-Gly-Gly-Met-Ala-His, Val-Tyr-Pro-Phe y Tyr-Pro-Pro-Tyr-Glu-Thr-Tyr. Shori y Baba (2011) y Sah *et al.* (2015) reportaron igualmente un incremento de la actividad antioxidante en bioyogures de *C. verum* (canela) adicionados con cáscara de piña, después de 21 y 28 días de almacenamiento a 4°C.

### **3.4. Actividad antioxidante por el ensayo ABTS en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana***

La actividad antioxidante ABTS en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana* se muestra en el Cuadro 15. Se observó un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) al día 1 en todas las formulaciones respecto al control (YpsC), los valores van de  $134.8 \pm 3.84$  a  $712.5 \pm 24.3$   $\mu\text{M}$  tralox/g, siendo la formulación Yps3 la que presentó mayor actividad antioxidante. Durante el almacenamiento al día 14, la actividad antioxidante incrementó considerablemente en todas las formulaciones. Shori y Baba (2011) reportaron el incremento de la actividad antioxidante en bioyogures a base de canela (*C. verum*) hasta el día 14, después del día 21 de evaluación cuantificaron un descenso no significativo de la actividad antioxidante.

El ensayo ABTS presentó una mayor cuantificación de la actividad antioxidante comparado con el DPPH. De acuerdo Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2007), al comparar los ensayos ABTS y DPPH, observaron que el tiempo de reacción fue más bajo para el ABTS que para el DPPH, esto muestra que los antioxidantes reaccionan más rápido con el catión formado a partir del ABTS, obteniendo mayores valores de actividad antioxidante.

**3.5. Recuento de coliformes totales, hongos y levaduras, *Salmonella* spp. y bacterias lácticas en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana***

**Cuadro 16.** Calidad microbiológica del yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana* después de 14 días de almacenamiento a 4°C (UFC/g).

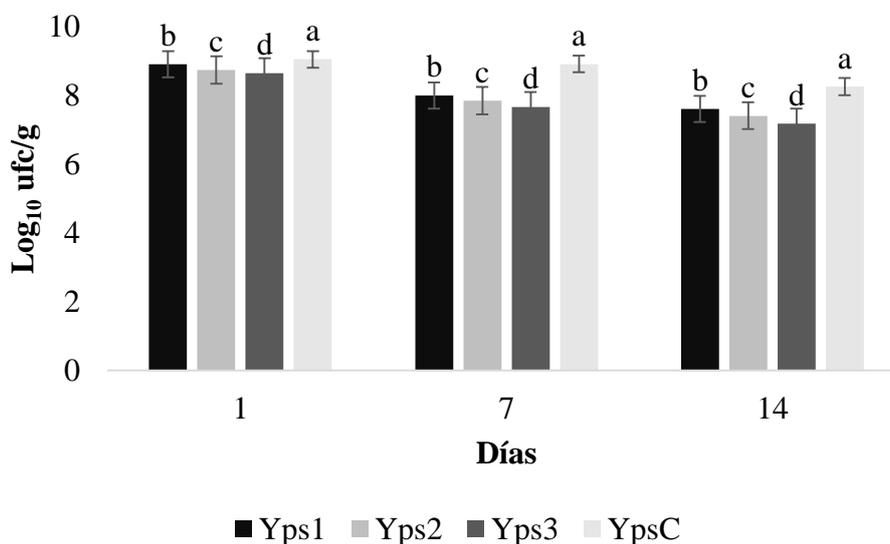
		Coliformes totales	Hongos y levaduras	<i>Salmonella</i> ssp*
Día 1	<i>YPS1</i>	0	0	Ausencia
	<i>YPS2</i>	0	0	Ausencia
	<i>YPS3</i>	0	0	Ausencia
	<i>YPS4</i>	0	0	Ausencia
Día 14	<i>YPS1</i>	0	0	Ausencia
	<i>YPS2</i>	0	0	Ausencia
	<i>YPS3</i>	0	0	Ausencia
	<i>YPS4</i>	0	0	Ausencia

\*Ausencia en 25 g. Los resultados son expresados como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Los resultados microbiológicos presentados en el Cuadro 16 muestran la ausencia de coliformes totales, hongos y levaduras, y ausencia de *Salmonella* ssp. Las buenas prácticas de manufactura garantizan la calidad e inocuidad de todo alimento. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002 que especifica las características fisicoquímicas y microbiológicas en la elaboración de yogur (levaduras  $10^4$  ufc/g, coliformes totales  $10^4$  ufc/g y *Salmonella* ssp. ausente/25g), el producto elaborado fue inocuo.

La Figura 7 muestra los resultados del recuento de bacterias lácticas en  $\log_{10}$  ufc/g. La formulación control YpsC presentó el mayor conteo (ufc/g) respecto a la formulación Yps3 (mayor concentración de *P. biflora* y *S. rebaudiana*), las diferencias fueron significativas ( $p \leq 0.05$ ). Durante el almacenamiento se observó un descenso de las bacterias lácticas en todas las formulaciones. De acuerdo a la NOM-181-SCFI-2010, especificaciones microbiológicas en la

elaboración de yogur, éste debe presentar mínimo  $1 \times 10^7$  ufc/g para considerarse alimento probiótico. Este yogur se ubicó en dicha especificación, con valores entre 9.04 y 7.17  $\log_{10}$  ufc/g.



**Figura 7.** Recuento de bacterias lácticas en yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana* después de 14 días de almacenamiento a 4°C.

Las medias con letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4. CONCLUSIONES

Las características de pH, acidez y color de yogur con diferentes concentraciones de *P. biflora* y *S. rebaudiana* mostraron diferencias significativas. Durante el periodo de almacenamiento se observó un descenso de pH e incremento de la acidez titulable, que no afectaron la calidad del producto.

Este yogur mostró un importante potencial antioxidante. La formulación Yps3 (mayor concentración de *P. biflora*, edulcorado (6%) con *S. rebaudiana* presentó la mayor actividad antioxidante DPPH y ABTS y mayor contenido de compuestos fenólicos totales respecto al control YpsC.

La actividad antioxidante en el yogur adicionado aumentó y se mantuvo hasta el día 14 de almacenamiento, debido a las propiedades antioxidantes del fruto de *P. biflora* y de *S. rebaudiana* y a la formación de ácidos orgánicos y péptidos durante el almacenamiento.

Las poblaciones bacterianas presentaron valores superiores a las indicadas en la Norma Oficial Mexicana.

Este yogur adicionado con *P. biflora* y *S. rebaudiana* es una opción de agregación de valor y diversificación productiva para los productores de leche en la región y aprovechamiento de los productos no tradicionales con alto potencial alimenticio.

## 5. LITERATURA CITADA

AOAC, 1995. Official methods of analysis international, Association of Official Analytical Chemists: (16th ed.) Washington, DC..

Buriti, F., Freitas, S., Egipto, A., M.O dos Santos, K., 2014. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages. Food Science and Technology, Volumen 59, pp. 196-203.

Chougrani, F., Cheriguene, A., Bensoltane, A., 2009. Sensorial and Physico-Chemical characteristics of yogurt manufactured with Ewe's and Skim milk. World Journal of Dairy and Food Science, 4(2), pp. 136-140.

Cook, M., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutory, V., 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. Journal of Controlled Release, Volumen 162, pp. 56-67.

Costa, M. y Cavalcante, H., 2010. Desarrollo tecnológico para el uso de las *pasifloras* silvestres como alimentos funcionales y medicinales. s.l., Memorias del Primer Congreso Latinoamericano de Passiflora.

Crispín, G., Lobato, C., Espinosa, H., Alvarez, J. 2014. Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. LWT-Food Science and Technology, pp. 1-7.

- Da Silva, J., C. Betim, T. Colomeu, A. G. Batista, L. Meletti, J. Rizzato, S. Bogusz, M. Fontes, F. Reyes, F. Augusto, M. Maróstica, R. Lima, 2013. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. Food research International, Volumen 53, pp. 882-890.
- Dalling, M.J., 1986. Plant Proteolytic Enzymes. CRC Press, Boca Raton, FL, Vols. I y II.
- Geidam, Y.A., Ambali, A.G., Onyelili, A., 2007. Phytochemical screening and antibacterial properties of organic solvent fraction of *Psidium guajava* aqueous leaf extract. Int. J. Pharmacol, Volumen 3, pp. 68–73.
- Illupapalayam, V., Smith, S., Gamlath, S., 2014. Consumer acceptability and antioxidant potencial of probiotic-yogurt with species. Food Science and Technology, Volumen 55, pp. 55-262.
- Karaaslan, M., Ozden, M., Vardi, H., Turkoglu, H., 2011. Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. Food Science and Technology, Volumen 44, pp. 1065-1072.
- Kujur, R. y otros, 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia Rebaudiana* in alloxan-induced diabetiis rats. Pharmacognosy Journal, 4(2), pp. 27-32.
- Lemus, M. R., A. Vega G., L. Zura B. y K. Ah H., 2011. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry, Volumen 132, pp. 1121-1132.
- Lopéz-Vargas, J., Fernández-Lopéz, J., Pérez-Álvarez, J. y Viuda-Martos, M., 2013. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edullis* var. flavicarpa) co-products. Food Research International, Volumen 51, pp. 756-763.
- Ming, Y., Li, R., Yanna, W., Yan, W., Yong, L. 2013. Quality characteristics and antioxidant activity of hickory-black soybean yogurt. Food Science and Technology, Volumen 51, pp. 314-318.
- Mohapatra, D., Mishra, S., Sutar, N., 2010. Banana and its by-coproduct utilization: and overview. Journal of Scientific and Industrial Research, Volumen 69, pp. 323-329.
- MS., B., 1958. Antioxidant determinations by the use of a estable free radical. Nature, 26(1), pp. 199-200.
- Narayanan, P., Chinnasamy, B., Jin, L. & Clark, S., 2014. Use of just-about-right scales and penalty analysis to determine appropriate concentrations of stevia sweeteners for vanilla yogurt. J. Dairy Sci., Volumen 97, pp. 3262-3272.

- Nawirska, A. y Kwasniewska, M., 2005. Dietary fibre fractions from fruit and vegetables processing waste. *Food Chemistry*, Volumen 91, pp. 221-225.
- Pérez, J. J. y C. Saura F., 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, pp. 1050-1160.
- Ramírez, A. y Delahaye, P. d. l., 2009. Funtional properties of starches with high dietetic fiber content obtained from pineapples, guava and soursop.. *Interciencia*, Volumen 34, pp. 293-298.
- Ramirez-Santiago, L. y otros, 2010. Enrichment of stirred yogurt with soluble dietary fiber from *Pachyrhizus erosus* L. Urban: Effect on syneresis, microstructure and rheological properties. *Journal of Food Engineering*, Volumen 101, pp. 229-235.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, y C. Rice E., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, Volumen 26, pp. 1231-1237.
- Sah, B. N. P., T. Vasiljevic, S. McKechnie, O. N. Donkor. 2015. Identification of anticancer peptides from bovine milk proteins and their potential roles in management of cancer: A critical review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* Volumen 14, pp. 123–138.
- Salgado, J. y otros, 2010. Effects of different concentrations of passion fruit peel (*passiflora edulis*) on the glicemic control in diabetic mice. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, Volumen 30, pp. 784-789.
- Shori, A. y Baba, A., 2011. *Cinnamomum verum* improved the funtional properties of bioyogurts made from camel and cow milks. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, Volumen 10, pp. 101-107.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., Thaker, V., 2011. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, pp. 287-290.
- Varnam, A. H. y Sutherland, J. P., 1995. *Leche y Productos Lácteos*. Primera ed. España: Atribia, S.A..

## V. CONCLUSIONES GENERALES

Las características físicas hacen del fruto *P. biflora* el más pequeño del género *Passiflora*, el más frágil al daño mecánico dadas las características de la cáscara. Es menos ácido y su contenido de azúcares es bajo. Los cambios de color en su estado de madurez van de verde hasta púrpura intenso. El potencial antioxidante es mayor respecto a otras especies estudiadas del género *Passiflora*. En este trabajo de investigación se evaluaron diferentes solventes como medios de extracción. Los extractos acuosos presentaron mayor actividad antioxidante. El ensayo ABTS mostró mejor cuantificación de compuestos antioxidantes respecto al ensayo DPPH. Las características físicas, químicas y antioxidantes del fruto, lo hacen una alternativa potencial para la elaboración de productos alimenticios.

Las hojas de *S. rebaudiana* actualmente se utiliza como sustituto de la sacarosa, por personas que quieren controlar su ingesta calórica o para el tratamiento de diabetes mellitus, la obesidad, la hipertensión y prevención de caries, dichos estudios han demostrado que los componentes de esta planta tienen beneficios terapéuticos. Estudios toxicológicos muestran que no tiene efectos cancerígenos. Se evaluó la actividad antioxidante de las hojas de *S. rebaudiana* con diferentes solventes. La combinación del agua-metanol (70:30) y agua-acetona (70:30) presentó la mayor actividad antioxidante DPPH, ABTS y compuestos fenólicos totales. Las características antioxidantes y beneficios de sus esteviósidos hacen de la estevia una alternativa para el tratamiento de enfermedades y su uso en la elaboración de productos alimenticios bajos en calorías.

El yogur aumentó la actividad antioxidante con la adición de *P. biflora* y *S. rebaudiana*. Durante el periodo de almacenamiento se observó el descenso del pH e incremento de la acidez titulable. Los cambios de pH, acidez y color no afectaron la calidad del producto. La actividad antioxidante se mantuvo durante su almacenamiento a 4°C durante 14 días. El yogur es una

alternativa para diversificación de productos lácteos y aprovechamiento de agro-productos no tradicionales con potencial antioxidante de la región.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abou-Arab, A., Abou-Arab, A., Abu-Salem, M. F. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. African Journal of Food Science, Volumen 4, pp. 269–281.
- Acevedo, B., Montiel, M. & Avanza, J., 2004. Estudio cinético de la degradación de la actividad antioxidante hidrosoluble de jugos cítricos por tratamiento térmico. FACENA, Volumen 20, pp. 91-95.
- Badui, S. D., 2006. Química de Alimentos. cuarta ed. México: Pearson Addison Wesley.
- Barriocanal, L. y otros, 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans, a pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and type 2 diabetics. Regulatory Toxicology and Pharmacology, Volumen 51, pp. 37-41.
- Bendini, A., Cerretani, L., Pozzolante, T. y Toschi, F., 2006. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora* ssp. Extracts. European Food Research and Technology, Volumen 223, pp. 102-109.
- Blande, J. y Telmer, P., 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry, Volumen 68, pp. 1855-1863.
- Calderón, G. y McDougal, J. M., 2004. Flora del bajío y regiones adyacentes, s.l.: s.n.
- Carvajal, L. M., S. Turbay, B. Rojano, L. Álvarez, S. Restrepo, J. Álvarez, K. Bonilla, C. Ochoa, N. Sánchez, 2011. Algunas especies de passiflora y su capacidad antioxidante. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 16(4), pp. 354-363.
- Chatsudthipong, V. y Mauanprasat, C., 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness.. Pharmacology and Therapeutics, Volumen 121, pp. 41-54.
- Chirinos, R.; R. Pedreschi, H. Rogez, Y. Larondelle, D. Campos, 2013. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. Industrial Crops and Products, Volumen 47, pp. 145-152.

- Costa, M. y Cavalcante, H., 2010. Desarrollo tecnológico para el uso de las *pasifloras* silvestres como alimentos funcionales y medicinales. s.l., Memorias del Primer Congreso Latinoamericano de Passiflora.
- Da Silva, J., C. Betim, T. Colomeu, A. G. Batista, L. Meletti, J. Rizzato, S. Bogusz, M. Fontes, F. Reyes, F. Augusto, M. Maróstica, R. Lima, 2013. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. Food research International, Volumen 53, pp. 882-890.
- Dacome, A. y otros, 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods.. Process Biochemistry, Volumen 40, pp. 3587-3594.
- De la Cruz, J., Vargas, M., del Angel, O., García, H., 2010. Estudio de las características sensoriales, fisicoquímicas y fisiológicas en fresco y durante el almacenamiento refrigerado de maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa. Degener), para tres cultivares de Veracruz México. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 11(2), pp. 130-142.
- Dhawan, K., Dhawan, S., Sharma, A., 2004. Passiflora: a review update. Journal of Ethnopharmacology, Volumen 84, pp. 1-23.
- García, J. M., Casado, G. M., García, J., 2013. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. Nutrición Hospitalaria, 28(4), pp. 17-31.
- García, M., De Pascual, S., Santos, C. & Rivas, J., 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruit. Food Chemistry, Volumen 84, pp. 13-18.
- Geuns, J. M., 2003. Molecules of interest: Stevioside. Phytochemistry, Volumen 64, pp. 913-921.
- González, A., 1996. Biología floral e caracterização físico-química dos frutos de dois accesos de *Passiflora cincinnata* Mast. nas condições de Jaboticabal, Brasil: s.n.
- Hinestroza, L., Rios, A., Mosquera, L., Lopéz, A., 2011. Estabilidad de yogurt con *lactobacillus acidophilus* encapsulado. Colombia, II Simposio Internacional y II Nacional Agroalimentario.
- Jairo, L., F, J., P, J., V, M., 2013. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edullis* var. flavicarpa) co-products. Food Research International, Volumen 51, pp. 756-763.

- Jarma, A., Combalt., Cleves, J., 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agronomía Colombiana*, Volumen 28, pp. 199-208.
- Kim, I., Yang, M., Lee, O., Kang, S. (2011). The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT – Food Science and Technology*, Volumen 44, pp. 1328–1332.
- Kujur, R. y otros, 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia Rebaudiana* in alloxan-induced diabetis rats. *Pharmacognosy Journal*, 4(2), pp. 27-32.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K., 2011. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, Volumen 132, pp. 1121-1132.
- López-Vargas, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., Viuda-Martos, M., 2013. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*, Volumen 51, pp. 756-763.
- Luquet, F., 1991. *Leche y Productos Lácteos*. Primera ed. España: Acribia S.A .
- Marroquín, M., Curz, S., Cáceres, A., 2012. Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. *Acta Hort.* 964, ISHS, pp. 93-98.
- Mendizábal, L., 2005. Contribución al género *Passiflora* L. (Passifloraceae) en la sierra norte de Oaxaca, México, s.l.: Tesis; Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mishara, P., Singh, R., Kumar, U., Prakash, V., 2010. *Stevia rebaudiana*: A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*, Volumen 5, pp. 62-74.
- Muñoz, A., Ramos, D., Alvarado, C. & Castañeda, B., 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quim. Perú*, 73(3), pp. 142-149.
- Pérez-Jiménez, J. y Saura-Calixto, F., 2007. Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas. V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones, pp. 1050-1160.
- Phansawan, B. y Pounghangpho, S., 2007. Antioxidant capacities of *Pueraria mirifica*, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Curcuma longa* Linn., *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees and

- Cassia alata Linn for the development of dietary supplement.. Kasetsart Journal: Natural Science, Volumen 41, pp. 548-554.
- Pineda, D. y otros, 1999. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. Revista Cubana, 13(2), pp. 104-111.
- Pól, J., Hahnová, B. y Hyotylainen, 2007. Characterisation of Stevia Rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography, Volumen 1150, pp. 85-92.
- Ruiz, J., Mongue, Y., Matus, Á., Segura, M., 2015. Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. Nutrición Hospitalaria, 31(3), pp. 1163-1170.
- Saravanan, S. y Parimelazhagan, T., 2014. In vitro antioxidant, microbial and anti-diabetic properties of polyphenols of *Passiflora ligularis* Juss. fruit pulp. Food Science and Human Wellness, Volumen 3, pp. 56-64.
- Schwentesius, R., C.M.A, G., T.L, G., 1995. La producción y el mercado mundial del maracuyá, México: Centro de Investigaciones económicas, sociales y tecnológicas de la agroindustria y agricultura mundial.
- Shukla, S., Mehta, A. & Bajpai, V., 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. Experimental and Toxicologic Pathology, Volumen 64, pp. 807-811.
- SIAP, 2014. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación, s.l.: s.n.
- Singh, K., Kallali, B., Kumar, A., Thaker, V., 2011. Probiotics: A review. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, pp. 287-290.
- Szefer, P. y Nriagu, J., 2007. Mineral components in foods. New York; CRC Press, p. 10.
- Takahashi, M. y otros, 2001. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. Antiviral Research, Volumen 41, pp. 15-24.
- Tamine, A., 2005. Dairy Products. En: Dairy Science and Technology. United of Kingdom: s.n., pp. 1-2, 139-159.
- Varnam, A. H. y Sutherland, J. P., 1995. Leche y Productos Lácteos. Primera ed. España: Aribia, S.A..
- Wang, Y., Ren, D., Zhou, F., 1997. Research on Nutrient in Stevioside Food.. China Journal Of Modern Medicine, pp. 03-035.
- Yadav, A., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P., 2011. A review on the improvement of Stevia rabaudiana ( Bertoni). Canadian Journal of Plant Science, Volumen 28, pp. 1-27.

