



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

POSGRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL
DEL AGUA

**PROCESO DE FERMENTACIÓN Y APROVECHAMIENTO
DE ANTOCIANINAS DE FRUTOS DE *Ardisia compressa*
Kunt**

TESIS

**Que como requisito parcial
para obtener el grado de:**

DOCTOR EN INGENIERIA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA

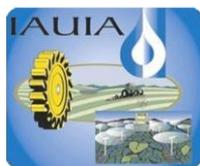
Presenta:

GUILLERMINA HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ



Bajo la supervisión de: SALVADOR VALLE GUADARRAMA, DR.

APROBADA



Chapingo, Estado de México, 15 de noviembre de 2023

**PROCESO DE FERMENTACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE
ANTOCIANINAS DE FRUTOS DE *Ardisia compressa* Kunt**

Tesis realizada por **Guillermina Hernández Rodríguez** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

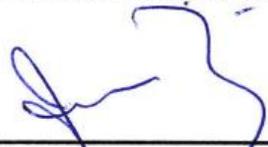
DOCTOR EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA



DIRECTOR: DR. SALVADOR VALLE GUADARRAMA



ASESOR: DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ



ASESOR: DR. IRINEO LORENZO LÓPEZ CRUZ



ASESOR: DR. RICARDO DOMÍNGUEZ PUERTO



LECTOR EXTERNO: DR. VALAUR EKBALAM MÁRQUEZ BAÑOS

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
AGRADECIMIENTOS	xi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xii
RESUMEN GENERAL	xiii
PROCESO DE FERMENTACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE ANTOCIANINAS DE FRUTOS DE <i>Ardisia compressa</i>	xiii
GENERAL ABSTRACT.....	xiv
FERMENTATION PROCESS AND USE OF ANTHOCYANINS FROM <i>Ardisia compressa</i> FRUITS	xiv
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Literatura citada	9
2. REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 Frutos rojos con características para vinificación	18
2.2 Compuestos que proporcionan el color y sabor en el vino tinto.....	19
2.2.1 Antocianinas.....	19
2.2.2 Proantocianidinas.....	21
2.2.3 Pigmentos derivados.....	21
2.3 Factores que influyen en la fermentación alcohólica	22
2.3.1 Temperatura de fermentación	22
2.3.2 Efecto del pH durante la fermentación	23
2.3.3 Concentración de etanol	24
2.4 Modelación matemática del proceso de fermentación y la actividad antioxidante en la fabricación de vino.....	25
2.5 Aplicaciones y oportunidades de mejora en el modelado.....	33
2.6 Literatura citada	35

3. SEPARACIÓN DE ANTOCIANINAS MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES: UN ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO	42
Resumen	42
Abstract	43
3.1 Introducción	44
3.2 Materiales y métodos.....	46
3.3 Resultados y discusión	48
3.3.1 Análisis general	48
3.3.2 Clúster 1. Desarrollo de los ATPS para la purificación, conservación y estabilidad de antocianinas	54
3.3.3 Clúster 2. Extracción de pigmentos de antocianinas mediante ATPS alcohol-sal.	56
3.3.4 Clúster 3. Ósmosis aplicada en la purificación de extractos de antocianinas obtenidos con ATPS.....	58
3.3.5 Clúster 4. ATPS asistidos con ultrasonido para la extracción de antocianinas	61
3.3.6 Clúster 5. ATPS asistidos con microondas para la extracción de antocianinas	62
3.3.7 Clúster 6. Capacidad antioxidante de los metabolitos separados aplicando la técnica de ATPS.....	64
3.3.8 Enfoques actuales y áreas de oportunidad en la investigación acuosa en dos fases orientada a la separación y purificación de antocianinas	65
3.4 Conclusiones	66
3.5 Literatura citada	66
4. FERMENTED BEVERAGE OF <i>ARDISIA COMPRESSA</i> FRUITS BASED ON COMMERCIAL AND NATIVE YEASTS: EVALUATION OF KINETIC CHANGES	75
Abstract:	75
Resumen:	76
4.1 Introduction	77
4.2 Materials and methods	78
4.2.1 <i>Plant material</i>	78
4.2.2 <i>Fermentation process</i>	79
4.2.3 <i>Response variables</i>	79

4.2.4. <i>Mathematical modeling of the fermentation process</i>	82
4.2.5. <i>Data analysis</i>	84
4. 3 Results and discussion	85
4.3.1. <i>Plant material</i>	85
4.3.2. <i>Must and fermented products</i>	86
4.3.3 <i>Kinetics of changes in the fermentation process</i>	88
4.4 Conclusions	96
4.5 Acknowledgment	98
4.6 References	98
5. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE <i>Ardisia compressa</i> SEPARADOS CON SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS CONTROLADOS POR pH	106
Resumen	106
Abstract	107
5.1 Introducción	108
5.2 Materiales y métodos.....	110
5.2.1 Material vegetal	110
5.2.2 Diagrama binodal de fases.....	110
5.2.3 Sistemas acuosos bifásicos: pH y relación de volúmenes	111
5.2.4 Separación y concentración de antocianinas y azúcares	112
5.2.5 Ensayos de pigmentación	113
5.2.6 Cuantificación de concentraciones	114
5.2.7 Análisis mediante FTIR	115
5.2.8 Análisis de datos	115
5.3 Resultados y discusión	115
5.3.1 Material vegetal	115
5.3.2 Diagrama binodal de fases.....	116
5.3.3 Sistemas acuosos bifásicos	117
5.3.4 Separación de compuestos bioactivos	122
5.3.5 Separación de azúcares.....	125
5.3.5 Análisis por FTIR.....	127
5.3.6 Ensayos de pigmentación	129
5.4 Conclusiones	132

5.5 Literatura citada	132
6. CONCLUSIONES GENERALES	141

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de etanol y antocianinas de vinos producidos a partir de frutos rojos.....	19
Cuadro 2. Clasificación de los principales trabajos referentes a purificación de antocianinas utilizando extracción acuosa en dos fases de acuerdo con el número de citas y tipo de acceso.	49
Cuadro 3. Principales revistas que han publicado sobre extracción acuosa en dos fases relacionadas con antocianinas.....	50
Cuadro 6. Concentraciones en porcentaje (%) de citrato trisódico (Na_3Cit), ácido cítrico (HCit) y acetona, correspondientes a las condiciones del sistema acuoso en dos fases identificadas en el diagrama de fases binodal.....	119
Cuadro 7. Análisis de varianza y comparación de medias de parámetros de separación en sistemas acuosos bifásicos.....	120

LISTA DE TABLAS

Table 4. Physicochemical and phytochemical characteristics of <i>Ardisia compressa</i> fruits.	86
Table 5. Phytochemical characteristics of the fermented product obtained with <i>Ardisia compressa</i> fruits using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and native yeast...	86

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Estructura química de las principales antocianidinas (A) y antocianinas (en la forma de antocianidina-3-O-glucosido) (B) presentes en las plantas..... 20
- Fig. 2. Evolución de documentos publicados sobre extracción acuosa en dos fases relacionada con antocianinas. 48
- Fig. 3. País de correspondencia del primer autor con mayores publicaciones sobre extracción acuosa en dos fases relacionadas con antocianinas. 51
- Fig. 4 Distribución del número de autores por publicación. AA: número de autores por artículo. 52
- Fig. 5. Diagrama de densidad de red de coautorías relacionadas con el año de publicación. 53
- Fig. 6. Mapa bibliométrico de la red de coocurrencias de las palabras clave indexadas en publicaciones sobre extracción acuosa en dos fases relacionadas con antocianinas. 53
- Fig. 7.** Changes in alcohol (A) and sugar (B) contents during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* (SC) and native yeast (NY). 89
- Fig. 8.** Variation of total and active yeast during the fermentation process..... 90
- Fig. 9.** Changes in the content of total soluble phenols (A) and total anthocyanins (B) during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* and native yeast. 91
- Fig. 10.** Changes in color index (CI) (A), hue (B), percentage of red color (C), and percentage of yellow color (D) during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* and native yeast. 94
- Fig. 11.** Modification of the antioxidant capacity evaluated with the FRAP (A) and ABTS (B) assays during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* and native yeast. 95

Fig. 12. Datos binodales experimentales y ajustados (A) y diagrama binodal de fases (B) de la mezcla formada por citrato trisódico (Na_3Cit), ácido cítrico y acetona. 117

Fig. 13. A: variación de la relación de volúmenes (V_r) en función del disolvente usado y la longitud de la línea de operación. B: variación del pH en función del disolvente usado, la longitud de la línea de operación y la fase en el sistema. 123

Fig. 14. Concentración y rendimientos de separación de antocianinas (A, B) y azúcares (C, D) en sistemas acuosos bifásicos preparados con citrato de sodio, ácido cítrico y acetona..... 126

Fig. 15. Espectro de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) correspondiente a acetona, agua, jugo de *A. compressa* y extracto obtenido de fase superior de los sistemas acuosos bifásicos. 129

Fig. 16. Variación de la luminosidad (A, B), ángulo de tono (C, D) y cromaticidad (E, F) durante ensayos de pigmentación (izquierda) estabilidad de color durante almacenamientos en condiciones conservativas y deteriorativas (derecha)..... 130

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia Tecnología y Humanidades por el financiamiento que me otorgaron a través de la beca de estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Chapingo y en particular al Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su programa de estudios.

Al laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola y a los compañeros que lo integran por brindarme el apoyo y confianza para usar el equipo e instalaciones.

Al laboratorio de Atmósferas Modificadas del Departamento de Ingeniería Agroindustrial por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipo para desarrollar parte de esta investigación.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por su confianza, dirección, revisión, apoyo y acertados consejos para la realización de esta investigación.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por su apoyo, asesoría y entusiasmo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Irineo Lorenzo López Cruz por su participación, apoyo y revisión durante la realización de esta investigación.

Al Dr. Ricardo Domínguez Puerto por su participación, apoyo, revisión y consejos brindados durante la investigación.

A la Dra. Irma Salgado Escobar, el Dr. Benito Reyes Trejo y la Dra. Ma. Rosa González Tepale por haberme guiado en la ejecución de algunas técnicas durante mi trabajo en laboratorio.

DATOS BIOGRÁFICOS

Guillermina Hernández Rodríguez originaria de Chignahuapan, Puebla. Realizó sus estudios de primaria en la escuela “José María Morelos y Pavón”. Cursó secundaria en la escuela Telesecundaria “Miguel Cástulo de Alatríste”. Posteriormente estudió preparatoria en el “Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Puebla”. Realizó sus estudios de Licenciatura en Ingeniería Agroindustrial en la “Universidad Autónoma Chapingo”, mismos que concluyeron en 2012. El tema de tesis que desarrolló para concluir su licenciatura fue “Caracterización del proceso sociotécnico del queso Guaje de Tanquián de Escobedo, San Luis Potosí”. Durante el periodo 2013-2015 realizó sus estudios de maestría en la Universidad Autónoma Chapingo, en el Posgrado de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua; en este periodo desarrolló el tema de investigación “Desarrollo de un proceso para obtener microcápsulas de compuestos con actividad antioxidante extraídos de frutos de capulín (*Prunus serotina*)”. En el año 2019 inicio sus estudios de doctorado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua con orientación en Biosistemas en el mismo posgrado. La investigación que llevó a cabo para obtener el grado fue “Proceso de fermentación y aprovechamiento de antocianinas de frutos de *Ardisia compressa* Kunt”.

RESUMEN GENERAL

PROCESO DE FERMENTACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE ANTOCIANINAS DE FRUTOS DE *Ardisia compressa*

Los frutos de *Ardisia compressa* han sido objeto de estudio por su capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y otros flavonoides. Comúnmente utilizados para la preparación de mermeladas, atole y licores, dicho procesamiento de los frutos puede impactar negativamente en su potencial antioxidante; sin embargo, es necesario debido a que son perecederos y de producción estacional. El objetivo de esta investigación fue estudiar el aprovechamiento de frutos de *Ardisia compressa* para agregar valor a este recurso. En una primera etapa se evaluó el proceso de fermentación alcohólica de los frutos, monitoreando la variación de compuestos, se comparó levadura comercial (SC) y nativa (LN). Además, se usó modelación matemática para el seguimiento de la cinética de fermentación y determinar cuál levadura proporciona mejores resultados. Una segunda etapa se enfocó en la separación de antocianinas de los frutos atendiendo la reducción de azúcares, por medio de un sistema acuoso bifásico (SAB) constituido de Na₃Cit y acetona, así como ácido cítrico (HCit), adicionado para controlar el pH. Los resultados indicaron que el contenido de alcohol del producto fermentado fue de 73.6 y 95.9 gL⁻¹ con SC y LN, respectivamente, mientras que los fenoles solubles totales, antocianinas y actividad antioxidante fueron 2,367.0 m gL⁻¹, 215.5 m gL⁻¹ y 16,832.0 μmolL⁻¹ con SC y 2213.0 m gL⁻¹, 287,4 m gL⁻¹ y 18.614,0 μmolL⁻¹ con LN, respectivamente. Además, con el SAB basado en 14.02 % Na₃Cit, 7.42 % HCit y 27.60 % acetona fue posible recuperar el 91 % de las antocianinas en la fase superior (acetona-agua). Se concluyó que la levadura nativa fue la mejor opción para preparar una bebida fermentada con mejor color y propiedades antioxidantes. Además, el SAB con ácido cítrico permitió la separación adecuada de compuestos bioactivos de los frutos, los cuales se pueden utilizar como agentes de pigmentación bajo condiciones controladas.

Palabras clave: *Ardisia compressa*, antocianinas, fermentación, levadura comercial y nativa, sistemas acuosos bifásicos.

Tesis de Doctorado en Ingeniería del Programa de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua,
Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Guillermina Hernández Rodríguez

Director de tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama

GENERAL ABSTRACT

FERMENTATION PROCESS AND USE OF ANTHOCYANINS FROM *Ardisia compressa* FRUITS

The fruits of *Ardisia compressa* have been studied for their antioxidant capacity, anthocyanins content and other flavonoids. Commonly used for the preparation of jams, atole and liqueurs, these processing of the fruits can negatively impact their antioxidant potential; however, it is necessary because they are perishable and of seasonal production. The main aim of this research was to study the use of *Ardisia compressa* fruits to add value to this vegetal resource. In the first stage of this work, the alcoholic fermentation process of the fruits was evaluated by monitoring the variation of compounds; use of commercial yeast (SC) and native yeast (NY) were compared. In addition, mathematical modeling was used to monitoring fermentation kinetics and determine which yeast provides the best results. The second stage consisted of the separation of anthocyanins from the fruits focused on reducing of sugars through an aqueous biphasic system (ABS) consisting of Na₃Cit and acetone, as well as citric acid (HCit), added to pH control. The results indicated that the alcohol content of the fermented product was 73.6 and 95.9 gL⁻¹ with SC and NY, respectively, while the total soluble phenols, anthocyanins and antioxidant activity were 2,367.0 mgL⁻¹, 215.5 mgL⁻¹ and 16,832.0 μmolL⁻¹ with SC, and 2213.0 mgL⁻¹, 287.4 mgL⁻¹ and 18,614.0 μmolL⁻¹ with NY, respectively. Furthermore, with the ABS based on 14.02 % Na₃Cit, 7.42 % Hcit and 27.60 % acetone it was possible to recover 91 % of the anthocyanins in the upper phase. It was concluded that NY was the best option to prepare a fermented beverage with better color and antioxidant properties. Furthermore, the ABS with citric acid allowed the adequate separation of bioactive compounds from the fruits, which can be used as pigmentation agents under controlled conditions.

Key words: *Ardisia compressa*, anthocyanins, alcoholic fermentation, native yeast, two-phase aqueous

Tesis de Doctorado en Ingeniería del Programa de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua,
Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Guillermina Hernández Rodríguez

Director de tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Ardisia* Sw. (Primulacea) es pantropical y está integrado por arbustos, árboles o hierbas leñosas, que pertenecen a 720 especies que producen frutos globosos de una sola semilla (POWO, 2019). Especies pertenecientes a este género han sido estudiadas por su potencial antioxidante, derivado de los compuestos bioactivos que contiene, asociados principalmente al contenido fenólico (Azima, Noriham, & Manshoor, 2017; Joaquín-Cruz et al., 2015; T. Liang et al., 2023; Vázquez-Sánchez et al., 2019).

Ardisia compressa es un arbusto caducifolio perteneciente a este género. Ha sido objeto de estudio principalmente porque produce frutos de color rojo profundo o púrpura, de sabor agrídulce y con alta capacidad antioxidante; debido a la presencia de antocianinas y otros flavonoides, como diterpenos, galotaninos, glucósidos conjugados con fenol y ácidos clorogénicos (Joaquín-Cruz et al., 2015; Vázquez-Sánchez et al., 2019).

Su distribución en México comprende los estados de Chihuahua, Chiapas, San Luis Potosí, Tlaxcala, Hidalgo, Aguascalientes, Puebla, Tamaulipas y Veracruz (Flores-García et al., 2019). En Xicotepec de Juárez, municipio ubicado en la Sierra Norte del Estado de Puebla, *A. compressa* se reproduce de forma silvestre y se conoce comúnmente como acáchul (Vázquez-Sánchez, Corfield, Sosa, Salvatori, & Schebor, 2021). Los frutos se consumen en fresco, y una porción es comúnmente destinada a elaborar mermeladas, bebidas, atole y licores. El desarrollo de productos procesados ha sido necesario por la estacionalidad de la producción, que limita la recolección a tan sólo dos o tres meses. Además, la oferta del fruto ha aumentado, ya que en la Universidad de Xicotepec se logró su propagación a partir de la semilla para establecer un cultivo, aunque su comercialización se ve limitada por ser perecedero.

Debido a las características climáticas de la región, la viabilidad del fruto en condiciones ambientales es limitada (2-3 días). En refrigeración, su conservación aumenta aproximadamente a una semana. Sin embargo, para prolongar su disponibilidad a menudo se conserva congelado (Vázquez-Sánchez et al., 2021). No obstante, este procedimiento requiere la energía proporcional a la cantidad de fruto congelado y al tiempo de almacenamiento, lo que a largo plazo puede convertirse en una desventaja económica.

En la región, el fruto procesado como licor tiene alta demanda. Aunque este producto es una alternativa viable no permite conservar y aprovechar el potencial de los frutos, ya que el proceso de elaboración involucra calentamiento del jugo, provocando degradación de los pigmentos y disminución de su potencial antioxidante. Además, estos licores artesanales contienen alta concentración de azúcares, clasificándolos como dulces (>10.1 % contenido de azúcares), de acuerdo con la NOM-199-SCFI-2017 (del Consumidor et al. 2017). Sin embargo, en licores artesanales se ha reportado un contenido de azúcares en un rango de 12.5 a 50 % (m/v) (Martínez Lara & Romero Villar, 2006). Actualmente, la alta cantidad de azúcares en un producto impacta en el consumo por su alto contenido calórico.

La fermentación de los frutos es una alternativa de aprovechamiento, para desarrollar un producto fermentado denominado vino de fruta o vino sin uva, término utilizado por Garg (2017). La producción de vino es un proceso importante que se ha usado para reducir las pérdidas postcosecha, agregar valor (en algunos casos a precios muchas veces mayor al producto agrícola) y minimizar el desperdicio de las industrias procesadoras de frutas distintas de la uva (Garg, 2017).

Se han elaborado bebidas fermentadas de diversas frutas comunes como manzana, albaricoque, plátano, frutillas o berries y anacardo, así como de algunos frutos exóticos como maracuyá, lichi, níspero, ciruela, granada (Joshi, Panesar, Rana, & Kaur, 2017). La producción de bebidas fermentadas a partir de frutos rojos ha ido madurando y ganando importancia, porque algunos de estos

frutos poseen características fisicoquímicas y antioxidantes semejantes a la uva (Aramwit, Bang, & Srichana, 2010; Joaquín-Cruz et al., 2015). El desarrollo de una bebida fermentada de frutos de acáchul podría tener un impacto económico para los recolectores y representar un atractivo para una cantidad importante de turistas que visitan Xicotepec ya que es considerado pueblo mágico.

La producción de vino es un proceso que no requiere destilación, por lo tanto, el contenido de nutrientes (vitaminas, minerales y azúcares) es superior al de las bebidas destiladas como el brandy y el whisky. Durante la elaboración del vino se liberan componentes bioactivos en la solución etanólica acuosa, mejorando su biodisponibilidad y absorción durante el consumo (Vasanth Rupasinghe, Joshi, Smith, & Parmar, 2017), dentro de los cuales destacan los compuestos fenólicos y sus derivados.

En las plantas, microbios y hongos, los compuestos fenólicos tienen la función de protección contra la radiación UV-B, además funcionan como moléculas de señalización, fitoalexinas, reguladores del transporte de auxinas, antioxidantes. Asimismo, algunos de ellos tienen propiedades cromóforas y actúan como pigmentos (Tahira, Avtar, & Autar, 2013). Presumiblemente, la actividad antioxidante es la responsable de las propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas, inmunomoduladoras y antiinflamatorias, de estos compuestos (Maksimović & Dragišić Maksimović, 2017). El alto valor intrínseco de la concentración de fenoles totales de las bayas o frutillas a fermentar determina en gran medida los valores finales de estos productos en los vinos correspondientes (Maksimović & Dragišić Maksimović, 2017). En los vinos, el color es uno de los principales atractivos visuales, proporcionado en mayor medida por las antocianinas. En ese sentido, se ha reportado que los extractos metanólicos de acáchul tienen contenidos notables de antocianinas como malvidina 3-O-galactósido, delfinidina 3-O-galactósido, y petunidina 3-O-galactósido (Joaquín-Cruz et al., 2015).

Las antocianinas son pigmentos de origen vegetal de la familia de los flavonoides y pertenecen a la subclase de los compuestos fenólicos y proporcionan una

amplia gama de colores, que varían entre naranja, rojo, morado y azul, y son encontrados en muchas frutas y verduras (Oladzadabbasabadi et al., 2022). El consumo de antocianinas ha sido benéfico para el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas, inflamación gastrointestinal y enfermedades neurodegenerativas (Braga, Murador, de Souza Mesquita, & de Rosso, 2018). También tiene efecto positivo en disminuir problemas de salud asociados con la obesidad y diferentes tipos de cáncer (Gomes et al., 2019; Li et al., 2021; J. Zhang et al., 2019).

Actualmente, las antocianinas han atraído gran atención por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y de antienvjecimiento; además se ha demostrado que estos compuestos protegen la retina, disminuyen la concentración de lípidos en la sangre y mejoran la salud intestinal. Por lo tanto, el consumo regular de alimentos ricos en antocianinas ha aumentado (Zhu, 2018).

En la fermentación alcohólica de la uva el proceso principal que ocurre durante la biotransformación a vino es la conversión del azúcar a etanol, por acción de las levaduras. Sin embargo, en el proceso también se extraen compuestos presentes en la pulpa, piel y semilla, los cuales proporcionan las características finales del vino. Los taninos y antocianinas presentes en la piel y semilla son responsables del amargor y astringencia del vino tinto. Estos compuestos intervienen en la estabilidad del color, que es una de las características organolépticas más importantes del vino porque contribuye en la evaluación de la calidad del producto (Bimpilas, Panagopoulou, Tsimogiannis, & Oreopoulou, 2016; González-Barreiro, Rial-Otero, Cancho-Grande, & Simal-Gándara, 2015). Al respecto, en una bebida fermentada producida a partir de acáchul se observó que tales compuestos proporcionan características organolépticas propias al producto final (Flores-García et al., 2019).

El proceso de fermentación de frutos genera una cantidad importante de residuos sólidos que regularmente habían sido utilizados como composta. Actualmente, estos residuos se someten a evaluación para cuantificar y extraer los posibles

biocompuestos que contienen y aprovecharlos en la industria (Bisht, Sharma, Rawat, Chakraborty, & Yadav, 2020).

Las innovaciones en la industria alimentaria, impulsadas por una mayor conciencia sobre estilos de vida saludables, han llevado a una enorme expansión del mercado de alimentos funcionales, centrándose en los productos de bayas o frutillas (Terzić et al., 2022). Derivado de alta demanda de alimentos funcionales en la industria, el interés por los pigmentos naturales ha aumentado, principalmente por su aparente inocuidad y origen natural. Las antocianinas son una opción de pigmentación de productos industriales alternativa a los colorantes sintéticos (Slama et al., 2021; X. Wu et al., 2011). El uso de colorantes sintéticos genera preocupaciones ambientales y altera el equilibrio ecológico (Slama et al., 2021). La mayor conciencia sobre la sostenibilidad ha desplazado el interés de los colorantes sintéticos hacia los pigmentos naturales derivados de plantas como alternativas más seguras. Su origen natural hace que sean biodegradables, menos alergénicos y tóxicos que los sintéticos (Brudzyńska, Sionkowska, & Grisel, 2021). Así, las antocianinas tienen aplicaciones potenciales como pigmentos naturales en la industria textil, del papel, del cuero, de la imprenta y de los plásticos además ser reconocidos como colorantes alimentarios, ya que han sido clasificados por varios países con el código E-163 (Tarone, Cazarin, & Marostica Junior, 2020).

Sin embargo, fuentes de antocianinas como las bayas o frutillas que ya tienen un mercado bien establecido en el sector alimentario, no pueden destinarse por completo hacia la producción de colorantes naturales. Por lo tanto, para reducir el costo de producción se requieren fuentes no convencionales (Banerjee, Singh, Eilts, Sacks, & Singh, 2022). Aunque el fruto de acáchul es una fuente de antocianinas que puede consumirse directamente, cuando se somete a fermentación los residuos de proceso podrían aprovecharse. Con ello la obtención de los pigmentos a partir de los residuos es una alternativa que se traduce en un beneficio económico.

En los alimentos, las antocianinas han sido principalmente aplicadas a productos como yogures, zumos mixtos de frutas, pan, pasteles, galletas, gelatina, Kéfir, entre otros (Nabi et al., 2023). Aunque la estabilidad del pigmento se ve alterada por la matriz del alimento y principalmente su pH, la pureza de las antocianinas agregadas determina también la conservación del color durante el almacenamiento del producto. Por lo tanto, es pertinente desarrollar métodos de extracción de antocianinas que permitan concentrarlas y aumentar su estabilidad.

El proceso de recuperación de cualquier metabolito debe ser suficientemente efectivo para evitar pérdidas y altos costos en el producto final, lo que indica que las operaciones de proceso deben minimizarse (Varadavenkatesan, Pai, Vinayagam, Pugazhendhi, & Selvaraj, 2021). En las plantas, las antocianinas están mezcladas con metabolitos tales como azúcares, enzimas, proteínas y otros. Para separarlas, se han utilizado algunos procesos biotecnológicos, como extracción con disolventes (metanol, etanol o acetona), asistida de procesos como ultrasonido, microondas, centrifugación, purificación con resinas y liofilización (Banerjee et al., 2022). También se ha reportado el uso de secado por aspersión o extracción por fluidos supercríticos (Tarone et al., 2020). Sin embargo, la mayoría de los procesos involucran una serie de operaciones que dificultan su escalamiento.

El sistema acuoso de dos fases (ATPS) o extracción acuosa en dos fases (ATPE), por sus siglas en inglés, es una técnica que ofrece la posibilidad de separar, concentrar y purificar en un solo paso. Por ello, cumple sin esfuerzo la mayoría de los requisitos de una técnica de extracción ideal (Varadavenkatesan et al., 2021). Los ATPS forman dos fases acuosas inmiscibles tras la combinación de, al menos, dos compuestos solubles en agua, por ejemplo, polímeros, sales, líquidos iónicos, alcoholes, polisacáridos y disolventes eutécticos profundos, por encima de una concentración crítica, lo que crea un ambiente suave adecuado para una amplia gama de biomoléculas como proteínas, antibióticos y metabolitos, entre otros (Vicente, Urbančič, Likozar, Simões, & Pereira, 2023). Una elección adecuada de los componentes que forman las fases garantiza la

realización de dos capas definidas en equilibrio; cada componente o molécula de interés particionará preferencialmente a una de estas capas (Varadavenkatesan et al., 2021).

ATPS es reconocida como una técnica sencilla, emergente, eficiente, económica, versátil y de fácil escalamiento para el bioprocesamiento de productos biotecnológicos. En las últimas dos décadas ha aumentado el interés en los ATPS; por su potencial para evitar las limitaciones técnicas que implican el procesamiento posterior en la purificación de un extracto (Phong, Show, Chow, & Ling, 2018; Vicente et al., 2023). Además, ofrecen un mayor rendimiento con menor tiempo de procesamiento y son una alternativa para hacer frente a los actuales procesos biotecnológicos de recuperación, que son más tardados (Vicente et al., 2023).

Los ATPS se han empleado con éxito, en investigaciones recientes, para la recuperación de compuestos fenólicos (Varadavenkatesan et al., 2021). Esta técnica también ha sido aplicada en la separación y purificación de antocianinas de diversos frutos como son: *Fragaria ananassa* (Edahiro et al., 2005), *Morus atropurpurea* Roxb. (L. Liang et al., 2012; X. Wu et al., 2011), *Vaccinium uliginosum* Linn (Hua et al., 2013), *Syzygium cumini* (Caldeira, Converti, Naves de Moraes, & Teles de Faria, 2022; Caldeira et al., 2019; Chandrasekhar & Raghavarao, 2015; Xie et al., 2022), uva (*vitis vinífera*) (Lima et al., 2021; Lima, Soares, Paltram, Halbwirth, & Bica, 2017; Tang et al., 2018; Y. Wu et al., 2014; Xie et al., 2022), *Vaccinium vitis-idaea* (Bhullar & Rupasinghe, 2015), *Lycium ruthenicum* Murr (Qin et al., 2017), *Garcinia indica* (B. Nainegali, Iyyaswami, & Belur, 2017; B. S. Nainegali, Iyyaswami, & Belur, 2019; B. S. Nainegali, Iyyaswami, & D Belur, 2020), *Nitraria tangutorun* Bobr. Y *Lycium ruthenicum* Murr (Sang et al., 2018), *Ribes nigrum* (Bu et al., 2021), *Morus alba* L. (Zhou et al., 2021) y *perilla frutescens* (L.) Britt (X. Zhang et al., 2022). El auge de los ATPS como alternativas de recuperación y concentración de antocianinas se ha observado desde los últimos cinco años, ya que aproximadamente el 60 % de los

trabajos se ha reportado durante ese periodo. La continua investigación en el tema reafirma la pertinencia del trabajo desarrollado en esta investigación.

Con base en lo ya descrito, el objetivo de esta investigación fue estudiar y desarrollar el proceso de fermentación de frutos de *Ardisia compressa* así como extraer los pigmentos que contiene para promover el aprovechamiento integral de este recurso. La hipótesis considerada fue que los frutos tienen potencial para obtener un producto con valor agregado, así como para ser fuentes potenciales de pigmentos.

Los resultados del trabajo se describen en seis capítulos abordándose como se indica a continuación:

En el segundo capítulo de este documento se presenta una revisión de literatura referente a bebidas fermentadas que han sido desarrolladas a partir de frutos diferentes a la uva. También se hace referencia a los compuestos responsables del color y sabor en el vino tinto, a los factores que influyen en el proceso de fermentación y a los trabajos sobre modelación que se han desarrollado sobre el proceso de fermentación y la actividad antioxidante en la fabricación de vino.

El tercero aborda un estudio bibliométrico sobre la separación de antocianinas mediante extracción acuosa en dos fases, considerando un periodo de 2005 a 2023, de documentos publicados en Web of Science y Scopus. La información obtenida se presenta mediante el análisis de un diagrama de densidad de red de coautorías y un mapa bibliométrico de la red de coocurrencias de las palabras clave, desarrollado utilizando el programa VOSviewer.

En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos de la fermentación de los frutos utilizando levadura nativa y comercial, se describen los cambios presentados en el contenido de azúcares, producción de etanol, fenoles solubles totales y antocianinas durante la cinética de fermentación y su seguimiento mediante modelación matemática. Los resultados de este capítulo ya fueron publicados en la Revista Mexicana de Ingeniería Química con el título "Fermented

beverage of *Ardisia compressa* fruits based on commercial and native yeasts evaluation of kinetic changes”.

El quinto capítulo aborda la separación de antocianinas de los frutos atendiendo la reducción de azúcares, por medio de un sistema acuoso bifásico (SAB) constituido de Na₃Cit, acetona y ácido cítrico (Hcit), el cual fue adicionado para controlar el pH. También se presentan pruebas de estabilidad y pigmentación de las antocianinas recuperadas aplicadas en matrices de yogur natural.

Por último, en el capítulo seis se indican las conclusiones derivadas del proceso de fermentación de los frutos, así como de la separación de antocianinas mediante sistemas acuosos bifásicos para promover el aprovechamiento de los pigmentos, y se describen las perspectivas a futuro de la investigación realizada.

1.1 Literatura citada

Aramwit, P., Bang, N., & Srichana, T. (2010). The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits. *Food Research International*, 43(4), 1093-1097. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.022>

Azima, A. S., Noriham, A., & Manshoor, N. (2017). Phenolics, antioxidants and color properties of aqueous pigmented plant extracts: *Ardisia colorata* var. *elliptica*, *Clitoria ternatea*, *Garcinia mangostana* and *Syzygium cumini*. *Journal of Functional Foods*, 38, 232-241. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.018>

Banerjee, S., Singh, R., Eilts, K., Sacks, E. J., & Singh, V. (2022). Valorization of *Miscanthus x giganteus* for sustainable recovery of anthocyanins and enhanced production of sugars. *Journal of Cleaner Production*, 369, 133508. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133508>

Bhullar, K. S., & Rupasinghe, H. P. V. (2015). Antioxidant and cytoprotective properties of partridgeberry polyphenols. *Food Chemistry*, 168, 595-605. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.103>

- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, 197, 39-46. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.095>
- Bisht, T. S., Sharma, S. K., Rawat, L., Chakraborty, B., & Yadav, V. (2020). A novel approach towards the fruit specific waste minimization and utilization: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(1), 712-722.
- Braga, A. R. C., Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., & de Rosso, V. V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 31-40. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.031>
- Brudzyńska, P., Sionkowska, A., & Grisel, M. (2021). Plant-Derived Colorants for Food, Cosmetic and Textile Industries: A Review. *Materials*, 14(13). Retrieved from doi:10.3390/ma14133484
- Bu, X., Xu, Y., Zhao, M., Li, D., Zou, J., Wang, L., . . . Yang, Y. (2021). Simultaneous extraction of polysaccharides and polyphenols from blackcurrant fruits: Comparison between response surface methodology and artificial neural networks. *Industrial Crops and Products*, 170, 113682. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113682>
- Caldeira, A. C. R., Converti, A., Naves de Moraes, M., & Teles de Faria, J. (2022). Anthocyanin Partition in Aqueous Two-Phase Systems Based on Isopropanol and Sodium/Ammonium Sulfate. *Chemical Engineering & Technology*, 45(9), 1605-1613. Doi: <https://doi.org/10.1002/ceat.202100524>
- Caldeira, A. C. R., FRANCA, W. F. L. d., Converti, A., Lima, W. J. N., Sampaio, F. C., & FARIA, J. T. d. (2019). Liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase ethanol/salt systems at different temperatures and their application to anthocyanins extraction. *Food Science and Technology*, 39, 711-717. Doi: <https://doi.org/10.1590/fst.32218>

- Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Separation and Concentration of Anthocyanins from Jamun: An Integrated Process. *Chemical Engineering Communications*, 202(10), 1368-1379. Doi: 10.1080/00986445.2014.935351
- del Consumidor, P. F., de Normalización, S. M., Certificación, S., Normalización y Certificación NYCE, S., mexicanos, P., Banuet Arrache y Asociados, S., & de México, C. (2017). NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-199-SCFI-2017, BEBIDAS ALCOHÓLICAS-DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS, INFORMACIÓN COMERCIAL Y MÉTODOS DE PRUEBA PREFACIO.
- Edahiro, J.-i., Yamada, M., Seike, S., Kakigi, Y., Miyanaga, K., Nakamura, M., . . . Seki, M. (2005). Separation of cultured strawberry cells producing anthocyanins in aqueous two-phase system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4), 449-454. Doi: <https://doi.org/10.1263/jbb.100.449>
- Flores-García, A., Márquez-Meléndez, R., Salas, E., Ayala-Soto, G., Salmerón, I., & Hernández-Ochoa, L. (2019). Physicochemical and Sensory Characteristics of a Chagalapoli Fruit (*Ardisia compressa*) Beverage Fermented Using *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Science*, 2019, 9687281. Doi: 10.1155/2019/9687281
- Garg, N. (2017). Chapter 8 – Technology for the Production of Agricultural Wines. In M. R. Kosseva, V. K. Joshi & P. S. Panesar (Eds.), *Science and Technology of Fruit Wine Production* (pp. 463-486). San Diego: Academic Press.
- Gomes, J. V. P., Rigolon, T. C. B., Souza, M. S. d. S., Alvarez-Leite, J. I., Lucia, C. M. D., Martino, H. S. D., & Rosa, C. d. O. B. (2019). Antiobesity effects of anthocyanins on mitochondrial biogenesis, inflammation, and oxidative stress: A systematic review. *Nutrition*, 66, 192-202. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.05.005>

- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(2), 202-218.
- Hua, Z., Yuesheng, D., Ge, X., Menglu, L., Liya, D., LiJia, A., & Zhilong, X. (2013). Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *Vaccinium uliginosum* Linn. *J. Chromatogr. Sep. Tech*, 4(02). Doi: 10.4172/2157-7064.1000167
- Joaquín-Cruz, E., Dueñas, M., García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C., & García-Salinas, C. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151-157. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.033>
- Joshi, V. K., Panesar, P. S., Rana, V. S., & Kaur, S. (2017). Chapter 1 – Science and Technology of Fruit Wines: An Overview. In M. R. Kosseva, V. K. Joshi & P. S. Panesar (Eds.), *Science and Technology of Fruit Wine Production* (pp. 1-72). San Diego: Academic Press.
- Li, P., Feng, D., Yang, D., Li, X., Sun, J., Wang, G., . . . Bai, W. (2021). Protective effects of anthocyanins on neurodegenerative diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 117, 205-217. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.005>
- Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., . . . Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*, 46(1), 76-82. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.024>
- Liang, T., Yu, J., Qu, S., Xie, Q., Shama, R., Bao, M., . . . Borjigidai, A. (2023). *Ardisia gigantifolia* stapf (Primulaceae): A review of ethnobotany, phytochemistry, pharmacology, clinical application, and toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 116079. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.116079>

- Lima, Á. S., Oliveira, B. S. d., Shabudin, S. V., Almeida, M., Freire, M. G., & Bica, K. (2021). Purification of anthocyanins from grape pomace by centrifugal partition chromatography. *Journal of Molecular Liquids*, 326, 115324. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115324>
- Lima, Á. S., Soares, C. M. F., Paltram, R., Halbwirth, H., & Bica, K. (2017). Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 451, 68-78. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.006>
- Maksimović, V., & Dragišić Maksimović, J. (2017). Chapter 4 – Composition, Nutritional, and Therapeutic Values of Fruit and Berry Wines. In M. R. Kosseva, V. K. Joshi & P. S. Panesar (Eds.), *Science and Technology of Fruit Wine Production* (pp. 177-226). San Diego: Academic Press.
- Martínez Lara, A., & Romero Villar, A. G. (2006). *Elaboración de licor de tuna*.
- Nabi, B. G., Mukhtar, K., Ahmed, W., Manzoor, M. F., Ranjha, M. M. A. N., Kieliszek, M., . . . Aadil, R. M. (2023). Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as food colorants in food products. *Food Bioscience*, 102403. Doi: 10.1080/10408690091189257
- Nainegali, B., Iyyaswami, R., & Belur, P. (2017). Aqueous two-phase extraction of anthocyanin from fruits of *Garcinia indica*. *International Journal of Earth Sciences and Engineering*, 10(3), 688-692. Doi: 10.21276/ijee.2017.10.0330
- Nainegali, B. S., Iyyaswami, R., & Belur, P. D. (2019). Simultaneous extraction of four different bioactive compounds from *Garcinia indica* and their enrichment using Aqueous Two-Phase Systems. *Food and Bioproducts Processing*, 114, 185-195. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.01.002>
- Nainegali, B. S., Iyyaswami, R., & D Belur, P. (2020). Partitioning of bio-active compounds from rinds of *garcinia indica* using aqueous two-phase system: Process evaluation and optimization. *Separation and Purification Technology*, 253, 117520. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117520>

- Oladzadabbasabadi, N., Mohammadi Nafchi, A., Ghasemlou, M., Ariffin, F., Singh, Z., & Al-Hassan, A. A. (2022). Natural anthocyanins: Sources, extraction, characterization, and suitability for smart packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 100872. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100872>
- Patil, V. M., & Masand, N. (2018). Anticancer potential of flavonoids: chemistry, biological activities, and future perspectives. *Studies in natural products chemistry*, 59, 401-430. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00012-8>
- Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H., & Ling, T. C. (2018). Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 273-281. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>
- POWO, R. B. G. (2019). Plants of the world online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Qin, B., Liu, X., Cui, H., Ma, Y., Wang, Z., & Han, J. (2017). Aqueous two-phase assisted by ultrasound for the extraction of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(9), 881-888. Doi: 10.1080/10826068.2017.1350980
- Sang, J., Dang, K.-k., Ma, Q., Li, B., Huang, Y.-y., & Li, C.-q. (2018). Partition Behaviors of Different Polar Anthocyanins in Aqueous Two-Phase Systems and Extraction of Anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. And *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Analytical Methods*, 11(4), 980-991. Doi: 10.1007/s12161-017-1071-3
- Slama, H. B., Chenari Bouket, A., Pourhassan, Z., Alenezi, F. N., Silini, A., Cherif-Silini, H., . . . Belbahri, L. (2021). Diversity of Synthetic Dyes from Textile Industries, Discharge Impacts and Treatment Methods. *Applied Sciences*, 11(14). Retrieved from doi:10.3390/app11146255

- Tahira, F., Avtar, K. H., & Autar, K. M. (2013). Functional Foods: Genetics, Metabolome, and Engineering Phytonutrient Levels. In K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 1715-1749). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Tang, X., Wang, Y., Han, J., Wang, L., Li, C., & Ni, L. (2018). Separation, purification of anthocyanin and vitis linn polysaccharide from grape juice by the two-step extraction and dialysis. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13344. Doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13344>
- Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., & Marostica Junior, M. R. (2020). Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. *Food Research International*, 133, 109092. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109092>
- Terzić, M., Majkić, T., Beara, I., Zengin, G., Miljić, U., Đurović, S., . . . Radojković, M. (2022). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) wine as a novel potential functional food product. *Food Bioscience*, 50, 102047. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102047>
- Varadavenkatesan, T., Pai, S., Vinayagam, R., Pugazhendhi, A., & Selvaraj, R. (2021). Recovery of value-added products from wastewater using Aqueous Two-Phase Systems – A review. *Science of The Total Environment*, 778, 146293. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146293>
- Vasanth Rupasinghe, H. P., Joshi, V. K., Smith, A., & Parmar, I. (2017). Chapter 3 – Chemistry of Fruit Wines. In M. R. Kosseva, V. K. Joshi & P. S. Panesar (Eds.), *Science and Technology of Fruit Wine Production* (pp. 105-176). San Diego: Academic Press.
- Vázquez-Sánchez, A. Y., Aguilar-Zárate, P., Muñoz-Márquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2019). Effect of ultrasound treatment on the extraction of antioxidants from *Ardisia compressa* Kunth fruits and identification of phytochemicals by HPLC-ESI-MS. *Heliyon*, 5(12). Doi: [10.1016/j.heliyon.2019.e03058](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03058)

- Vázquez-Sánchez, A. Y., Corfield, R., Sosa, N., Salvatori, D., & Schebor, C. (2021). Physicochemical, functional, and sensory characterization of apple leathers enriched with acáchul (*Ardisia compressa* Kunth) powder. *LWT*, 146, 111472. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111472>
- Vicente, F. A., Urbančič, V., Likozar, B., Simões, P. N., & Pereira, J. F. B. (2023). Aqueous biphasic systems as a key tool for food processing. *Current Opinion in Food Science*, 50, 100991. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.100991>
- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., & Yang, L. (2011). Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, 129(2), 443-453. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.097>
- Wu, Y., Wang, Y., Zhang, W., Han, J., Liu, Y., Hu, Y., & Ni, L. (2014). Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 124, 170-178. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.025>
- Xie, G., Shen, J., Luo, J., Li, D., Tao, Y., Song, C., & Han, Y. (2022). Simultaneous extraction and preliminary purification of polyphenols from grape pomace using an aqueous two-phase system exposed to ultrasound irradiation: Process characterization and simulation. *Frontiers in Nutrition*, 9, 993475. Doi: [10.3389/fnut.2022.993475](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.993475)
- Zhang, J., Wu, J., Liu, F., Tong, L., Chen, Z., Chen, J., . . . Huang, C. (2019). Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: An outlined review. *European Journal of Pharmacology*, 858, 172500. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172500>
- Zhang, X., Zhao, Y., Li, B., Guo, M., Lv, J., & Wei, Y. (2022). Comparison of three extraction methods for anthocyanins from perilla frutescens leaves. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100817. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100817>

- Zhou, X.-J., Zhu, C.-T., Zhang, L.-Y., You, S., Wu, F.-A., & Wang, J. (2021). Enrichment and purification of red pigments from defective mulberry fruits using biotransformation in a liquid-liquid-solid three-phase system. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(19), 24432-24440. Doi: 10.1007/s11356-020-08731-2
- Zhu, F. (2018). Anthocyanins in cereals: Composition and health effects. *Food Research International*, 109, 232-249. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.015>

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Frutos rojos con características para vinificación

Un requisito importante para desarrollar vino a partir de frutos diferentes a las uvas, es la presencia de antocianinas y un alto contenido de azúcar. Los vinos de frutas son bebidas fermentadas producidas bajo los mismos métodos de fermentación que el vino de uva (Ruta & Farcasanu, 2019). Se han desarrollado vinos a partir de frutos ricos en antocianinas tales como moras y algunos frutos silvestres. Los niveles de etanol obtenidos en tales vinos oscilan de 8.44-12.20 % (v/v), mientras que el contenido de antocianinas varía de 24 a 3,056 mgL⁻¹ (Cuadro 1). Las antocianinas son compuestos bioactivos que contribuyen con el color y sabor del vino, por lo que, es necesario monitorear su dinámica durante el proceso de fermentación. Al respecto, se han desarrollado trabajos donde se evalúan los cambios de los compuestos antioxidantes, antocianinas y fenoles totales durante la fermentación alcohólica. Por ejemplo, Pérez-Gregorio et al. (2011) evaluaron la influencia de la fermentación alcohólica sobre la actividad antioxidante y compuestos fenólicos de las moras y encontraron que los niveles de antocianinas disminuyeron en un 50 %, pero los flavonoides totales y la actividad antioxidante no se vieron afectados por el proceso de fermentación. Wang et al. (2015) indicaron que, durante la fermentación alcohólica de frutos de mora, el contenido de fenoles solubles totales, flavonoides y capacidad antioxidante incrementó en los tres primeros días de fermentación y posteriormente se mantuvieron estables, mientras que las antocianinas aumentaron los dos primeros días de fermentación y posteriormente disminuyeron. La concentración de antocianinas monoméricas cambia constantemente durante la fermentación de los frutos y, en tal situación, los productos del metabolismo de la levadura como piruvato, acetaldehído y los vinilfenoles, presentes en el medio de fermentación, interactúan con las

antocianinas para producir piranoantocianinas, oligómeros de antocianinas y pigmentos poliméricos. Estos compuestos intervienen en la estabilización del color, en la coloración rojo-anaranjado y el color rojo azulado (Ruta & Farcasanu, 2019).

Cuadro 1. Contenido de etanol y antocianinas de vinos producidos a partir de frutos rojos.

Fruto	Levadura	CE (% v/v)	CFA (mg C3GL ⁻¹)	Referencia
<i>Sambucus nigra</i> L	SC <i>ph. v. cerevisiae</i>	12	3,056.5 ± 6.39	Elez-Garofulić (2012)
<i>Rubus fruticosus</i> sp.	SC CY3079	9.1	6 ± 2	Gao et al. (2012)
Hawthorn fruit	SC HW-3	11.98 ± 0.02	4.55 ± 0.04	He et al. (2013)
	SC HW-7	12.20 ± 0.04	4.49 ± 0.10	
	SC HW-71B	12.14 ± 0.00	4.31 ± 0.00	
	SC HW-BM45	11.53 ± 0.06	4.04 ± 0.07	
	SC HW-W15	11.01 ± 0.02	4.09 ± 0.05	
<i>Morus alba</i> L	SC LALVIN	9.00 ± 0.60	865.01 ± 20.08	Wang et al. (2015)
Var. Dashi	CY3079	8.44 ± 0.38	556.44 ± 6.66	
Var. Hongguo		9.45 ± 0.00	510.91 ± 1.10	
Var. Longsang		8.60 ± 0.16	440.09 ± 5.37	
Var. Shani				
<i>Morus alba</i> L.	SC YJM 681	9.40 ± 0.01	444.8 ± 2.6	Tao et al. (2017)
	SC ySR 127	10.00 ± 0.02	470.1 ± 7.4	
	SC Y1	10.00 ± 0.08	402.0 ± 6.6	

CE: Contenido de etanol CFA: Contenido Final de Antocianinas, SC: *Saccharomyces cerevisiae*

2.2 Compuestos que proporcionan el color y sabor en el vino tinto

2.2.1 Antocianinas

Las antocianinas se distribuyen ampliamente en el reino de las plantas, se acumulan en la vacuola de las células epidérmicas de la piel de los frutos (particularmente en los frutos con semilla) y se sintetizan a medida que los frutos maduran (Pervaiz et al., 2017). Los pigmentos coloreados de las bayas, grosellas negras y otras frutas de color rojo a azul se presentan por las antocianinas, que influyen en la capacidad antioxidante. Estos compuestos se encuentran en forma de glucósidos de antocianidinas y antocianinas aciladas (Figura 1) (Khoo et al., 2017). Los tipos más comunes de antocianidinas son cianidina, delfinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y malvidina. La petunidina se encuentra

asociada al color del vino, sin embargo, la mayor parte del pigmento rojo en el vino tinto ha sido atribuido a la malvidina; la cual proporciona un color rojo oscuro y polvoriento en los vinos tintos maduros (Bimpilas et al., 2016; Khoo et al., 2017; Nel, 2018).

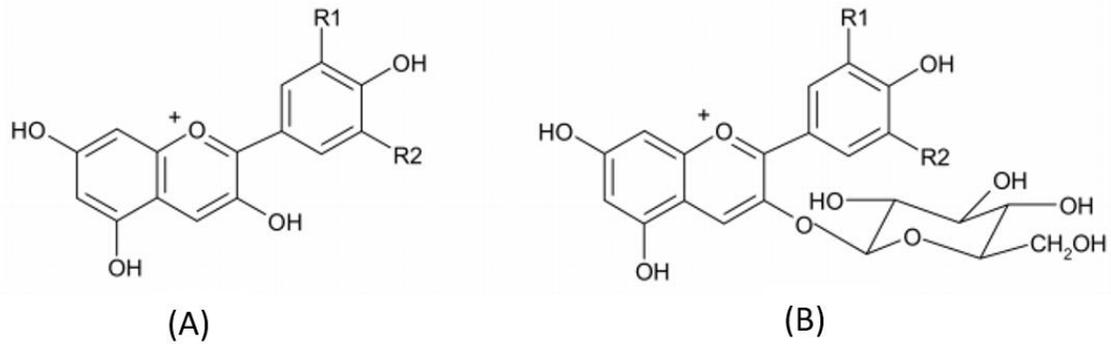


Fig. 1. Estructura química de las principales antocianidinas (A) y antocianinas (en la forma de antocianidina-3-O-glucosido) (B) presentes en las plantas. (Ruta & Farcasanu, 2019).

El proceso de fermentación implica la extracción de los compuestos presentes en la semilla y la piel de los frutos. Las antocianinas migran de la piel hacia el líquido de fermentación mediante un proceso de extracción de masa sólido-líquido. Esta transferencia de compuestos se ve altamente influenciada por la temperatura del proceso, el pH, el contacto del jugo con el material sólido de la uva y la presencia de sustancias, producto de la fermentación, tales como etanol (Egidio et al., 2010; Kelebek et al., 2009). La tasa de liberación de estos compuestos mejora con el aumento de la temperatura y el mezclado. A bajas temperaturas las antocianinas tienen mayor liberación que otros compuestos de la matriz, porque tienen tamaños menores (Miller et al., 2019a; Setford et al., 2019). Al inicio de la fermentación alcohólica de frutos de uva maduros las antocianinas se extraen principalmente en forma monomérica. En el transcurso de la fermentación alcohólica las antocianinas experimentan reacciones complejas que conducen a su transformación estructural.

2.2.2 Proantocianidinas

Las proantocianidinas, o taninos condensados, están presentes en la mayoría de las plantas vasculares y tienen diversas funciones (Brillouet et al., 2013). Estos metabolitos secundarios, son el resultado de la polimerización de unidades de flavan-3-ols y se encuentran en las semillas y piel de los frutos de diversas plantas incluyendo uvas, manzanas, arándanos, entre otras (Montes-Ávila et al., 2017). En los vinos y las uvas predominan dos clases de proantocianidinas: procianidinas, compuestas de subunidades de (2,3-trans)-(+)-catequina y (2,3-cis)-(-)-epicatequina, y prodelfinidinas, compuestas de subunidades de (2,3-trans)-(+)-galocatequina y (2,3-cis)-(-)-epigalocatequina; las cuales proporcionan la sensación de amargor y astringencia en la boca e influyen en la estabilidad del color en el vino tinto (Bimpilas et al., 2016). La sensación en la boca ocurre por la formación de precipitados insolubles que son producto de la unión de los taninos con las proteínas salivales (Ma et al., 2014; Nel, 2018). Las proantocianidinas son más difíciles de extraer que las antocianinas, porque se unen a los componentes de la pared celular (Nel, 2018). Durante la vinificación, los taninos se extraen de la piel y semilla de los frutos. Los taninos obtenidos de la semilla cobran importancia porque tienen capacidad para mejorar la estructura, añejamiento y color del vino, frenando las reacciones de oxidación (Rousserie et al., 2019).

2.2.3 Pigmentos derivados

La expresión de color en el vino, además de ser producto de la extracción sólido-líquido, es también el resultado de reacciones químicas y de interacciones intra e intermoleculares de las antocianinas mismas o con otros compuestos orgánicos, especialmente los compuestos fenólicos y con algunos productos del metabolismo celular (He et al., 2012). Durante la fermentación de los frutos disminuyen las antocianinas monoméricas provocando pérdida de color y oscurecimiento en el vino. Así, para preservar el intenso color en el vino tinto a lo largo del tiempo, se requiere de algunos mecanismos de estabilización del pigmento (Cheyner, 2006). La copigmentación es una reacción que promueve la

estabilidad de las antocianinas a través de su asociación con otras moléculas orgánicas (cofactores) presentes en el vino (Nel, 2018). Este complejo de antocianina-pigmento adopta una configuración tipo sándwich (conocida como apilamiento hidrofóbico π - π), que protege al cromóforo del ion flavilio del ataque nucleofílico del agua, reduciendo así las formas incoloras de hemiacetal y chalcona (Escribano-Bailón et al., 2019; Zhang et al., 2016). Otros compuestos que se forman durante la fermentación y promueven la estabilidad del color y la calidad en el vino tinto son las piranoantocianinas, las cuales son producto de la reacción directa entre las antocianinas monoméricas y ciertos subproductos de la levadura, como el acetaldehído, el ácido pirúvico y los vinilfenoles. Las piranoantocianinas son compuestos altamente estables y resistentes al blanqueamiento con dióxido de azufre y a la degradación oxidativa (Ruta & Farcasanu, 2019). Los pigmentos poliméricos formados por la polimerización directa de las antocianinas y flavan-3-oles o proantocianidinas también están directamente implicados en la coloración del vino (He et al., 2012). La polimerización brinda protección ante el ataque nucleofílico del agua, la oxidación u otras modificaciones químicas. Las antocianinas poliméricas coloreadas se forman a medida que ocurre el añejamiento de un vino y se estima que alrededor del 25 % de las antocianinas monoméricas pueden polimerizarse con compuestos flavonoides al final de la fermentación alcohólica (He et al., 2012; Li & Duan, 2019).

2.3 Factores que influyen en la fermentación alcohólica

2.3.1 Temperatura de fermentación

La producción de vino tinto requiere, en gran medida, de la extracción de antocianinas y taninos presentes principalmente en la parte sólida de los frutos. La cantidad extraída está regulada por procesos de difusión y convección que se llevan a cabo por el contacto entre el jugo y el hollejo. La transferencia de los antioxidantes es afectada por variables tales como la temperatura. Altas temperaturas de fermentación provocan degradación rápida de antocianinas y pigmentos poliméricos (Mori et al., 2007). La temperatura de fermentación

comúnmente utilizada para la producción de vino tinto es 20 °C. Bajo estas condiciones se observa una extracción rápida de antocianinas al inicio de la fermentación alcohólica, la cual se estabiliza posteriormente (Ruiz-Rodríguez, Palma, & Barroso, 2021). Kelebek et al. (2009) reportaron que el uso de temperaturas altas, no mayores a 30 °C, en el proceso de fermentación y el contacto del jugo con la piel de la uva durante la maceración mejoran la transferencia de antocianinas al vino. A esta temperatura se mejora la extracción de fenoles y antocianinas, porque se incrementa la permeabilidad de las células de la piel de la uva, provocando un incremento significativo en el color del mosto fermentado (Setford et al., 2019). Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que las fermentaciones realizadas a bajas temperaturas contienen mayor contenido fenólico, antocianinas y son de mayor calidad (Sener, 2018). Los vinos producidos a temperaturas más bajas, 10-12 °C, presentan menos alcohol, aromas más afrutados, y son mayormente preferidos por los consumidores (Alonso-Del-Real et al., 2017).

2.3.2 Efecto del pH durante la fermentación

El pH influye en el comportamiento redox de los polifenoles, la capacidad antioxidante y la formación de productos de la oxidación y el metabolismo de la levadura. Valores de pH cercanos a 3 facilitan el metabolismo celular y permiten alcanzar un grado alcohólico alto en el vino (Samoticha et al., 2019). Algunas moléculas de interés enológico, tales como las antocianinas, catequinas, cinamatos y taninos, son afectadas cuando aumenta el pH. El contenido de taninos se incrementa ligeramente a mayores valores de pH, pero su reactividad hacia la saliva y la astringencia en el vino se reducen. El contenido de antocianinas y cinamatos disminuye a medida que aumenta el pH (Forino et al., 2020). Los pigmentos derivados de las antocianinas contribuyen al cambio progresivo y estabilización del color frente a cambios en el pH (Marquez et al., 2013). El pH del medio influye de manera directa en la estructura (catión flavilio-rojo, pseudobase carbinol-incolora, chalcon- amarilla y base quinoidal-azul) y color de las antocianinas (Garzón, 2008). El pH del medio y el cociente molar

(pigmento/copigmento) influyen en la reacción de copigmentación entre antocianinas y aldehídos fenólicos. El rol de reacción está determinado por el tipo de antocianina y aldehído fenólico que participan en la reacción. A un pH de 3 el aldehído hidroxicinámico ha mostrado ser el copigmento más eficiente (Zhang et al., 2016). El grado de asociación entre el pigmento y el copigmento se puede conocer aplicando la ecuación (Ecuación 1) de la constante de equilibrio (K) (Lambert et al., 2011).

$$\frac{\ln(A - A_0)}{A_0} = \ln k + n \ln[CP]_0 \quad (1)$$

Donde: A es la absorbancia de la antocianina a λ_{520} en presencia de los copigmentos; y A_0 es la máxima absorbancia visible a k igual a 520 nm para la antocianina en ausencia de pigmentos; $[CP]_0$ representa la concentración de copigmento total; y n es la relación entre la antocianina y el pigmento.

2.3.3 Concentración de etanol

La cantidad de etanol presente en el vino afecta la calidad y sabor de la bebida ya que su presencia puede incrementar la percepción o intensidad del amargor. Cuanto mayor es el contenido de etanol el vino se percibe más amargo (Fontoin et al., 2008). Cuando los frutos de uva son sometidos a fermentación alcohólica se presenta un fenómeno de extracción de compuestos fenólicos de la piel y la semilla. La extracción se maximiza cuando se incrementa el contenido de etanol (13%) (Setford et al., 2019a). Sin embargo, el aumento en el contenido de etanol puede provocar cambios perceptibles en el color, debido a que el etanol actúa como disociador de los complejos de copigmentación que se producen entre las antocianinas y cofactores presentes en el medio (Hermosín-Gutiérrez, 2003). En las primeras etapas de fermentación los productos del metabolismo de la levadura como piruvato, acetaldehído y vinilfenoles interactúan con las antocianinas para producir piranoantocianinas, oligómeros de antocianinas y pigmentos poliméricos (Ruta & Farcasanu, 2019). Los primeros días de fermentación en el medio acuso existe mayor contenido de antocianinas, dada la naturaleza polar de los pigmentos y, a medida que la fermentación transcurre,

disminuye el contenido de antocianinas, debido a que el medio hidro-alcohólico promueve la extracción de fenoles y otros flavonoides presentes en la piel de la uva (Egidio et al., 2010).

2.4 Modelación matemática del proceso de fermentación y la actividad antioxidante en la fabricación de vino.

Los pigmentos presentes en la piel y semilla de los frutos y su transformación estructural durante la fermentación determinan las características finales de un vino. La extracción de estos compuestos hacia el líquido de fermentación es un proceso complejo en el que intervienen diferentes variables que deben ser controladas para generar un producto de calidad. Ejemplo de estas variables son, la temperatura de fermentación, el contenido nutricional y fitoquímico del mosto, el tipo de levadura y sus parámetros cinéticos, etc. Los principales compuestos fenólicos que intervienen en la producción de vino son las antocianinas y taninos, que interactúan con otros fenólicos o con algunos productos de la levadura para estabilizar su estructura y mejorar el color y la calidad del vino tinto. Debido a la importancia que tienen los compuestos antioxidantes en el producto final, algunas investigaciones se han enfocado a caracterizar el comportamiento de estos compuestos durante la fermentación alcohólica y el añejamiento del vino. La implementación de modelos cinéticos para describir este proceso es necesaria para entender su funcionamiento interno, monitorear su rendimiento y, en algunos casos, predecir fallas o ciertos escenarios adversos, así como optimizar recursos.

Ya han sido implementados modelos cinéticos que describen el comportamiento de la levadura, el sustrato y sus principales nutrientes. Cramer et al. (2002) desarrollaron un modelo físico y matemático para predecir el consumo de sustrato con base en datos experimentales de fermentaciones de vino con diferentes condiciones iniciales de nitrógeno y azúcar en el medio. El modelo consiste en las siguientes ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) acopladas.

$$\text{Levadura: } \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} * N}{k_N + N} * X_A \quad (2)$$

$$\text{Levadura activa: } \frac{dX_A}{dt} = \frac{\mu_{max} * N}{k_N + N} * X_A - k'_d E X_A \quad (3)$$

$$\text{Nitrógeno: } \frac{dN}{dt} = \frac{B_{max} * N}{k_N + N} * X_A \quad (4)$$

$$\text{Etanol: } \frac{dE}{dt} = \frac{B_{max} * S}{k_s + S} * X_A \quad (5)$$

$$\text{Sustrato (azúcares): } \frac{dS}{dt} = \frac{B_{max} * S}{k_s + S} * X_A \quad (6)$$

Donde: X es concentración total de biomasa; μ_{max} es velocidad máxima de crecimiento de biomasa de levadura; N es nitrógeno; X_A es concentración de biomasa activa; k_N es constante de consumo de nitrógeno; k'_d es sensibilidad de la levadura al etanol; B_{max} es velocidad máxima de azúcar utilizado; S es concentración de azúcar; $Y_{E/S}$ es coeficiente de rendimiento de la producción de etanol a azúcar y k_s es constante de Monod, de consumo de azúcar.

El modelo predice la transición de fermentaciones normales a lentas o estancadas a medida que disminuyen los niveles de nitrógeno. Cuando los niveles de sustrato son altos es necesario complementar el contenido de nitrógeno adicionando amoníaco. El uso de nitrógeno puede evitar o corregir fermentaciones problemáticas. La velocidad de crecimiento celular, el consumo de sustrato y la biomasa activa en presencia de etanol dependen en gran medida de la temperatura (Coleman et al., 2007).

Sainz et al. (2003) propusieron un modelo para evaluar la interacción dinámica que existe entre el metabolismo de la levadura y el proceso de fermentación del vino. Mediante un modelo estequiométrico representaron la fermentación de frutos de uva, utilizando cultivos discontinuos de *Saccharomyces cerevisiae*. El metabolismo anaeróbico de la levadura fue representado con una red estequiométrica de 43 metabolitos y 38 reacciones.

Para la síntesis de biomasa se utilizó la Ecuación (7):

$$\alpha_{proteina} + \beta_{carbohidrato} + \gamma_{lípidos} + \delta_{RNA} + \varepsilon_{DNA} = 1g_{biomasa} \quad (7)$$

Donde α , β , γ , δ y ε son los parámetros estequiométricos de cada componente.

La acumulación de metabolitos en el medio extracelular fue descrita con un modelo compuesto por cinco ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO). Las EDO (Ecuaciones 8-12) utilizadas describen la cinética de cambio de glucosa, amoníaco, etanol, glicerol y biomasa activa.

$$Glucosa: \frac{d[Gluc]}{dt} = -v_{glu} \cdot Xv \quad (8)$$

$$Amoníaco: \frac{d[NH_4]}{dt} = -v_{NH_4} \cdot Xv \quad (9)$$

$$Etanol: \frac{d[EtOH]}{dt} = v_{EtOH} \cdot Xv \quad (10)$$

$$Glicerol: \frac{d[Gly]}{dt} = v_{gly} \cdot Xv \quad (11)$$

$$Biomasa activa: \frac{d[Xv]}{dt} = \mu \cdot Xv \quad (12)$$

Donde: v_i es el vector de flujo metabólico para la especie i ; el corchete ($[]$) la concentración de las variables y μ es la velocidad de crecimiento de la levadura.

La adaptación de la levadura a cambios ambientales, tales como la disponibilidad de nitrógeno y la toxicidad por etanol, durante el proceso de fermentación fue representada adecuadamente por el modelo. Además, es adecuado para simular el crecimiento de las células diferenciadas que interactúan en un entorno que cambia lentamente.

El modelo cinético que describe el comportamiento de la levadura (Cramer et al., 2002) fue retomado recientemente para implementar un modelo que predice temperatura y gradientes de concentración en el sombrero y el líquido de fermentación de vino (Miller et al., 2019b). Este modelo integra fenómenos de transporte tales como transferencia de calor, difusión química y flujo de fluidos compresibles.

La transferencia de calor se describe mediante un balance de energía del proceso (Ecuación 13). El primer término ρc_v representa la acumulación de calor con respecto a un fluido que se mueve en el espacio. El segundo término $\nabla \cdot (k\nabla T)$ es la conducción de calor, como lo da la ecuación de Fourier. El tercer término \dot{Q} es el calor generado, agregado o eliminado por el sistema. El tercer término incluye el calor de fermentación, así como el calor perdido debido al enfriamiento por evaporación.

$$\rho c_v \frac{DT}{Dt} = \nabla \cdot (k\nabla T) + \dot{Q} \quad (13)$$

La difusión de especies dentro del tanque se modela, a través de un balance de materiales (Ecuación 14). El primer término $\frac{DT}{Dt}$ es la acumulación de especies i dentro del fluido que se mueve en el espacio. El segundo término $\nabla \cdot (D_i \nabla c_i)$ es la difusión de la especie i , dado por la ley de Fick para la difusión de un no electrolito. El término final R_i representa la generación o el agotamiento de las especies i por reacción.

$$\frac{DT}{Dt} = \nabla \cdot (D_i \nabla c_i) + R_i \quad (14)$$

El flujo de fluido dentro del tanque se modela mediante la ecuación de Navier-Stokes (Ecuación 15). El primer término $\rho \frac{D\vec{v}}{Dt}$ de la ecuación representa la acumulación de momentum de fluido que se mueve en el espacio. El segundo término ρg es la fuerza externa aplicada al fluido, en este caso la gravedad. Los términos restantes representan la difusión de la cantidad de movimiento a través del fluido mediante cizalladura y tensiones normales (es decir, disipación viscosa). La densidad del líquido (ρ), la viscosidad (η), la conductividad térmica (k) y la capacidad de calor (c_v) del agua, en función de la temperatura, son consideradas en el modelo.

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = \rho g + \nabla \cdot \left(\eta \left(\nabla \vec{v} + (\nabla \vec{v})^T - \frac{2}{3} \eta (\nabla \cdot \vec{v}) I \right) \right) - \nabla P \quad (15)$$

La predicción de temperatura y perfiles espaciales de la concentración de células de levadura activa, productividad de etanol, así como los perfiles de velocidad del líquido fueron generadas utilizando un solucionador de análisis de elemento finito (FEA) preinstalado, COMSOL. El ajuste de la predicción del modelo y los datos experimentales fue excelente. El sombrero, ubicado en la parte superior del reactor presenta mayor temperatura que el líquido y una menor concentración de biomasa. La velocidad de flujo laminar es independiente del tamaño del tanque, los gradientes de temperatura y las distancias para acelerar los fluidos (Miller et al., 2019b).

La incorporación de la dinámica de antocianinas y taninos a los modelos matemáticos de la fermentación para la producción de vino ha sido retomada en los últimos años. En una revisión realizada por Setford et al. (2017), se retoman las Ecuaciones 16 y 17 (anteriormente reportadas por Boulton (1996) y Zanoni et al. (2010)) para describir la extracción de antocianinas y taninos a partir de los hollejos y semillas de uva durante la fermentación.

$$\text{Antocianinas: } \frac{d[A]}{dt} = k_1[A_1 - A] - k_2 \quad (16)$$

$$\text{Taninos: } \frac{d[T]}{dt} = k_3[T_1 - T] - k_4 \quad (17)$$

Donde [A] y [T] son la concentración de antocianinas y taninos; T_1 y A_1 son la concentración de equilibrio para antocianinas y taninos; $k_{1,2,3,4}$ son las constantes de velocidad para los procesos de difusión y disolución, respectivamente.

La extracción de las antocianinas se lleva a cabo a través de un proceso de difusión y la disminución de su concentración se debe a las reacciones que sufren con el tiempo (Ecuación 16). En tanto, la concentración de taninos es producto de un proceso de disolución que es independiente de la concentración (Ecuación 17). El fenómeno de extracción de compuestos antioxidantes y fenólicos puede ser bien descrito por la segunda ley de la difusión de Fick, donde la velocidad de difusión es una función del gradiente de concentración de soluto y el coeficiente

de difusión interna. En un sistema donde la difusividad interna permanece constante, la extracción unidimensional para la extracción plana y radial de partículas esféricas se representa con la Ecuación 18 (Setford et al., 2018):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (18)$$

Donde C es la concentración instantánea de soluto, D es el coeficiente de difusión y x es la distancia de difusión interna. En un proceso de difusión controlada, donde los compuestos fenólicos se mueven de una región de alta concentración a una de menor concentración dentro del sólido, es probable que algunas variables de proceso tengan un impacto en la velocidad general de extracción, ya que influyen en el comportamiento interno y externo.

A partir de la simplificación de la segunda ley de difusión de Fick, Setford et al. (2019b) desarrollaron un modelo para la difusión de antocianinas, el cual se forma de una serie de ecuaciones diferenciales ordinarias (EDO) que describen la transferencia de masa macroscópica (Ecuaciones 19-22).

$$\varepsilon \frac{dc_\gamma}{dt} = kc_\gamma a(c_{\gamma i} - c_\gamma) \quad (19)$$

$$(1 - \varepsilon) \frac{dc_\beta}{dt} = kc_\beta a(c_{\beta i} - c_\beta) \quad (20)$$

$$kc_\gamma (c_{\gamma i} - c_\gamma) = -kc_\beta a(c_{\beta i} - c_\beta) \quad (21)$$

$$c_{\gamma i} = K_{c\beta i} \quad (22)$$

En estos modelos, ε es la fracción del volumen de disolvente; c es la concentración de fenoles en γ, β, i en la fase líquida, sólida y en la interfase sólido-líquido, respectivamente; a es el área específica para la transferencia de masa; k es la constante de distribución y D_s es la difusividad de masa del soluto.

La Ecuación (20) se relaciona con una solución analítica simplificada de la segunda ley de Fick, que describe el sistema a nivel microscópico para la difusión unidimensional a través de una hoja plana.

$$\frac{dC_{\beta}}{dt} = \frac{\pi^2 D_{s\beta}}{4L^2} (c_{\beta i} - c_{\beta}) \quad (23)$$

Para relacionar la difusión y la transferencia de masa dentro de la fase sólida se usa la Ecuación (24):

$$D_{s\beta} = \frac{k_{c\beta} 4L}{(1-\varepsilon)\pi^2} \quad (24)$$

El modelo de cinética microbiana (Ecuaciones 2-6) propuesto por Cramer et al. (2002) fue utilizado como base para simular la extracción de antocianinas bajo diferentes escenarios de fermentación. La transferencia de masa de antocianinas a diferentes concentraciones de azúcar y diferentes temperaturas fue considerada para construir modelos de superficie de respuesta utilizando un experimento factorial 2³. Se desarrollaron modelos de superficie de respuesta (R) para parámetros importantes de transferencia de masa con mayor sensibilidad a los valores dentro del diseño del experimento que no se midieron directamente. Se generaron superficies de respuesta para el coeficiente de transferencia de masa interna y la constante de distribución, mediante la cual se usaron valores en cada conjunto de condiciones para minimizar la suma de los residuos cuadrados de la siguiente función:

$$R = a_0 + a_1 T + a_2 C_s + a_3 C_{EtOH} + a_4 T C_s + a_5 T C_{EtOH} + a_6 C_s C_{EtOH} + A_7 T C_s C_{EtOH} \quad (25)$$

Donde, a_0 es el valor de la función en las condiciones del punto central; a_1 , a_2 , a_3 representan los efectos de los parámetros individuales asociados a sus respectivas variables; y a_4 , a_5 , a_6 y a_7 representan los efectos cruzados entre las variables. Para cada uno de los modelos respuesta, sólo se usaron aquellos términos considerados significativos por el ANOVA.

De acuerdo con el análisis efectuado, la concentración máxima de antocianinas extraídas en la fase líquida mejora cuando se incrementa la temperatura y la cantidad de etanol. El mezclado que se realiza en las etapas finales de la fermentación, cuando la concentración de etanol es alta, tiene alta influencia en la concentración final de antocianinas. En cambio, las operaciones de mezclado

que se realizan durante las primeras etapas de la fermentación tienen poco impacto. Las concentraciones de antocianinas derivadas de manera experimental y matemática han presentado un coeficiente de correlación mayor 0.94 en todos los casos.

Miller et al. (2019a) propusieron un modelo mecanicista que examina la liberación y la adsorción de fenólicos en la piel de la uva, así como la desaparición de antocianinas en la solución. El modelo también incorpora los taninos de la piel y los taninos de las semillas durante la fermentación en función de la temperatura y el etanol. El sistema de ecuaciones formulado está constituido por las Ecuaciones (26) a (31):

$$C_{i,G}^0 = C_{i,G} + C_{i,S} + C_{i,F} + C_{i,R} + C_{i,U} \quad (26)$$

$$\frac{dC_{Anth,skin}}{dt} = -k_{G,Anth} \cdot (C_{Anth,G} - C_{Anth,F}) \quad (27)$$

$$\frac{dC_{Tan,skin}}{dt} = -k_{G,Tan,skin} \cdot (C_{Tan,G} - C_{Tan,F}) \quad (28)$$

$$\frac{dC_{Tan,seed}}{dt} = -k_{G,Tan,Seed} \quad (29)$$

$$q_i \equiv \frac{g_{i,ads}}{g_{adsorbato}} \equiv \frac{C_{i,S}}{T \times \varphi} = \frac{(q_i)_m K_i C_{i,F}}{1 + \sum_j K_j C_{j,F}} \quad (30)$$

$$\frac{dC_{Anth,R}}{dt} = -k_{R,Anth} \quad (31)$$

Donde: C representa la concentración de la especie en cuestión; Tan y $Anth$ representan a los taninos y antocianinas; el superíndice 0 indica la concentración inicial y los subíndices G, S, F, R, U son el compuesto de interés sin liberar en el material vegetal, adsorbido en la superficie, libre en la solución, el que hizo reacción y el que no está disponible, respectivamente. En tanto, k es la velocidad de liberación del compuesto.

Las Ecuaciones (30) y (31) describen el equilibrio de adsorción de fenoles y la cinética de desaparición de antocianinas en solución, respectivamente. En las ecuaciones T es la cantidad de material de la pared celular de la uva por gramo

de uva; j es la fracción del material de la pared celular disponible para la adsorción q_i ; m -es la capacidad de adsorción de las especies i en el material de la pared celular; y K_i es la constante de equilibrio de adsorción de Langmuir asociada a la especie i . T y φ son parámetros libres del modelo.

Posteriormente Miller et al. (2020) desarrollaron un modelo espacial de ingeniería de reactor variable en el tiempo para la extracción de antioxidantes. El modelo consistió en dos partes conceptuales: la fermentación dinámica y la extracción de fenoles (Ecuaciones 26-31). El modelo de fermentación integró la cinética de fermentación propuesta por Cramer et al. (2002) y Coleman et al. (2007), el flujo de fluido a través de ecuaciones de Navier-Stokes, la transferencia de masa convectiva-difusiva y la transferencia de calor convectiva-conductiva, cuya explicación se hizo anteriormente.

El modelo propuesto representó un avance crítico en la comprensión de los mecanismos subyacentes a la extracción fenólica durante la fermentación de un vino tinto, especialmente la extracción de taninos de las semillas. Además, ha sido útil para optimizar las tasas de extracción de antocianinas, taninos de la piel y taninos de la semilla, mediante el control de temperatura, tasa de fermentación y tiempo de prensado (Miller et al., 2020).

2.5 Aplicaciones y oportunidades de mejora en el modelado

Se ha mencionado en el documento que la extracción de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas y taninos, y sus reacciones durante la fermentación alcohólica; son de vital importancia para obtener una bebida de calidad. Al respecto, se han desarrollado modelos dinámicos para la comprensión de los mecanismos de extracción de antocianinas y taninos de la piel y semilla de la uva durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, a dichos modelos no se han integrado los cambios que les ocurren a los compuestos fenólicos durante el envejecimiento del vino. La consideración de las condiciones de fermentación, tales como pH y las químicas complementarias, permitirá obtener un comportamiento fenólico dinámico más completo. Las principales reacciones que

podrían integrarse a los modelos propuestos son la copigmentación y la polimerización, porque éstas se desarrollan durante la fermentación y añejamiento del vino. También, es necesario integrar la reacción de formación de piranoantocianinas, ya que conduce a la formación de pigmentos estabilizadores del color. Esta reacción, ocurre entre las antocianinas libres y ciertos productos de la levadura, tales como el acetaldehído, ácido pirúvico y vinil fenoles. Por lo tanto, es necesario formular ecuaciones diferenciales ordinarias que las describan.

Los modelos dinámicos de fermentación y extracción de antioxidantes desarrollados (Miller et al., 2020; Setford et al., 2019) han sido aplicados hasta ahora a la fermentación de frutos de uva para la producción de vino. Sin embargo, no se han evaluado en la fermentación de la elaboración de bebidas fermentadas con otros frutos. La aplicación de los modelos antes de llevar a cabo la fermentación puede proporcionar información detallada y precisa sobre las características a obtener en un vino de otra fruta, así como, el tiempo de maceración fermentativa óptimo para controlar los compuestos fenólicos y favorecer el color y sabor del producto. Además, la información generada, con los modelos, sobre el comportamiento químico espacial proporciona la base para considerar la geometría óptima para la fermentación. Para establecer la geometría, del fermentador, se deben considerar también el control de la temperatura y el mezclado óptimo del sistema, ya que estas variables afectan de manera importante la actividad de la levadura, la homogeneidad y extracción de los compuestos fenólicos y la disminución de la formación de compuestos de degradación dentro del bioreactor (Cissé et al., 2012).

La aplicación de movimiento durante la fermentación permite la homogenización de la temperatura y la parte sólida de la uva, alterando la cinética de la levadura y la velocidad de extracción de los compuestos fenólicos. En forma paralela, las reacciones efectuadas entre las antocianinas se ven alteradas por el mezclado. Las antocianinas disueltas en un medio acuoso sufren transformaciones estructurales durante la fermentación y están presentes en un equilibrio complejo

que consta de varias especies diferentes. Por lo tanto, la descomposición o transformación de las diferentes antocianinas presentes en los frutos durante la fermentación aporta diferentes tonalidades y en consecuencia tendrá una aportación determinada al color final del producto fermentado. La cuantificación experimental de los cambios respecto a determinada antocianina es posible atenderla mediante los espectros de absorción siendo HPLC. Sin embargo, debido a que la accesibilidad a análisis con HPLC es limitada, es necesaria la aplicación de métodos numéricos para desarrollar perfiles químicos más detallados de las sustancias fenólicas en el producto.

2.6 Literatura citada

- Alonso-Del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., & Querol, A. (2017). Effect of Temperature on the Prevalence of *Saccharomyces Non cerevisiae* Species against a *S. cerevisiae* Wine Strain in Wine Fermentation: Competition, Physiological Fitness, and Influence in Final Wine Composition. *Frontiers in microbiology*, 8, 150-150. doi: 10.3389/fmicb.2017.00150
- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, 197, 39-46. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.095>
- Boulton, R. B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1996). (Ed.), Red and white table wines. Principles and practices of winemaking. Cap.1, p.585.
- Brillouet, J.-M., Romieu, C., Schoefs, B., Solymosi, K., Cheynier, V., Fulcrand, H., . . . Conéjéro, G. (2013). The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Annals of Botany*, 112 (6), 1003-1014. doi: 10.1093/aob/mct168
- Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M., Dornier, M. (2012). Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109 (1), 16-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.012>

- Coleman, M. C., Fish, R., Block, D. E. (2007). Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Applied and environmental microbiology*, 73 (18), 5875-5884. doi: 10.1128/aem.00670-07
- Cramer, A. C., Vlassides, S., Block, D. E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 77 (1), 49-60. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.10133>
- Cheyner, V. Flavonoids in Vine. In O. M. A. K. R. (2006). Markham (Ed.), *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Taylor and Francis Group. Cap.5, p. 273-299.
- Egidio, V., Sinelli, N., Moles, A., Casiraghi, E. (2010). NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *European Food Research and Technology*, 230, 947-955. doi: 10.1007/s00217-010-1227-5
- Elez-Garofulić, I., Kovačević Ganić, K., Galić, I., Dragović-Uzelac, V. i Savić, Z. (2012). The Influence of Processing on Physico-chemical Parameters, Phenolics, Antioxidant Activity and Sensory Attributes of Elderberry (*Sambucus nigra* L.) Fruit Wine. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 7 (7), 9-13.
- Escribano-Bailón, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., García-Estévez, I. (2019). Chapter 13 - Wine Color Evolution and Stability. In A. Morata (Ed.), *Red Wine Technology*. Academic Press. Cap.13, p. 195-205.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19 (3), 286-291. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.08.004>
- Forino, M., Picariello, L., Rinaldi, A., Moio, L., Gambuti, A. (2020). How must pH affect the level of red wine phenols. *LWT*, 129, 109546. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109546>
- Gao, J., Xi, Z., Zhang, J., Guo, Z., Chen, T., Fang, Y., . . . Liu, J. (2012). Influence of Fermentation Method on Phenolics, Antioxidant Capacity, and Volatiles in

- Blackberry Wines. *Analytical Letters*, 45 (17), 2603-2622. doi: 10.1080/00032719.2012.696223
- Garzón, G. A. (2008). Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds: A review. *Acta Biológica Colombiana*, 13 (3), 27-36. URL: www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120548X2008000300002&script=sci_abstract&tlng=pt
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55 (2), 202-218. doi:10.1080/10408398.2011.650336
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, 17 (2), 1483-1519. doi: 10.3390/molecules17021483
- He, G., Sui, J., Du, J., Lin, J. (2013). Characteristics and antioxidant capacities of five hawthorn wines fermented by different wine yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, 119 (4), 321-327. doi: <https://doi.org/10.1002/jib.101>
- Hermosín Gutiérrez, I. (2003). Influence of Ethanol Content on the Extent of Copigmentation in a Cencibel Young Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (14), 4079-4083. doi: 10.1021/jf021029k
- Hussain, A., Bose, S., Wang, J.-H., Yadav, M. K., Mahajan, G. B., Kim, H. (2016). Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. *Food Research International*, 81,1-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.026>
- Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S. (2009). Effects of different maceration times and pectolytic enzyme addition on the anthocyanin composition of *Vitis vinifera* CV. Kalecik karasi wines. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33 (3), 296-311. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00245.x>

- Khoo, H. E.; Azlan, A.; Tang, S. T.; Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & nutrition research*, 61 (1),1361779. doi: 10.1080/16546628.2017.1361779
- Lambert, S. G.; Asenstorfer, R. E.; Williamson, N. M.; Iland, P. G.; Jones, G. P. (2011). Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chemistry*, 125 (1), 106-115. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.045>
- Li, S.-Y.; Duan, C.-Q. (2019). Astringency, bitterness and color changes in dry red wines before and during oak barrel aging: An updated phenolic perspective review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59 (12), 1840-1867. doi: 10.1080/10408398.2018.1431762
- Ma, W.; Guo, A.; Zhang, Y.; Wang, H.; Liu, Y.; Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science & Technology*, 40 (1), 6-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.001>
- Marquez, A.; Serratos, M. P.; Merida, J. (2013). Pyranoanthocyanin Derived Pigments in Wine: Structure and Formation during Winemaking. *Journal of Chemistry*, 713028. doi: 10.1155/2013/713028
- Miller, K. V.; Noguera, R.; Beaver, J.; Medina-Plaza, C.; Oberholster, A.; Block, D. E. A (2019a). Mechanistic Model for the Extraction of Phenolics from Grapes During Red Wine Fermentation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(7), 1275. doi: 10.3390/molecules24071275
- Miller, K. V.; Oberholster, A.; Block, D. E.(2019b). Creation and validation of a reactor engineering model for multiphase red wine fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 116 (4), 781-792. doi: 10.1002/bit.26874
- Miller, K. V., Noguera, R., Beaver, J., Oberholster, A., Block, D. E.(2020). A combined phenolic extraction and fermentation reactor engineering model

- for multiphase red wine fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 117(1), 109-116. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.27178>
- Montes-Ávila, J., López-Angulo, G., Delgado-Vargas, F. (2017). Tannins in Fruits and Vegetables: Chemistry and Biological Functions. In E. M. Yahia (Ed.), *Fruit and Vegetable Phytochemicals*. John Wiley & Sons. 2017. Cap.13, p. 221-268.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Hashizume, K. (2007). Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *Journal of Experimental Botany*, 58 (8), 1935-1945. doi: 10.1093/jxb/erm055
- Nel, A. P. (2018). Tannins and Anthocyanins: From Their Origin to Wine Analysis – A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(1), 20. doi: 10.21548/39-1-1503
- Pérez-Gregorio, M. R., Regueiro, J., Alonso-González, E., Pastrana-Castro, L. M., Simal-Gándara, J. (2011). Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 44 (8), 1793-1801. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.007>
- Pervaiz, T., Songtao, J., Faghihi, F., Haider, M. S., Fang, J. (2017). Naturally occurring anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 5(2),1-9. doi: 10.4172/2329-9029.1000187
- Rousserie, P., Rabot, A., Geny-Denis, L. (2019). From Flavanols Biosynthesis to Wine Tannins: What Place for Grape Seeds?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(5), 1325-1343. doi: 10.1021/acs.jafc.8b05768
- Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, C. G. (2021). Influence of Temperature during Pre-Fermentative Maceration and Alcoholic Fermentation on the Phenolic Composition of 'Cabernet Sauvignon' Wines. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(5), 1053. doi: 10.3390/foods10051053

- Ruta, L. L., Farcasanu, I. C. (2019). Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Products in Yeast-Fermented Beverages. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(6), 182. doi: 10.3390/antiox8060182
- Sainz, J., Pizarro, F., Pérez-Correa, J., Agosin, E. (2003). Modeling of yeast metabolism and process dynamics in batch fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 81, 818-828. doi: 10.1002/bit.10535
- Samoticha, J., Wojdyło, A., Chmielewska, J., Nofer, J. (2019). Effect of Different Yeast Strains and Temperature of Fermentation on Basic Enological Parameters, Polyphenols and Volatile Compounds of Aurore White Wine. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(12), 599. doi: 10.3390/foods8120599
- Sener, H. (2018). Effect of Temperature and Duration of Maceration on Colour and Sensory Properties of Red Wine: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39, 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.21548/39-2-3160>
- Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., Muhlack, R. A. (2017). Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 106-117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.005>
- Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., Muhlack, R. A. (2018) Modelling the Mass Transfer Process of Malvidin-3-Glucoside during Simulated Extraction from Fresh Grape Solids under Wine-Like Conditions. *Molecules*, 23(9), 2159. doi: 10.3390/molecules23092159
- Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., Muhlack, R. A. (2019). Mathematical modelling of anthocyanin mass transfer to predict extraction in simulated red wine fermentation scenarios. *Food Research International*, 121, 705-713. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.044>
- Tao, Y., Wang, Y., Yang, J., Wang, Q., Jiang, N., Chu, D.-T., . . . Zhou, J. (2017). Chemical composition and sensory profiles of mulberry wines as fermented with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Properties*, 20, 2006-2021. doi: 10.1080/10942912.2017.1361970

- Wang, L., Sun, X., Li, F., Yu, D., Liu, X., Huang, W., Zhan, J. (2015). Dynamic changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity of mulberry wine during alcoholic fermentation. *Journal of functional foods*, 18, 254-265. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.013>
- Zanoni, B., Siliani, S., Canuti, V., Rosi, I., Bertuccioli, M. (2010). A kinetic study on extraction and transformation phenomena of phenolic compounds during red wine fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(10), 2080-2088. doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02374.x
- Zhang, B., He, F., Zhou, P.-P., Liu, Y., Duan, C.-Q. (2016). The color expression of copigmentation between malvidin-3-O-glucoside and three phenolic aldehydes in model solutions: The effects of pH and molar ratio. *Food Chemistry*, 199, 220-228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.008>

3. SEPARACIÓN DE ANTOCIANINAS MEDIANTE EXTRACCIÓN ACUOSA EN DOS FASES: UN ESTUDIO BIBLIOMÉTRICO

Resumen

Las antocianinas son compuestos fenólicos con propiedades cromóforas que pueden ser aplicados diversos productos para mejorar su apariencia. Generalmente se extraen utilizando diferentes disolventes orgánicos; sin embargo, ese método de extracción implica altos costos de proceso. El uso de antocianinas en el mercado implica un método de extracción amplio y fácilmente escalable. La extracción acuosa en dos fases (ATPE) es una alternativa que simplifica la extracción y es de fácil escalamiento. En ese sentido, el objetivo del trabajo fue construir el estado del arte de la purificación de antocianinas con extracción acuosa en dos fases, para visualizar la evolución y tendencias del conocimiento en esta área, sintetizar los hallazgos clave de investigaciones previas e identificar las áreas donde se requiere realizar más investigación. La plataforma Web of Science de Clarivate Analytics y Scopus fueron consideradas para el seguimiento de los artículos publicados. Se obtuvo una muestra de 32 documentos. Los datos obtenidos fueron procesados y graficados utilizando el software VOSviewer. En el estudio se analizaron las publicaciones por año, tendencias de documentos citados, coautoría, revistas, países e instituciones, así como literatura sobre el aislamiento de antocianinas con la técnica ATPE. El país líder en investigaciones sobre este tema es China con 34 %. Existen dos publicaciones con más de 120 citas que corresponden a los artículos más citados. Los componentes de los ATPE más utilizados para el aislamiento de antocianinas son etanol/sal, su uso permite obtener extractos concentrados de antocianinas sin alterar su estructura original. Actualmente, se han integrado otros componentes a los ATPE para mejorar los procesos de aislamiento. Además, el uso, interés y aplicación de ATPE para purificar antocianinas es vigente y está en constante crecimiento.

Palabras clave: Análisis bibliométrico, Extracción acuosa en dos fases, bases de datos, pigmentos naturales, sistema etanol/sal.

Tesis de Doctorado en Ingeniería del Programa de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Guillermina Hernández Rodríguez

Director de tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama

Abstract

Anthocyanins are phenolic compounds with chromophore properties that can be applied to various products to improve their appearance. They are generally extracted using different organic solvents; however, this extraction method involves high process costs. The use of anthocyanins in the market involves a broad and easily scalable extraction method. Aqueous two-phase extraction (ATPE) is an alternative that simplifies extraction and is easy to scale up. In this sense, the objective of the work was to build the state of the art of anthocyanin purification with aqueous extraction in two phases, to visualize the evolution and trends of knowledge in this area, synthesize the key findings of previous research and identify the areas where more research is required. The Web of Science and Scopus platforms were considered for monitoring published articles. A sample of 32 documents was obtained. The data obtained were processed and graphed using the VOSviewer software. The study analyzed publications by year, trends in cited documents, co-authorship, journals, countries, and institutions, as well as literature on the isolation of anthocyanins with the ATPE technique. The leading country in research on this topic is China with 34%. There are two publications with more than 120 citations that correspond to the most cited articles. The components most used of ATPE for the isolation of anthocyanins are ethanol/salt; their use allows obtaining concentrated extracts of anthocyanins without altering their original structure. Currently, other components have been integrated into ATPEs to improve isolation processes. Furthermore, the use, interest, and application of ATPE to purify anthocyanins is current and on constantly growing.

Keywords: Bibliometric analysis, Two-phase aqueous extraction, databases, natural pigments, ethanol/salt system

3.1 Introducción

Las antocianinas son pigmentos de origen vegetal de la familia de los compuestos fenólicos y también pertenecen a la subclase de los flavonoides. Proporcionan una amplia gama de colores entre naranja, rojo, morado y azul; encontrados en muchas frutas y verduras (Oladzadabbasabadi et al., 2022); presentan actividad antioxidante, anti-inflamatoria y antimicrobiana; su consumo ha sido benéfico para el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas, inflamación gastrointestinal y enfermedades neurodegenerativas (Braga, Murador, de Souza Mesquita, & de Rosso, 2018); también tienen efecto positivo en disminuir problemas de salud asociados con la obesidad y diferentes tipos de cáncer (Gomes et al., 2019; Li et al., 2021; Zhang et al., 2019).

Estos pigmentos ya han sido utilizados en la industria alimentaria, textil y cosmética como fuentes de color, para mejorar el aspecto de los productos (Brudzyńska, Sionkowska, & Grisel, 2021). Se han aplicado porque, además de proporcionar color y presentar actividad antioxidante, son menos tóxicos, menos alergénicos y se pueden consumir en mayores dosis que los colorantes sintéticos (Bridle & Timberlake, 1997). Las antocianinas obtenidas de uva, azafrán, zanahoria, remolacha y algas ya han sido aplicadas para pigmentar diversos alimentos (Kanarek, 2011). Su aplicación en diferentes productos ha motivado a desarrollar diversas técnicas de extracción, aislamiento y recuperación que permitan aumentar su estabilidad y vida útil.

En los métodos de extracción convencional las antocianinas generalmente se extraen como una mezcla cruda que contiene, además, otro tipo de sustancias como azúcares, ácidos grasos, proteínas y otros contaminantes. En consecuencia, su aislamiento y purificación implica el uso de métodos de separación complementarios como resinas de adsorción/desorción, de intercambio catiónico, procesos de osmosis directa, entre otros (Tena & Asuero, 2022). Sin embargo, los procesos descritos incrementan los costos y el tiempo de operación. Se sabe que la recuperación de cualquier metabolito debe ser suficientemente efectiva para evitar pérdidas y altos costos en el producto final,

lo que indica que las operaciones de proceso deben minimizarse (Varadavenkatesan, Pai, Vinayagam, Pugazhendhi, & Selvaraj, 2021).

Los sistemas acuosos bifásicos (ATPS O ABS, por sus siglas en inglés) constituyen una técnica prometedora que permite realizar la purificación y concentración de antocianinas. ATPS es reconocida como una técnica sencilla, emergente, eficiente, económica, versátil y de fácil escalamiento para el procesamiento de productos biotecnológicos. En las últimas dos décadas ha aumentado el interés en los ATPS por su potencial para evitar las limitaciones técnicas que implica el procesamiento posterior en la purificación de un extracto (Phong, Show, Chow, & Ling, 2018; Vicente et al., 2023). Además, ofrecen un mayor rendimiento con menor tiempo de procesamiento y son una alternativa para hacer frente a los actuales procesos biotecnológicos de recuperación que son más tardados (Phong, Show, Chow, & Ling, 2018). Con este procedimiento las antocianinas se han podido extraer, separar y purificar. Los ATPS que se han utilizado son formados por soluciones acuosas de dos polímeros, un polímero y una sal o por un extractante hidrofílico y una sal (Ahmadiani, Sigurdson, Robbins, Collins, & Giusti, 2019; Goja, Yang, Cui, & Li, 2013). A pesar de tener diferente composición, el uso de estos sistemas destaca por los altos porcentajes de recuperación de antocianinas (> 90 %) que muestran mayor pureza y estabilidad. Debido a la creciente relevancia de los ATPS para separar antocianinas, es necesario analizar el estado del arte del tema, para sistema su aplicación, así como para identificar los problemas de su uso y proponer alternativas de solución. El análisis bibliométrico es un método útil para realizar una retrospectiva de áreas temáticas amplias (Donthu, Kumar, Mukherjee, Pandey, & Lim, 2021). Es una herramienta que ayuda a determinar los temas que son tendencia mediante el análisis cuantitativo de documentos publicados de un área temática determinada (Granda-Orive et al., 2013). También, permite obtener fácilmente información de interés entre un gran volumen de artículos científicos publicados sobre un tema específico. Con esta técnica se pueden guiar estudios futuros al determinar la calidad y las principales áreas de investigación de las publicaciones existentes en un campo en particular (Donthu et al., 2021; Soytaş, 2021). Una de las

principales fuentes de información utilizada para realizar un estudio bibliométrico son las bases de datos científicas (Granda-Orive et al., 2013), las cuales constituyen un conjunto de datos organizados en una secuencia lógica, con información actualizada, que puede ser utilizada y operada en cualquier momento con algún programa informático con el que se esté conectado. En tal contexto, el objetivo del trabajo fue construir el estado del arte de la purificación de antocianinas con extracción acuosa en dos fases, para visualizar la evolución y tendencias del conocimiento en esta área, para sintetizar los hallazgos clave de investigaciones previas e identificar las áreas donde se requiere realizar más investigación.

3.2 Materiales y métodos

El trabajo se llevó a cabo mediante un análisis bibliométrico en dos etapas: en la primera se recopiló la información considerando criterios de búsqueda de información relacionada con el tema y en la segunda se realizó el análisis y visualización de esta, para construir el estado del arte.

Se utilizaron bases de datos para recopilar información. Web of Science de Clarivate Analytics es una base de datos que dispone de bastas referencias y se ha mantenido a la vanguardia durante décadas. Scopus, de Elsevier Science, es una base de datos que surgió en 2004, pero rápidamente se ha convertido en una de las principales bases de datos científicos (Sánchez, de la Cruz Del Río Rama, & García, 2017). Ambas fueron consideradas para el acopio de información debido a que son bases de datos indexadas, accesibles, multidisciplinarias y contienen amplia información científica en la forma de resúmenes, datos bibliográficos, referencias y citas de artículos (Granda-Orive et al., 2013).

Se realizaron búsquedas en estas bases de datos con los términos de "aqueous two-phase extraction", "aqueous two phase extraction", "aqueous byfasic systems", "salting out systems", "aqueous two phase systems" and "anthocyanins", todos considerados en el idioma inglés. Los trabajos incluidos

fueron aquéllos que tuvieron algún término relacionado a extracción acuosa en dos fases y antocianinas en el título, resumen o palabras clave. Con la finalidad de analizar las publicaciones más recientes, visualizar el desarrollo y la evolución del tema, se seleccionaron los artículos correspondientes al periodo de 2005 a 2023.

En cada una de las bases de datos consultadas se seleccionaron de forma manual aquellas publicaciones que cumplieron con los requisitos indicados y se exportó un archivo en formato csv que contenía la siguiente información de cada uno de los artículos incluidos: autores, título del documento, afiliación, revista, idioma, resumen, palabras clave, tipo de acceso. A partir de los archivos generados, se eligió el de Scopus para agregar, de forma manual, la información de las publicaciones que sólo se encontraron en Web of Science.

Se utilizó el software VOSviewer (van Eck & Waltman, 2010). Se importó el archivo csv obtenido y se llevó a cabo el análisis de red de coautorías considerando un punto de corte ≥ 2 ; es decir, se seleccionaron sólo los autores que han publicado por lo menos dos artículos citados más de una vez. También, se realizó un análisis de co-ocurrencia con 63 términos generados automáticamente y un punto de corte ≥ 2 . Se utilizó un archivo de thesaurus para considerar los sinónimos encontrados en las publicaciones consideradas. Alcohol/salt systems fue considerado como alcohol-salt-systems, anthocyanin como anthocyanins, aqueous two-phase extraction y aqueous two-phase system(s) fueron consideradas como aqueous two-phase, microwave y microwave-assisted como microwave-assisted extraction, microwave-assisted aqueous two-phase system como microwave-assisted aqueous two-phase extraction, ultrasonics, ultrasound, como ultrasound-assisted extraction, morus morus, morus (angiosperm), morus atropurpurea y mulberry como morus, entre otros. De las palabras clave seleccionadas se eliminaron article y controlled study. En ambos análisis para clusterizar se utilizó el método de association strength. Para el análisis de coautorías la fuerza de atracción fue 2 y la de

repulsión -1, mientras que para el de co-ocurrencia la fuerza de atracción fue 2 y la de repulsión fue 0.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Análisis general

En la base de datos de Web of Science se encontraron 493 documentos relacionados con las palabras clave consideradas, de los cuales se eligieron 17. En tanto, de la base de datos de Scopus fueron seleccionados 28 de los 30 documentos relacionados utilizando los mismos criterios de búsqueda. El total de documentos considerados para realizar este análisis fue de 32, de los cuales 15 fueron localizados en ambas bases de datos. En la Figura 2 se observa la distribución en el tiempo de los documentos publicados relacionados con la purificación de antocianinas utilizando extracción acuosa en dos fases. En los últimos tres años se han publicado el 34.4 % del total de artículos relacionados con este tema.

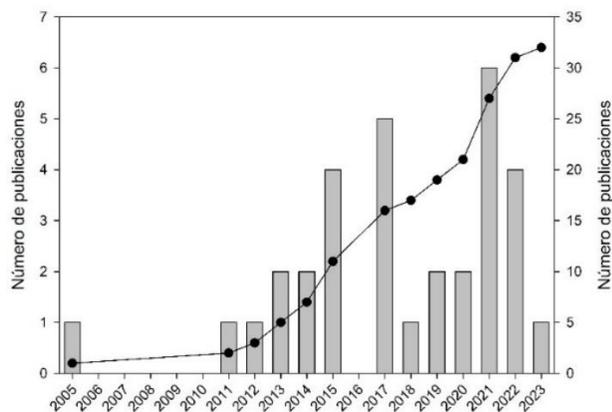


Fig. 2. Evolución de documentos publicados sobre extracción acuosa en dos fases relacionada con antocianinas.

La consulta efectuada en las bases de datos mencionadas permitió identificar que el artículo científico es el tipo de documento principal de difusión de resultados. Del total de las publicaciones analizadas el 71.4 % correspondió a la modalidad de acceso abierto y el 26.4 % a pago o suscripción. Los seis artículos más citados se enlistan en el Cuadro 2. El tema central de las publicaciones es la optimización de la extracción eficiente de antocianinas de mora, uva y papa

utilizando extracción acuosa en dos fases; así como su bioaccesibilidad invitro y su actividad antioxidante. De acuerdo con la información obtenida, el 40 % de las publicaciones se pueden consultar de forma gratuita mientras el porcentaje restante sólo mediante pago o suscripción. A pesar de que el acceso gratuito pudiera estar relacionado con la frecuencia de consulta de una publicación, de acuerdo con este análisis la publicación que ha recibido más citas se encuentra bajo la modalidad de pago o suscripción. El segundo artículo más citado corresponde al mismo grupo de investigación y su acceso es gratuito. Cabe destacar que los autores participantes en tales artículos son pioneros en el tema aspecto que puede influir en el número de citas que presentan.

Cuadro 2. Clasificación de los principales trabajos referentes a purificación de antocianinas utilizando extracción acuosa en dos fases de acuerdo con el número de citas y tipo de acceso.

DOI	Autores	Número de citas	Tipo de acceso	Año
https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.024	Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., ... & Yang, L.	158	Pago o suscripción	2012
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.097	Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., & Yang, L.	124	Abierto	2011
https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.119	Liu, X., Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Chen, J.	99	Abierto	2013
https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.025	Wu, Y., Wang, Y., Zhang, W., Han, J., Liu, Y., Hu, Y., & Ni, L.	65	Pago o suscripción	2014
https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.134	Yin, Y., Jia, J., Wang, C.	55	Pago o suscripción	2017
https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.006	Lima, Á. S., Soares, C. M. F., Paltram, R., Halbwirth, H., & Bica, K.	51	Pago o suscripción	2017

El idioma utilizado en la escritura de los artículos fue inglés. Las investigaciones sobre extracción acuosa en dos fases relacionadas con antocianinas se han publicado en 28 revistas, de las cuales 22 pertenecen al continente europeo (15

pertenecen a la base de datos de Scopus), cinco son publicadas en América y una en Asia. Las revistas en las que se ha publicado abarcan principalmente temas sobre Agricultura y Ciencias Biológicas, Bioquímica, Química e Ingeniería Química. Separation and Purification Technology es la revista líder con cuatro publicaciones sobre el tema, las cuáles han recibido 118 citas. En segundo lugar, con dos publicaciones, están la revista Food Chemistry y Food and Bioproducts Processing. El número de citas que suman por las publicaciones son 221 y 30, respectivamente. En las demás revistas consideradas sólo se ha publicado un artículo referente al tema. El artículo con mayor número de citas fue publicado en la revista Food Research International. El número de citas está relacionado con el factor de impacto y el índice H de la revista. Al respecto Food Chemistry tiene valores de 8.8 y 302, mientras que para Food and Bioproducts Processing los valores son de 4.6 y 90, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Principales revistas que han publicado sobre extracción acuosa en dos fases relacionadas con antocianinas.

Revista	Publicaciones	Citas	Índice H	Factor de impacto
Separation and Purification Technology	4	118	191	8.6
Food Chemistry	2	221	302	8.8
Food and Bioproducts Processing	2	30	90	4.6
Food Research International	1	159	195	8.1

Con base en la adscripción del primer autor, el 54.84 % de las investigaciones consideradas en el análisis se han desarrollado en instituciones en China, el 19.4 % en India, el 9.68 % en Brasil, el 6.45 % en Turquía y el porcentaje restante distribuido de forma equitativa entre instituciones de Canadá, Italia, Vietnam y Japón (Figura 3). Del total de investigaciones analizadas, 13 se llevaron a cabo en una sola institución, y en el resto participaron 2 o 3 centros de investigación.

De acuerdo con la adscripción de los autores que participan en las publicaciones, se identificó la colaboración entre instituciones de China, con Japón, China con USA, Brasil con Italia, Brasil con Austria, y Brasil con Portugal y Austria. El 34 % del total de las investigaciones consideradas se desarrollaron en tres instituciones, una ubicada en China (Universidad de Jiangu) y dos en India (Instituto Nacional de Tecnología de Karnataka e Instituto Central de Investigaciones Tecnológicas de Alimentos).

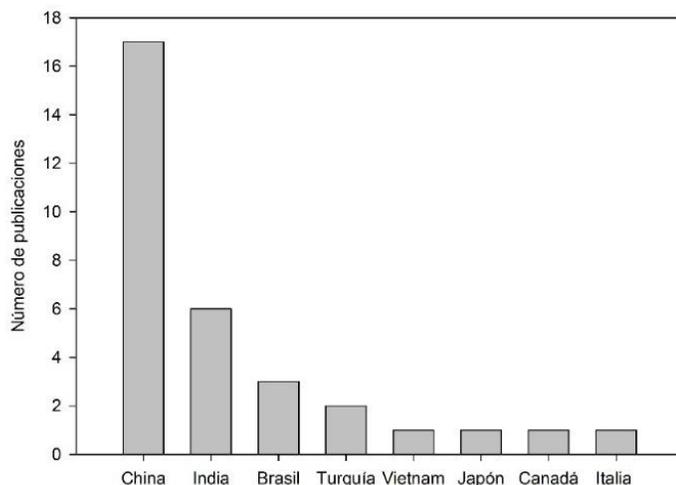


Fig. 3. País de correspondencia del primer autor con mayores publicaciones sobre extracción acuosa en dos fases relacionadas con antocianinas.

El progreso de la ciencia ha sido producto del esfuerzo de investigadores que interactúan a través de redes de colaboración; las cuales afectan la calidad y el alcance de una investigación (Danús et al., 2023). En la Figura 4 se muestra la distribución de los trabajos considerando el número de autores. Según la información presentada, se identificó que todos los trabajos consultados han sido desarrollados en coautoría, siendo la participación de 2 y 5 autores las más frecuentes.



Fig. 4 Distribución del número de autores por publicación. AA: número de autores por artículo.

Las relaciones de coautoría tuvieron de 0 a 33 colaboraciones, sin embargo, no se encontraron relaciones entre grupos de investigación. En la Figura 5 se observa la relación de 10 los clústeres de acuerdo con el año en que se desarrollaron las investigaciones. El clúster morado está relacionado con los artículos más citados, que fueron desarrollados en 2011-2012. En tanto, los que tienen coloraciones naranjas corresponden a los artículos más recientes. Los investigadores Yang Y., Caldeira A. C. R., Koca I. y Li B., son los líderes de tales grupos de investigación. Dos de los grupos desarrollan investigación en China, uno en Turquía y otro en Brasil con colaboradores de Italia. En América latina la investigación se ha desarrollado principalmente en el programa de Posgrado de ingeniería de Procesos de la Universidad de Tiradentes y el Instituto de Ciencias Agrarias de la Universidad Federal de Minas ambas ubicadas en Brasil.

Los enfoques actuales de la investigación descrita en el estudio fueron identificados mediante las palabras clave indexadas de los artículos considerados. A partir de los términos generados automáticamente se obtuvieron seis clústeres. En cada uno se observa la asociación en grupos temáticos y su relación (Figura 6), las cuales se describen a continuación.

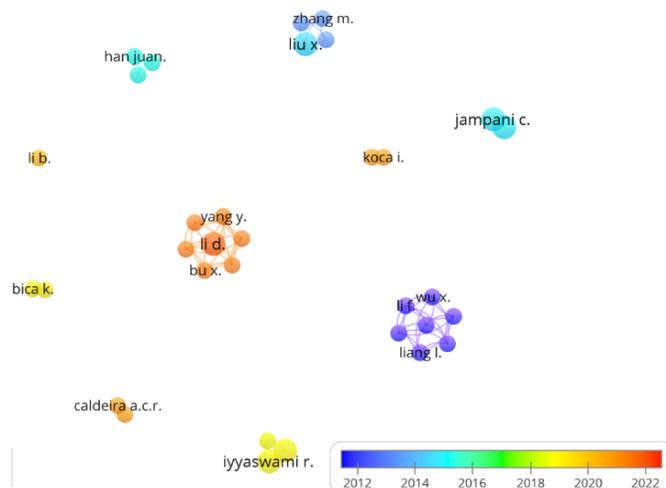


Fig. 5. Diagrama de densidad de red de coautorías relacionadas con el año de publicación.

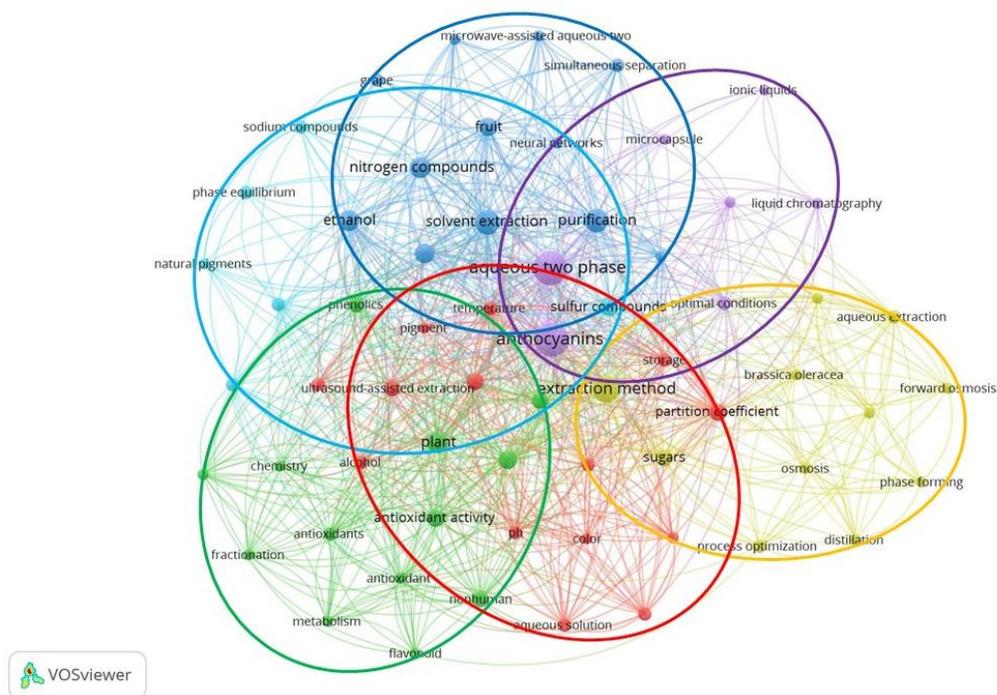


Fig. 6. Mapa bibliométrico de la red de coocurrencias de las palabras clave indexadas en publicaciones sobre extracción acuosa en dos fases relacionadas con antocianinas.

3.3.2 Clúster 1. Desarrollo de los ATPS para la purificación, conservación y estabilidad de antocianinas

La extracción, purificación y concentración de antocianinas a partir de material vegetal se ha llevado a cabo utilizando ATPS polímero-polímero, polímero-sal y alcohol-sal, los cuales han sido desarrollados aplicando el método de titulación turbidimétrica. La composición de los sistemas tiene influencia en el rendimiento de partición de antocianinas, el peso molecular del polímero, el tipo de sal, y el tipo de alcohol utilizado. Asimismo, la concentración determina la estabilidad de los pigmentos y el volumen de las fases obtenidas. A su vez, las características de tamaño, carga e hidrofobicidad de la biomolécula objetivo también influyen en su partición. Las antocianinas son compuestos hidrosolubles de origen vegetal que proporcionan diferentes colores determinados por los sustituyentes (metoxilo e hidroxilo), su glicosilación y acilación (Bueno et al., 2012). Bajo condiciones de pH ácidas (1-3) presentan coloraciones rojizas y mayor estabilidad, en cambio condiciones de pH neutro y alcalino favorecen su degradación. Para separarlas con ATPSs es necesario que los componentes del sistema favorezcan la condición de pH para que puedan conservar su estructura.

Edahiro et al., (2005) utilizaron un ATPS polímero/polímero, a partir de 7 % de dextrano T500 y 4.4 % de polietilenglicol (PEG)6000, para separar antocianinas de células de *Fragaria ananassa* cultivadas. Las células pigmentadas se localizaron en la fase inferior (Dextrano T500), sin embargo, la adición de Li_2SO_4 cambió la partición de las células de fase inferior a la superior. Los resultados obtenidos sugieren que el ATPS es apropiado para seleccionar líneas celulares útiles en células vegetales cultivadas. A pesar de los resultados, este sistema presentó alta viscosidad entre fases y pH cercano a la neutralidad, pero tales condiciones pueden dificultar el manejo y alterar la estabilidad de las antocianinas, además de que sus componentes son más costosos.

En cambio, los sistemas polímero-sal tienen ventajas de accesibilidad y manejo. Los ATPS PEG6000/4000- MgSO_4 / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / Na_2SO_4 son adecuados para la extracción de antocianinas ya que presentan un pH (entre 4 y 5) favorable para

su conservación. La relación de PEG-sal utilizada ha sido de 14.8-16.0 % y de 10.3-10.9 %, respectivamente. En este sistema, las antocianinas partitionaron a la fase superior formada principalmente por PEG. El rendimiento de antocianinas obtenido con frutos de *Garcinia indica* utilizando PEG6000-MgSO₄/(NH₄)₂SO₄ fue de 90 y 70 %, respectivamente (Nainegali, Iyyaswami, & Belur, 2017). Con PEG4000-MgSO₄ se obtuvo un rendimiento de 98.19 % de antocianinas a partir de extracto de *Brassica oleracea* L. (Chandrasekhar & Raghavarao, 2015). En tanto, en frutos de jamun el rendimiento de antocianinas fue de 98.92 % utilizando un sistema PEG6000/MgSO₄ (Chandrasekhar & Raghavarao, 2015). En general, el sistema PEG-MgSO₄ presentó condiciones adecuadas para recuperar más del 90 % de antocianinas en la fase superior. Sin embargo, su aplicación en mayor escala presenta la limitante en la eliminación del polímero contenido en esa fase superior.

En consecuencia, los sistemas alcohol-sal son preferidos por su bajo costo, alto contenido de agua, baja tensión superficial, rapidez de separación de fases, facilidad de reciclaje y de separación de compuestos hidrofílicos. La recuperación de antocianinas con el sistema etanol (18.99-32.5 %) / (NH₄)₂SO₄ (18-31.65 %) en la fase superior se ha llevado a cabo a partir de diversas fuentes vegetales, de las cuales se han logrado obtener altos rendimientos después del proceso. En jugo de frutos de uva se obtuvo rendimiento de antocianinas mayor a 90 % (Wu et al., 2014), en frutos de *Lycium ruthenicum* Murr, se obtuvieron rendimientos de 4.73 mg g⁻¹ utilizando el ATPS asistido con ultrasonido (Qin et al., 2017), en jugo de *Morus atropurpurea* Roxb. el rendimiento de antocianinas fue de 89.5 % en la fase superior (Wu et al., 2011), en hojas de *Perilla frutescens* L. el ATPS asistido con ultrasonido mostró contenido máximo de antocianinas de 18.37 ± 0.91 mg g⁻¹ (Zhang et al., 2022), en extracto acuoso de hojas de *Peristrophe bivalvis* (L) Merr. utilizando ATPS se recuperó el 80 % de antocianinas (Li et al., 2021), en residuos de frutos de *Vaccinium uliginosum* Linn el rendimiento de antocianinas fue de 92.34 % (Hua et al., 2013), en *Rosa pimpinellifolia* L. el rendimiento obtenido fue de 1,594.20 ± 14.14 mg equivalentes de Cianidina 3-glucosido 100 g⁻¹ de fruto seco (Odabaş & Koca, 2020) y utilizando el ATPS asistido con microondas se

obtuvo 1370.98 ± 7.83 mg equivalentes de Cianidina 3-glucosido 100 g^{-1} de fruto seco (Odabaş & Koca, 2021), de *Ipomoea batatas* Lam, con ATPS el rendimiento fue de 3.02×10^4 mg equivalentes de Cianidina 3-glucósido 100 g^{-1} (Sun, Mu, Liu, Zhang, & Chen, 2014), con ATPS asistido con microondas el rendimiento de antocianinas fue de 90.02 % (Liu, Mu, Sun, Zhang, & Chen, 2013) y asistido con ultrasonido presentó un rendimiento de 191.09 mg L^{-1} (Yin, Jia, Wang, & Wang, 2017). En cambio, en frutos de *Garcinia indica* utilizando ATPS etanol (38.60 %) / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (43.28 %) se logró concentrar el 86.33 % de antocianinas en la fase inferior (Nainegali, Iyyaswami, & Belur, 2019).

Utilizando ATPSs formados con etanol/citrato de sodio, en la fase superior, se obtuvo un rendimiento de antocianinas de hasta 83.33 % en frutos de *Syzygium cumini*. Con el sistema etanol (26%) / NaH_2PO_4 (28 %) se obtuvieron rendimientos de antocianinas de hasta 98 % a partir de frutos y flores de *Lycium ruthenicum*, *Nitraria tangutorun* Bobr (Sang et al., 2018).

Particularmente, en fruto de *Garcinia indica* con ATPS formados por 1-propanol (30 %) / MgSO_4 (30-32 %) se obtuvo un rendimiento de antocianinas de 98.60 % en la fase superior (Nainegali, Iyyaswami, & Belur, 2017), mientras que cuando los componentes fueron 1-propanol (15.202 %) / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10.242 %) se obtuvo un rendimiento de antocianinas de 99.19 % en la fase inferior (Nainegali, Iyyaswami, & D Belur, 2020). Otros sistemas constituidos de 2-propanol (23-25 %) / Na_2SO_4 (12 %) y de 2-propanol (23-25 %) / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (11.5 %) se han aplicado para la recuperación de antocianinas de *Syzygium cumini*, los rendimientos de antocianinas que se obtuvieron fueron de 65.90-95.55 % y 53.31-63.87 %, respectivamente (Caldeira et al., 2019; Caldeira, Converti, Naves de Moraes, & Teles de Faria, 2022).

3.3.3 Clúster 2. Extracción de pigmentos de antocianinas mediante ATPS alcohol-sal.

Los ATPS basados en alcohol/sal para separación de antocianinas han sido muy utilizados debido a la rápida capacidad de formación de fases y a la partición

simultánea selectiva de múltiples compuestos en un solo paso. La fase superior que se forma es rica en alcohol y la inferior en sal inorgánica, ambas fases presentan alto contenido de agua y tensión superficial muy baja. Los alcoholes más utilizados por su facilidad de formación de fases son 1-propanol, 2-propanol y etanol (Nainegali et al., 2017). De acuerdo con su polaridad facilitan la partición de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, donde el 1-propanol es menos polar comparado con el etanol. En la mayoría de los sistemas alcohol/sal se ha utilizado etanol, el cual es considerado como un solvente seguro, económico y de amplio uso en la industria alimentaria (Khayati & Shahriari, 2016).

Los sistemas compuestos por etanol/1-propanol/2-propanol con sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_3 , MgSO_4 , Na_2SO_4 y $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$, han sido utilizados en los últimos años para extraer y purificar pigmentos naturales (Nainegali et al., 2017). Los cambios en el tipo de sal y en la concentración producen una diferencia de potencial eléctrico entre las dos fases, lo cual es causado por la preferencia relativa de los iones por una u otra. El sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) se ha utilizado considerablemente como una sal formadora de fases para extraer antocianinas debido a su alta solubilidad (mayor a la que presentan las sales de fosfato y citrato) proporcionándole mejor capacidad para retener componentes hidrofílicos en la fase inferior.

El ATPS formado con etanol (18.99-32.5 %) / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (18-31.65 %,) se ha aplicado para la recuperación de antocianinas de *Lycium ruthenicum* Murr. (Qin et al., 2017), *Morus atropurpurea* Roxb. (Wu et al., 2011), *Perilla frutescens* L. (Zhang et al., 2022), *Morus alba* L. (Zhou et al., 2021), *Peristrophe bivalvis* (L) Merr. (Li et al., 2021), *Vaccinium uliginosum* Linn. (Hua et al., 2013), *Rosa pimpinellifolia* L. (Odabaş & Koca, 2020; Odabaş & Koca, 2021), *Ipomea batatas* Lam (Sun, Mu, Liu, Zhang, & Chen, 2014; Liu, Mu, Sun, Zhang, & Chen, 2013), *Garcinia Indica* (Nainegali, Iyyaswami, & Belur, 2017; Nainegali, Iyyaswami, & D Belur, 2020), *Ribes nigrum* (Zhou et al., 2021), *Malvaviscus arboreus* Cav (Yuan et al., 2022) y uva (Wu et al., 2014). Otros sistemas constituidos de 2-propanol (23-25 %) / Na_2SO_4 (12 %) / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (11.5 %) se han aplicado para la

recuperación de antocianinas de *Syzygium cumini* (Sang et al., 2018). Las antocianinas de *Garcinia indica* han sido extraídas con sistemas formados por 1-propanol/MgSO₄/(NH₄)₂SO₄ en proporciones de 15.2-30 %, 30-32% y 10.2 %, respectivamente (Nainegali et al., 2020). En tanto, para recuperar antocianinas de jugo de uva y *Nitraria tangutorun* Bobr., se ha utilizado el sistema etanol/NaH₂PO₄, en concentraciones de 25 % y 8-28 %, respectivamente (Sang et al., 2018).

3.3.4 Clúster 3. Ósmosis aplicada en la purificación de extractos de antocianinas obtenidos con ATPS

La composición de los sistemas acuosos bifásicos (ATPS) se basa en dos componentes cuyas características permiten la formación espontánea de dos fases inmiscibles, cuando se someten a reposo bajo ciertas condiciones termodinámicas. Los principales componentes que se han utilizado en estos sistemas son polímeros con estructuras químicas diferentes, polímero-sal, líquido iónico-sal y alcohol-sal (Caldeira et al., 2019). El uso de ATPS permite recuperar pigmentos y productos naturales bioactivos mediante la extracción, clarificación, concentración y purificación de los compuestos en un solo paso. Es así que la aplicación permite obtener altos rendimientos a menores costos (Liu et al., 2013; Wang et al., 2008). La actividad biológica de los compuestos bioactivos extraídos con ATPS generalmente no se altera, porque el componente mayoritario de las fases es agua.

Para propiciar la separación de los compuestos de interés se requiere previo conocimiento sobre su afinidad a las fases del ATPS. Los componentes del sistema utilizados en las primeras investigaciones llevadas a cabo para la extracción de antocianinas con estos sistemas fueron sal y PEG. Las sales probadas para tener un ATPS con características propicias para las antocianinas han sido fosfato de potasio, citrato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio y sulfato de sodio. Sin embargo, los sistemas formados con PEG/fosfato de potasio y PEG/citrato de sodio presentaron condiciones de pH entre 7 y 8 que no son favorables para la estabilidad de las antocianinas. El pH

de los sistemas formados con las demás sales fue cercano a 5, adecuado para mantener estables los pigmentos (Chandrasekhar & Raghavarao 2015). Los sistemas de extracción acuosa bifásicos (ATPS) PEG4000/MgSO₄ y PEG6000/MgSO₄ fueron efectivos para particionar las antocianinas, de *Brassica oleracea* y jamun, respectivamente (Chandrasekhar & Raghavarao, 2015; Chandrasekhar & Raghavarao, 2015). Aproximadamente, más del 90 % de las antocianinas migraron hacia la fase superior, mientras que los azúcares lo hicieron en más del > 50 % hacia la fase inferior. El ATPS descrito involucra un paso adicional que consiste en separar el PEG, utilizando cloroformo y nitrógeno líquido, del extracto acuoso enriquecido de antocianinas. Para clarificar y concentrar el color de los extractos obtenidos se han aplicado procesos como la destilación con membrana osmótica (DMO) y ósmosis directa (OD), los cuáles fueron adecuados porque no afectan a los pigmentos, ya que no involucran el uso de temperatura alta.

Los agentes CaCl₂·2H₂O (12 M) y NaCl (6M) fueron utilizados en la DMO y OD, respectivamente, para concentrar el extracto de antocianinas purificado con ATPE. En ambos el tiempo de proceso aplicado fue de 12 h a una velocidad de flujo de 100 mL min⁻¹. La DMO permitió aumentar en un 80 % la concentración de antocianinas, así como un aumento de 16 °Brix. En tanto, aplicando OD hubo un incremento en la concentración de antocianinas de más de 6 veces y 33 °Brix. Los dos procesos DMO y OD fueron efectivos para mantener las propiedades colorantes de las antocianinas, pues presentaron bajo índice de pardeamiento no enzimático y constante de degradación, así como mayor estabilidad a los cambios de pH y al aumento de temperatura. Sin embargo, con OD se obtuvo el índice de pardeamiento no enzimático menor, mayor densidad de color y color polimérico. Por lo tanto, ATPE + OD fue la mejor alternativa para purificar y concentrar antocianinas (Chandrasekhar & Raghavarao, 2015; Chandrasekhar & Raghavarao, 2015).

Por otro lado, también han sido efectivos procesos de ATPE multietapa con el sistema PEG4000/MgSO₄ y PEG6000/MgSO₄ también han sido efectivos para la

purificación y estabilidad estructural de antocianinas de *Brassica oleracea* y jamun. Con este procedimiento, en la fase superior se obtuvo un rendimiento de antocianinas de hasta 91.9 % en la fase superior (PEG4000, PEG6000), con una reducción de azúcares de hasta 96 % (Chandrasekhar & Raghavarao, 2015; Chandrasekhar & Raghavarao, 2015).

El uso del ATPS utilizando sistemas polímero/sal para extraer antocianinas es efectivo, sin embargo, la formación de fases involucra mayor tiempo de reposo debido a la viscosidad de sus componentes, factor que podría intervenir en la degradación de antocianinas. Además, la eliminación del polímero en la fase superior limita su uso a mayor escala (Goja et al., 2013; Liu et al., 2013). Las antocianinas también han sido separadas de diversas fuentes vegetales utilizando sistemas acuosos bifásicos constituidos por un disolvente orgánico y una sal (Le et al., 2023). Los ATPE alcohol/sal ofrecen baja tensión y viscosidad entre fases, fácil escalado y bajo consumo de energía (Caldeira et al., 2019; Liu et al., 2013; Qin et al., 2017). Las antocianinas migran hacia la fase superior (orgánica) mientras que las proteínas, azúcares, ácidos orgánicos y algunas antocianinas afines se concentran en la fase inferior salina. Además, se ha observado que el material vegetal, fibra o sólidos agregados al ATPS se concentran en la parte media del sistema (Wang et al., 2008). Con todo ello, se ha recuperado hasta el 90 % de antocianinas en la fase superior y se ha eliminado más del 50 % de impurezas en la fase salina (Qin et al., 2017; Wu et al., 2014).

La reducción de azúcares se ha considerado como un importante índice de referencia para la purificación de antocianinas. El ATPS etanol/sulfato de amonio ha sido ampliamente utilizado para extraer y purificar antocianinas, con la ventaja de disminuir la concentración de azúcares. Se ha utilizado en diversos materiales vegetales presentando diferente rendimiento de separación. En polvo de frutos de *Rosa piminelifolia*, *Ribes nigrum* L. y uvas se encontró con este sistema que los azúcares fueron principalmente distribuidos en la fase inferior, con reducción de 28 %, 76.66 % y de 72.96-79.86 %, respectivamente (Odabaş & Koca, 2020; Zhou et al., 2021). Los principales polisacáridos que contenía la fase inferior del

sistema en frutos de *Ribes nigrum* L. fueron ramnosa y glucosa (Bu et al., 2021; Odabaş & Koca, 2021; Xie et al., 2022). En jugo de *Morus atropurpurea* se obtuvo un rendimiento de extracción de azúcares en la fase inferior de 98.2% después de la tercera extracción de un proceso multietapa. Aunque el porcentaje de reducción de azúcares fue alto, los autores indicaron que el uso de una extracción múltiple puede afectar negativamente el rendimiento de antocianinas, en tanto que se recomienda una sola extracción ya que es suficiente para recuperar el 89.5 % de azúcares en la fase inferior de 89.5 % (Wu et al., 2011). En residuos de *Vaccinium uliginosum* Linn la reducción de azúcares en la fase superior fue de 66 % (Hua et al., 2013). Con el uso de ATPS a partir de sulfato de magnesio/1-propanol; en extractos de frutos de *Garcinia indica* la reducción de azúcares fue del 85.92 % (Nainegali et al., 2017). En tanto, aplicando procesos multietapa con el ATPS NaH₂PO₄ (28 % p/p) y etanol (25 %) en jugo de uva se encontró que después de la segunda extracción se eliminaron más del 90 % de azúcares de la fase superior (Wu et al., 2014).

3.3.5 Clúster 4. ATPS asistidos con ultrasonido para la extracción de antocianinas

La extracción asistida por ultrasonido se usa ampliamente en la extracción de compuestos bioactivos obtenidos de diferentes matrices naturales; su uso permite obtener mayores rendimientos en menor tiempo y con menor temperatura. Es una técnica rápida y amigable con el medio ambiente porque disminuye el uso de disolvente. Los ATPS asistidos por ultrasonido han sido utilizados para la extracción de antocianinas a partir de flores, frutos y tubérculos. La transferencia de masa de las antocianinas desde las paredes celulares de la planta hasta el solvente mejora porque la fuerza del ultrasonido es capaz de romper la pared celular debido al fenómeno de cavitación que se produce en el tejido de la muestra (Tena y Asuero, 2022).

En general, los trabajos relacionados con esta línea de investigación indican que para obtener el máximo rendimiento de antocianinas es necesario optimizar las condiciones de extracción. Parámetros tales como la potencia aplicada,

temperatura, tiempo de extracción, relación sólido-líquido han sido estudiadas con la metodología de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas que permiten obtener selectividad y máximo rendimiento de antocianinas y azúcares totales. A partir de las investigaciones realizadas se encontró que el etanol y sulfato de amonio son el disolvente y sal que más se han utilizado, aunque, también se ha empleado fosfato diácido de sodio. Las concentraciones de tales componentes del sistema usadas estuvieron en el rango de 25-40 y 18-35 %, respectivamente. La potencia frecuentemente utilizada es de 300 W, aunque también se han aplicado frecuencias desde 96.1 hasta 600 W. La extracción con ultrasonido en la mayoría de los trabajos consultados se ha llevado a cabo a temperaturas mayores de 25 °C, con un tiempo de extracción mínimo de 30 min y máximo de 48 min. El pH se reportó en un rango de 2.50 a 3.98, pero, aunque en algunos trabajos no se especifica, se asume que fue controlado ya que es un parámetro que tiene alta influencia en la estabilidad de las antocianinas. La relación sólido líquido utilizada varió desde 1:60 hasta 1:10 gmL^{-1} . Un aumento en la cantidad de sólido incrementa la disponibilidad de antocianinas para ser extraídas a la fase superior del ATPS (Qin et al., 2017; Sang et al., 2018; Xie et al., 2022; Yin et al., 2017; Yuan et al., 2022; Zhou et al., 2021).

A partir de los resultados de las investigaciones se recomienda el uso del ultrasonido porque permite aumentar el rendimiento de las antocianinas, su estabilidad y actividad antioxidante. El ATPS sal/etanol asistido por ultrasonido un procedimiento prometedor ya que podría ser escalado en aplicaciones industriales, además de que es eficiente, ecológico y económico.

3.3.6 Clúster 5. ATPS asistidos con microondas para la extracción de antocianinas

La aplicación de microondas a diferentes tejidos o matrices ayuda a romper las paredes celulares de flores y frutos, mejorando la extracción de compuestos bioactivos (Yuan et al., 2022). Las microondas actúan de forma selectiva sobre las células vegetales, provocando la ruptura de la pared celular, debido a un

aumento de presión que se produce cuando se vaporiza el agua de la matriz. Así, el solvente penetra fácilmente en la célula vegetal favoreciendo la extracción (Tena y Asuero, 2022).

La extracción acuosa en dos fases asistida con microondas (ATPE-M) ha sido aplicada principalmente para llevar a cabo la extracción simultánea de ingredientes activos a partir de frutos de grosella negra (*Ribes nigrum* L.) y de *Rosa pimpinellifolia* L. syn (Odabaş & Koca, 2021; Zhou et al., 2021). Procedimientos de optimización como metodología de superficie de respuesta y redes neuronales artificiales (RNA) han sido utilizados, siendo el modelo de RNA el más efectivo y confiable para predecir y optimizar el proceso (Bu et al., 2021). Los principales componentes de la ATPE-M han sido sulfato de amonio y etanol, a concentraciones de 17.4 ± 3.2 y 29.97 ± 2.70 % (p/p), respectivamente. Las potencias de las microondas que se han aplicado han variado de 400 a 600 W, con tiempos de extracción promedio de 14.1 ± 3.73 min y temperatura de 61.66 ± 2.89 °C. Aplicando ATPE-M se pueden extraer de forma simultánea polisacáridos, compuestos fenólicos y antocianinas. En general, el rendimiento de los metabolitos fue menor cuando se llevó a cabo extracción con solvente y extracción asistida con ultrasonido. La extracción convencional asistida con microondas para frutos de *R. pimpinellifolia*, presentó mayor rendimiento, pero se conservó una composición similar y mayor pureza cuando se utilizó ATPE-M (Bu et al., 2021; Liu et al., 2013; Odabaş & Koca, 2021; Zhou et al., 2021).

De acuerdo con el análisis de los resultados, la ATPE-M permite extraer simultáneamente múltiples ingredientes activos en menor tiempo, el uso de las microondas provoca un rápido calentamiento interno del sistema que mejora su selectividad. Por lo tanto, ATPE-M tiene potencial para ser un método eficiente, ecológico y simple para la extracción y purificación simultánea y, además, es práctico porque se lleva a cabo en un solo paso.

3.3.7 Clúster 6. Capacidad antioxidante de los metabolitos separados aplicando la técnica de ATPS

Los extractos obtenidos a partir de los diferentes ATPS utilizados para separar, purificar y concentrar antocianinas han mostrado una actividad antioxidante excepcionalmente mayor que los extractos obtenidos de forma convencional. El extracto obtenido de hojas de *Perilla frutescens* utilizando ATPE asistida con ultrasonido presentó una capacidad de eliminación de radicales DPPH 2.07 y 1.16 veces mayor a la obtenida con extracción acuosa y etanólica, respectivamente, también asistidas con ultrasonido (Zhang et al., 2022). Con extracto de *Morus atropurpurea* Roxb. obtenido mediante ATPE se logró un porcentaje de eliminación de radical DPPH y ABTS de 91.5 % y 92.7 % utilizando 40 y 55 % menos de extracto en comparación con el obtenido mediante extracción convencional (Wu et al., 2011). En frutos de *Rosa pimpinellifolia* se encontró que la capacidad antioxidante del extracto obtenido por ATPE y por extracción convencional fue de 1991.13 ± 94.73 y $1083.40 \pm 7.10 \mu\text{mol g}^{-1}$, de 0.18 ± 0.00 y $0.10 \pm 0.00 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$, y de 3361.55 ± 67.30 y $1687.51 \pm 41.18 \mu\text{mol g}^{-1}$, para FRAP, DPPH y ABTS, respectivamente. Cuando se realizó la extracción convencional y con ATPE asistidas con microondas, la capacidad antioxidante con FRAP, DPPH y ABTS fueron de 1555.52 ± 29.53 y $833.80 \pm 18.97 \mu\text{mol g}^{-1}$, de 0.16 ± 0.00 y de $0.08 \pm 0.00 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$, y de 2243.75 ± 50.91 y $891.49 \pm 73.71 \mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente. En ambos estudios la ATPE presentó mayor capacidad antioxidante comparada con métodos de extracción convencional (Odabaş & Koca, 2021; Odabaş & Koca, 2020). En extractos de *Ribes nigrum* (Bu et al., 2021), las diferencias en la actividad antioxidante se deben principalmente a su diferente contenido de antocianinas.

Derivado de los análisis realizados mediante HPLC, HPLC/MS/MS, HPLC-ESI-MS/MS y HPLC-QTOF-MS, a extractos obtenidos por ATPE, se ha determinado que éste es un método prometedor para la purificación preliminar de antocianinas (Chandrasekhar & Raghavarao, 2015, Lima et al., 2021; Odabaş & Koca, 2021; Wu et al., 2011). Los espectros obtenidos confirman que las antocianinas extraídas por ATPE no tuvieron cambios evidentes en comparación con las

extraídas de forma convencional (Lima et al., 2017; Liu et al., 2013; Odabaş & Koca, 2021; Wu et al., 2011). El extracto obtenido de frutos de *Morus atropurpurea* por ATPE presentó alto contenido de cianidina-3-glucosido (C3G) y cianidina-3-rutinosido, con una pequeña cantidad de pelargonidina-3-glucósido y pelargonidina-3-rutin{osido (Liang et al., 2012; Wu et al., 2011). En extractos de *Rosa pimpinellifolia* el 94 % de las antocianinas encontradas fueron C3G y cianidina-3,5-diglucosido (Odabaş & Koca, 2020; Odabaş & Koca, 20201). La composición del extracto de frutos de *Ribes Nigrum* fue principalmente kaemferol-3-O-rutinosido, rutina, C3G e hiperósido (Zhou et al., 2021). En flores de *Malvaviscus arboreus* Cav. se identificaron 11 glucósidos de flavonoides y cuatro agliconas, derivados de cianidina, pelargonidina, quercetina y kaemferol (Yuan et al., 2022).

3.3.8 Enfoques actuales y áreas de oportunidad en la investigación acuosa en dos fases orientada a la separación y purificación de antocianinas

Actualmente, se han desarrollado ATPS que integran componentes para realizar otro proceso, además de aislar las antocianinas. El enriquecimiento y purificación de antocianinas de frutos de *Morus alba* L. se llevó a cabo mediante ATPE alcohol/sal/ α -L-ramnosidasa inmovilizada, de donde, con la integración de la enzima al sistema se observó que hubo conversión de cianidina-3-rutinósido a C3G en un 60.68 % (Zhou et al., 2021). Otro ATPE no convencional fue aplicado para desarrollar una microcápsula natural utilizando quitosano (1 %), colágeno (4 %) y pectina (0.5 %) como componentes del sistema. A través de la interacción electrostática y formación de enlaces hidrógeno entre la antocianina y la pectina en la fase interna se consiguió la microencapsulación. Con el sistema a pH 6 las microcápsulas obtenidas fueron voluminosas, estables y con membrana interfacial plana (Jiang et al., 2023).

El ATPS $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -etanol es el más utilizado hasta ahora para separar antocianinas, probablemente porque la condición de pH del sistema es adecuada para su conservación. Sin embargo, para mejorar la purificación de las antocianinas es necesario realizar estudios de ATPS enfocados al uso de otras

sales y disolventes que permitan la partición bajo diferentes condiciones de polaridad y que puedan ser utilizados en serie. Aunque el desarrollo de esos sistemas involucra la incorporación de otros componentes además de la sal y disolvente para favorecer la condición de pH. También, es necesario realizar mayor investigación en la incorporación de enzimas al sistema para mejorar los rendimientos de extracción de determinadas antocianinas; así como escalar el proceso con fines de funcionamiento continuo.

3.4 Conclusiones

El panorama actual de las investigaciones permite identificar que la extracción acuosa en dos fases es una alternativa viable para el aislamiento de antocianinas y su uso ha aumentado en los últimos tres años, ya que ha habido un incremento en el número de publicaciones. El impulso por utilizar esta técnica de separación es principalmente motivado por su sencillez y bajo costo, así como por la necesidad de tener un proceso para aislar antocianinas que sea factible de escalamiento. En el mercado, la necesidad de ofrecer esta alternativa de aislamiento es vigente pues actualmente los pigmentos naturales son de interés para diversas industrias. La tendencia de los ATPE es incorporar componentes al sistema que permitan mejorar el aislamiento y a su vez prologar su vida de anaquel mediante procesos para evitar su degradación. El análisis permitió visualizar que China e India son los países con mayor dominio en el tema. Las revistas en las que se han publicado la mayoría de los artículos son del continente europeo. Brasil es el único país de América Latina que ha desarrollado investigación sobre el tema, por lo que es necesario potencializar la investigación en el resto de los países latinoamericanos.

3.5 Literatura citada

Ahmadiani, N., Sigurdson, G. T., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2019). Solid phase fractionation techniques for segregation of red cabbage anthocyanins with different colorimetric and stability properties. *Food Research International*, 120, 688-696. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.026>

- Braga, A. R. C., Murador, D. C., de Souza Mesquita, L. M., & de Rosso, V. V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 31-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.031>
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1), 103-109. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00222-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00222-1)
- Brudzyńska, P., Sionkowska, A., & Grisel, M. (2021). Plant-Derived Colorants for Food, Cosmetic and Textile Industries: A Review. *Materials*, 14(13). Retrieved from doi:10.3390/ma14133484
- Bu, X., Xu, Y., Zhao, M., Li, D., Zou, J., Wang, L., . . . Yang, Y. (2021). Simultaneous extraction of polysaccharides and polyphenols from blackcurrant fruits: Comparison between response surface methodology and artificial neural networks. *Industrial Crops and Products*, 170, 113682. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113682>
- Bueno, J. M., Sáez-Plaza, P., Ramos-Escudero, F., Jiménez, A. M., Fett, R., & Asuero, A. G. (2012). Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, color, and intake of anthocyanins. *Critical reviews in analytical chemistry*, 42(2), 126-151. Doi: <https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632314>
- Caldeira, A. C. R., Converti, A., Naves de Moraes, M., & Teles de Faria, J. (2022). Anthocyanin Partition in Aqueous Two-Phase Systems Based on Isopropanol and Sodium/Ammonium Sulfate. *Chemical Engineering & Technology*, 45(9), 1605-1613. Doi: <https://doi.org/10.1002/ceat.202100524>
- Caldeira, A. C. R., Franca, W. F. L. d., Converti, A., Lima, W. J. N., Sampaio, F. C., & Faria, J. T. d. (2019). Liquid-liquid equilibria in aqueous two-phase ethanol/salt systems at different temperatures and their application to anthocyanins extraction. *Food Science and Technology*, 39, 711-717. Doi: <https://doi.org/10.1590/fst.32218>

- Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Separation and Concentration of Anthocyanins from Jamun: An Integrated Process. *Chemical Engineering Communications*, 202(10), 1368-1379. doi: 10.1080/00986445.2014.935351
- Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* L. *Separation and Purification Technology*, 151, 57-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.030>
- Danús, L., Muntaner, C., Krauss, A., Sales-Pardo, M., & Guimerà, R. (2023). Differences in collaboration structures and impact among prominent researchers in Europe and North America. *EPJ Data Science*, 12(1), 12.
- Donthu, N., Kumar, S., Mukherjee, D., Pandey, N., & Lim, W. M. (2021). How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. *Journal of Business Research*, 133, 285-296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2021.04.070>
- Edahiro, J.-i., Yamada, M., Seike, S., Kakigi, Y., Miyanaga, K., Nakamura, M., . . . Seki, M. (2005). Separation of cultured strawberry cells producing anthocyanins in aqueous two-phase system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(4), 449-454. doi: <https://doi.org/10.1263/jbb.100.449>
- Goja, A. M., Yang, H., Cui, M., & Li, C. (2013). Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. *J. Bioprocess. Biotechnol*, 4(1), 1-8. Doi:10.4172/2155-9821.1000140
- Gomes, J. V. P., Rigolon, T. C. B., Souza, M. S. d. S., Alvarez-Leite, J. I., Lucia, C. M. D., Martino, H. S. D., & Rosa, C. d. O. B. (2019). Antiobesity effects of anthocyanins on mitochondrial biogenesis, inflammation, and oxidative stress: A systematic review. *Nutrition*, 66, 192-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.05.005>
- Granda-Orive, J. I., Alonso-Arroyo, A., García-Río, F., Solano-Reina, S., Jiménez-Ruiz, C. A., & Aleixandre-Benavent, R. (2013). Ciertas ventajas de Scopus

sobre Web of Science en un análisis bibliométrico sobre tabaquismo. Revista española de documentación científica, 36(2), e011-e011. Doi: <https://doi.org/10.3989/redc.2013.2.941>

Hua, Z., Yuesheng, D., Ge, X., Menglu, L., Liya, D., LiJia, A., & Zhilong, X. (2013). Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *Vaccinium uliginosum* Linn. J. Chromatogr. Sep. Tech, 4(02). Doi:10.4172/2157-7064.1000167

Jiang, Z., Zhao, S., Fan, Z., Zhao, C., Zhang, L., Liu, D., . . . Zheng, J. (2023). A novel all-natural (collagen+pectin)/chitosan aqueous two-phase microcapsule with improved anthocyanin loading capacity. Food Hydrocolloids, 134, 107984. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107984>

Kanarek, R. B. (2011). Artificial food dyes and attention deficit hyperactivity disorder. Nutrition Reviews, 69(7), 385-391. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00385.x>

Khayati, G., & Shahriari, M. (2016). Measurement and correlation of phase diagram data of hydrophilic alcohols (1-propanol/2-propanol)+ salts (Na₂SO₄/(NH₄)₂SO₄/NH₄NO₃)+ water systems. Chemical and biochemical engineering quarterly, 30(1), 73-80. Doi: <https://doi.org/10.1021/je9007348>

Le, P. H., Dao, D. N., Huynh, T. Q., Tran, T. T. T., & Nguyen, V. (2023). Extraction and purification of anthocyanins from *Peristrophe bivalvis* (L.) Merr. leaf (Acanthaceae) using aqueous two-phase systems. Natural Product Research, 37(1), 154-158. doi: 10.1080/14786419.2021.1952203

Li, P., Feng, D., Yang, D., Li, X., Sun, J., Wang, G., . . . Bai, W. (2021). Protective effects of anthocyanins on neurodegenerative diseases. Trends in Food Science & Technology, 117, 205-217. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.005>

- Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., . . . Yang, L. (2012). In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*, 46(1), 76-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.024>
- Lima, Á. S., Oliveira, B. S. d., Shabudin, S. V., Almeida, M., Freire, M. G., & Bica, K. (2021). Purification of anthocyanins from grape pomace by centrifugal partition chromatography. *Journal of Molecular Liquids*, 326, 115324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115324>
- Lima, Á. S., Soares, C. M. F., Paltram, R., Halbwirth, H., & Bica, K. (2017). Extraction and consecutive purification of anthocyanins from grape pomace using ionic liquid solutions. *Fluid Phase Equilibria*, 451, 68-78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.08.006>
- Liu, X., Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Chen, J. (2013). Optimisation of aqueous two-phase extraction of anthocyanins from purple sweet potatoes by response surface methodology. *Food Chemistry*, 141(3), 3034-3041. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.119>
- Nainegali, B. S., Iyyaswami, R., & Belur, P. D. (2019). Simultaneous extraction of four different bioactive compounds from *Garcinia indica* and their enrichment using Aqueous Two-Phase Systems. *Food and Bioproducts Processing*, 114, 185-195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.01.002>
- Nainegali, B. S., Iyyaswami, R., & D Belur, P. (2020). Partitioning of bio-active compounds from rinds of *garcinia indica* using aqueous two-phase system: Process evaluation and optimization. *Separation and Purification Technology*, 253, 117520. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117520>
- Nainegali, B., Iyyaswami, R., & Belur, P. (2017). Aqueous Two-phase Extraction of Anthocyanin from Fruits of *Garcinia indica*. *International Journal of Earth Sciences and Engineering*, 10. doi: 10.21276/ijee.2017.10.0330

- Odabaş, H. İ., & Koca, I. (2020). Process for production of microencapsulated anthocyanin pigments from *Rosa pimpinellifolia* L. fruits: optimization of aqueous two-phase extraction, microencapsulation by spray and freeze-drying, and storage stability evaluation. *International Journal of Food Engineering*, 16(9), 20200057.
- Odabaş, H. İ., & Koca, I. (2021). Simultaneous separation and preliminary purification of anthocyanins from *Rosa pimpinellifolia* L. fruits by microwave assisted aqueous two-phase extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 125, 170-180. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.11.007>
- Oladzadabbasabadi, N., Mohammadi Nafchi, A., Ghasemlou, M., Ariffin, F., Singh, Z., & Al-Hassan, A. A. (2022). Natural anthocyanins: Sources, extraction, characterization, and suitability for smart packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 33, 100872. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100872>
- Phong, W. N., Show, P. L., Chow, Y. H., & Ling, T. C. (2018). Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(3), 273-281. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>
- Qin, B., Liu, X., Cui, H., Ma, Y., Wang, Z., & Han, J. (2017). Aqueous two-phase assisted by ultrasound for the extraction of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 47(9), 881-888. doi: 10.1080/10826068.2017.1350980
- Sánchez, A. D., de la Cruz Del Río Rama, M., & García, J. Á. (2017). Bibliometric analysis of publications on wine tourism in the databases Scopus and WoS. *European Research on Management and Business Economics*, 23(1), 8-15. doi: <https://doi.org/10.1016/j.iemeen.2016.02.001>
- Sang, J., Dang, K.-k., Ma, Q., Li, B., Huang, Y.-y., & Li, C.-q. (2018). Partition Behaviors of Different Polar Anthocyanins in Aqueous Two-Phase Systems and Extraction of Anthocyanins from *Nitraria tangutorun* Bobr. and *Lycium*

- ruthenicum* Murr. Food Analytical Methods, 11(4), 980-991. doi: 10.1007/s12161-017-1071-3
- Soytas, R. B. (2021). A bibliometric analysis of publications on COVID-19 and older adults. Annals of geriatric medicine and research, 25(3), 197. doi: 10.4235/agmr.21.0060.
- Sun, H., Mu, T., Liu, X., Zhang, M., & Chen, J. (2014). Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Anthocyanins: Preventive Effect on Acute and Subacute Alcoholic Liver Damage and Dealcoholic Effect. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(11), 2364-2373. doi: 10.1021/jf405032f
- Tena, N., & Asuero, A. G. (2022). Up-To-Date Analysis of the Extraction Methods for Anthocyanins: Principles of the Techniques, Optimization, Technical Progress, and Industrial Application. Antioxidants, 11(2). doi:10.3390/antiox11020286
- van Eck, N. J., & Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. Scientometrics, 84(2), 523–538. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2021.04.070>
- Varadavenkatesan, T., Pai, S., Vinayagam, R., Pugazhendhi, A., & Selvaraj, R. (2021). Recovery of value-added products from wastewater using Aqueous Two-Phase Systems – A review. Science of The Total Environment, 778, 146293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146293>
- Vicente, F. A., Urbančič, V., Likozar, B., Simões, P. N., & Pereira, J. F. B. (2023). Aqueous biphasic systems as a key tool for food processing. Current Opinion in Food Science, 50, 100991. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.100991>
- Wang, H., Dong, Y., & Xiu, Z.-L. (2008). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of piceid, resveratrol and emodin from *Polygonum cuspidatum* by ethanol/ammonium sulphate systems. Biotechnology Letters, 30(12), 2079-2084. doi: 10.1007/s10529-008-9815-1

- Wu, X., Liang, L., Zou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., & Yang, L. (2011). Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*, 129(2), 443-453. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.097>
- Wu, Y., Wang, Y., Zhang, W., Han, J., Liu, Y., Hu, Y., & Ni, L. (2014). Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 124, 170-178. doi: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.025>
- Xie, G., Shen, J., Luo, J., Li, D., Tao, Y., Song, C., & Han, Y. (2022). Simultaneous extraction and preliminary purification of polyphenols from grape pomace using an aqueous two-phase system exposed to ultrasound irradiation: Process characterization and simulation. *Frontiers in Nutrition*, 9, 993475. doi: 10.3389/fnut.2022.993475.
- Yin, Y., Jia, J., Wang, T., & Wang, C. (2017). Optimization of natural anthocyanin efficient extracting from purple sweet potato for silk fabric dyeing. *Journal of Cleaner Production*, 149, 673-679. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.134>
- Yuan, T., Huang, J., Gan, L., Chen, L., Zhong, J., Liu, Z., . . . Fan, H. (2022). Ultrasonic Enhancement of Aqueous Two-Phase Extraction and Acid Hydrolysis of Flavonoids from *Malvaviscus arboreus* Cav. Flower for Evaluation of Antioxidant Activity. *Antioxidants*, 11(10). Retrieved from doi:10.3390/antiox11102039
- Zhang, J., Wu, J., Liu, F., Tong, L., Chen, Z., Chen, J., . . . Huang, C. (2019). Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: An outlined review. *European Journal of Pharmacology*, 858, 172500. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172500>
- Zhang, X., Zhao, Y., Li, B., Guo, M., Lv, J., & Wei, Y. (2022). Comparison of three extraction methods for anthocyanins from perilla frutescens leaves.

Sustainable Chemistry and Pharmacy, 29, 100817. doi:
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100817>

Zhou, X.-J., Zhu, C.-T., Zhang, L.-Y., You, S., Wu, F.-A., & Wang, J. (2021). Enrichment and purification of red pigments from defective Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolic compounds from *Ribes nigrum* L. and its antibacterial effect on foodborne pathogens fruits using biotransformation in a liquid-liquid-solid three-phase system. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(19), 24432-24440. doi: 10.1007/s11356-020-08731-2

4. FERMENTED BEVERAGE OF *ARDISIA COMPRESSA* FRUITS BASED ON COMMERCIAL AND NATIVE YEASTS: EVALUATION OF KINETIC CHANGES

Bebida fermentada de frutos de *Ardisia compressa* a base de levaduras comerciales y nativas: evaluación de cambios cinéticos

G. Hernández-Rodríguez¹, D. Guerra-Ramírez², R. Domínguez-Puerto², I. L. López-Cruz¹ S. Valle-Guadarrama^{3*}.

¹Programa de Posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua. Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco 38.5, Chapingo, 56230, México.

²Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco 38.5, Chapingo, 56230, México.

³Laboratorio de Atmósferas Controladas, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco 38.5, Chapingo, 56230, México.

Sent date: 28/06/2023

Abstract:

The fruits of the genus *Ardisia* Sw. (Primulaceae) are resources scarcely exploited along the world. An alternative to add value is the preparation of a fermented beverage but, to enhance properties, the use of native yeasts should be evaluated. The objective was to evaluate the use of a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (SC) and a native yeast (NY) during the preparation of a fermented beverage from *Ardisia compressa* fruits through monitoring the compounds variation. Fermentation processes were conducted, and rates of sugar consumption and alcohol production were higher with NY than with SC. The fermented product contained 73.6 and 95.9 g L⁻¹ of alcohol with SC and NY, while total soluble phenols, anthocyanins, and antioxidant activity were 2,367.0 mg L⁻¹, 215.5 mg L⁻¹, and 16,832.0 µmol L⁻¹ with SC, and 2213.0 mg L⁻¹, 287.4 mg L⁻¹, and 18,614.0 µmol L⁻¹ with NY, respectively. The better performance of the native yeast was confirmed through modeling, which explained the variation of yeast concentration, the logarithmic soluble phenols increase, and anthocyanins depletion. Besides, the fermentation with native yeast allowed obtaining better color and better antioxidant properties. The native yeast was a better option to prepare a fermented beverage from *A. compressa* fruits.

Keywords: *Ardisia compressa*, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, native yeast.

* Corresponding author. E-mail: svalleg.chapingo@gmail.com
Tel. +52-595-952-1629, Fax +52-595-952-1629

Resumen:

Los frutos de *Ardisia* Sw. (Primulaceae) son escasamente explotados a nivel mundial. Una alternativa para agregar valor es preparar una bebida fermentada, pero con levadura nativa para enfatizar propiedades distintivas. El objetivo fue evaluar el uso de una cepa comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) y una levadura nativa (LN) para preparar una bebida fermentada con frutos de *Ardisia compressa* mediante el monitoreo de la variación de compuestos. Se condujo fermentación, con tasas de consumo de azúcar y producción de alcohol mayores con LN que con SC. El producto fermentado contuvo 73.6 y 95.9 g L⁻¹ de alcohol con SC y LN, respectivamente, con contenidos de fenoles solubles totales, antocianinas y actividad antioxidante de 2,367.0 mg L⁻¹, 215.5 mg L⁻¹ y 16,832.0 μmol L⁻¹ con SC y 2,213.0 mg L⁻¹, 287.4 mg L⁻¹ y 18,614.0 μmol L⁻¹ con LN. El mejor desempeño de LN se confirmó con modelado, que permitió explicar la variación de concentración de levadura, el aumento logarítmico de fenoles solubles y el agotamiento de antocianinas. La fermentación con LN permitió obtener mejor color y mejores propiedades antioxidantes. La levadura nativa fue mejor opción para preparar una bebida fermentada con frutos de *A. compressa*.

Palabras clave: *Ardisia compressa*, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentación, levadura nativa.

4.1 Introduction

The genus *Ardisia* Sw. (Primulaceae) includes species that are present in tropical regions of America, Asia, and Africa (POWO, 2023). They generally develop as wild plants (Manjato *et al.*, 2020), with little or no cultivation practices (Wang *et al.*, 2014). However, based on local uses, their potential to reduce different diseases has been demonstrated (Blin *et al.*, 2021; Islam *et al.*, 2019). *Ardisia compressa* is a deciduous shrub, which produces globular fruits, with a thin skin, deep red in color, with a bittersweet flavor, and high antioxidant activity due to the presence of anthocyanins and other flavonoids, diterpenes, gallotannins, phenol-conjugated glycosides, and chlorogenic acids (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015; Vázquez-Sánchez *et al.*, 2019). The production is seasonal, with a harvest period of only two or three months. Fruits are highly perishable, which limits marketing to production regions, so their processing has been proposed to take advantage of their chemical content.

Fermentation is an alternative to add or recover value of materials of low economic importance (Antonio-Narcizo *et al.*, 2023). In this regard, Flores-García *et al.* (2019) showed that the production of a fermented beverage from the juice of *A. compressa* can be an alternative to use the fruit and evaluated a process based on a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* that produced a moderate alcohol content (6.0-6.4%), which suggests the need to look for another yeast to improve the process. According to Kumsa (2020), the incomplete and slow consumption of sugars during a fermentation process is an aspect that must be addressed in each specific case. Besides, the preparation of fermented beverages oriented towards a typification by product or by region is focused on the characterization and use of native yeasts. With this purpose, Alcazar-Valle *et al.* (2019) demonstrated the fermentative capabilities of native yeast strains grown on juices from different Agave species; Berbegal *et al.* (2023) studied the variability of the *Saccharomyces cerevisiae* strains present during the spontaneous fermentation of Grenache grape musts; Álvarez-Ainza *et al.* (2015) studied the genomic diversity of yeasts associated with the artisanal production

of Bacanora, a fermented beverage obtained from *Agave angustifolia*, and Nuñez-Guerrero *et al.* (2016) studied the behavior of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during fermentation of *Agave duranguensis* juice.

Although these studies have focused on products with a high commercial development, there is a growing interest in the study of autochthonous yeasts to favor the obtaining of other fermented products to diversify this marketing area. With this point of view, Rai and Appaiah (2014) used native yeast from *Garcinia xanthochumus* to prepare a fermented beverage; Dellacassa *et al.* (2017) conducted a vinification process from pineapple and demonstrated the suitability for commercial fermentation based on native yeasts; Bae *et al.* (2022) prepared a fermented beverage from coffee cherries using autochthonous yeasts, and Portugal *et al.* (2017) determined that the use of native yeast can favor a distinctive chemical quality and flavor of cachaça obtained from the fermentation of sugarcane juice.

On the other hand, one way to evaluate the fermentation process is to monitor the kinetics of alcohol production in relation to the substrate consumption (Setford *et al.*, 2019). Besides, in red fermented beverages as those as wines, the color is determined by anthocyanins that are extracted from solids during fermentation (Bimpilas *et al.*, 2016; Setford *et al.*, 2018), thus the evaluation of the process can be improved through the kinetics monitoring of compounds such as phenolics and anthocyanins. In this context, the objective was to evaluate the use of a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* and a native yeast in terms of alcohol production, sugar consumption, and changes in bioactive compounds, during the preparation of a fermented beverage from *A. compressa* fruits, in order to achieve add value to this phylogenetic resource.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Plant material

Ripe fruits of *Ardisia compressa* were collected in Xicotepec de Juárez, Mexico (20°16'33" N, 97°57'39" W, 1167 m above sea level) and evaluated in terms of

moisture, contents of total soluble solids, acidity, total soluble phenols, and total anthocyanins, as well as pH and antioxidant activity. Since the harvest index has not yet been determined, the collection of fruits was carried out based on the experience of the producers, which consists in the observation of the appearance and size acquired by the fruits, which were purple in color, turgid in appearance, with average weight of 0.71 (± 0.12) g, and with average polar and equatorial diameters of 8.98 (± 0.74) and 11.40 (± 1.17) mm, respectively.

4.2.2. Fermentation process

Batches of 300 g of macerated fruits were mixed with sucrose to adjust total soluble solids (TSS) to 20 °Brix. Batches were placed at 25 °C for 5 d to induce natural fermentation and produce must from their native yeast (NY). Also, batches of 250 g of juice, with 50 g of epidermis and seeds, with 20 °Brix, were added with 15 ppm (w/v) of potassium metabisulfite and 60 mg of a commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*; SC; Fermex S.A. de C.V.). The mixture was placed at 25 °C for 3 d to activate the yeast and produce must from SC.

Twelve kilograms of fruits were manually crushed and pressed to separate the epidermis, the seed, and the juice. Six experimental units (Eu) with 1.08 kg of juice and 0.2 kg of pressed solids (epidermis and seeds) were prepared. TSS were adjusted to 24 °Brix with sucrose and potassium metabisulfite was added at 15 ppm (w/v). Three Eu were incorporated with 0.07 kg of NY inoculum and other three Eu with 0.07 kg of SC inoculum. Units were placed at 30 °C for 10 d and manual agitation was applied every 24 h to mix the cap. On days zero (beginning of the fermentation), 2, 4, 6, 8, and 10, samples of 10 mL were obtained from experimental units, which were submitted to centrifugation at 6,000 rpm for 10 min and measurement of color, antioxidant activity, and contents of TSS, total sugars, ethyl alcohol, total soluble phenols, and total anthocyanins.

4.2.3. Response variables

The moisture content was determined with an Ohaus analyzer (MB45, Germany). The total soluble solids (TSS) were determined in the juice with a digital refractometer (ATAGORM, PAL-1, USA) and they were expressed in °Brix. A

dissolution obtained with 0.5 g of pulp in 15 mL of distilled water was prepared to measure pH with a potentiometer (Hanna Instruments, model HI-8420, Italy). The titratable acidity was measured in the same liquid with 0.01 N NaOH and phenolphthalein as indicator. The total sugar content was measured with the method of Dubois *et al.* (1956), in 300 μL of sample diluted with 300 μL of 5% phenol solution, where 1.5 mL of H_2SO_4 were added, followed by agitation and rest for 25 min. Thereafter, absorbance at 490 nm was measured in a microplate reader with integrated UV/Vis spectrophotometer (software Gen5, Biotek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA) and the total sugar content was calculated in grams per liter (g L^{-1}), based on a curve of glucose in the range of 6.4 to 30.0 mg L^{-1} .

The alcohol content was determined with the method described by Sayyad *et al.* (2015), with 1 mL of sample mixed with 1 mL of tri-n-butyl phosphate (TBP). Vigorous stirring was applied and two phases were formed. From the upper phase, 500 μL were taken and mixed with 500 μL of potassium dichromate dissolved at 10% (w/v) in H_2SO_4 5 M. Agitation was applied for 10 min until two phases were formed again. The lower phase was diluted and absorbance was read at 595 nm with an UV/Vis spectrophotometer. Ethanol content was expressed in grams per liter (g L^{-1}), with a standard curve of ethyl alcohol in the range of 7.5 to 150.0 g L^{-1} .

The phytochemical composition of fruits was evaluated in extracts prepared at 25 $^{\circ}\text{C}$ with the procedure described by Hernández-Rodríguez *et al.* (2019). One gram of fruit without seeds was mixed with 10 mL of 80% methanol and the pH was adjusted to 3.0 with 5% HCl. Agitation in vortex (Symphony VWR, China) was applied at 2,500 rpm for 3 min, followed by sonication in the dark with a Cole-Parmer 8890 bath (USA) for 15 min, agitation in an incubator (INO-650M, Prendo $\text{\textcircled{R}}$, Mexico) at 150 rpm and 30 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, and centrifugation with J-600 SolBat equipment (Mexico) at 3,500 rpm for 15 min. Supernatants were made up to 10 mL with 80% methanol. In the case of the fermentation kinetics, samples consisted on liquid taken from the experimental units.

The total soluble phenols (TSP) content was quantified with the Folin-Ciocalteu (F-C) method (Singleton and Rossi, 1965) adapted to a microplates reader (Salgado-Escobar *et al.* 2020). Based on this, 25 μL of extract, 125 μL of distilled water, 20 μL of F-C reagent diluted at 1:10 ratio, and 30 μL of 20% sodium carbonate were mixed; agitation and rest were applied for 30 min in the dark, and absorbance was measured at 760 nm with an UV/Vis spectrophotometer. Results were expressed as milligrams equivalent of gallic acid per gram of fresh sample (mg g^{-1}) and per liter (mg L^{-1}) in the fermented product, based on a standard curve prepared in the range of 2.5 to 29.0 mg L^{-1} . The total anthocyanin content was determined with the pH differential method (Lee *et al.*, 2005) in aliquots of 100 μL of extract mixed with 900 μL of buffers pH 1 (0.025 M KCl) and pH 4.5. Absorbance was measured at 510 and 700 nm in each case with an UV/Vis spectrophotometer. The total anthocyanins content (*Ant*) was determined with Equation (1), where *A* was obtained with Equation (2), *M* is the molecular weight of cyanidin-3-O-glucoside (449.2 g mol^{-1}), ϵ is the molar extinction coefficient of this compound ($26,900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and the constant 0.38 is the path length of the light beam. Results were expressed as milligrams equivalent of cyanidin-3-O-glucoside per gram of fresh sample (mg g^{-1}) and per liter (mg L^{-1}) in the fermented product.

$$Ant = (A M / 0.38 \epsilon) \quad (1)$$

$$A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 4.5} \quad (2)$$

Color density was measured with absorbances at 420 (A_{420}), 520 (A_{520}), and 620 nm (A_{620}), measured with the Biotek UV/Vis spectrophotometer. Color intensity (CI) was calculated with Equation (3), tone (*T*) with Equation (4), and percentages of yellow (*Ye*) and red (*Re*) colors with Equations (5) and (6), respectively (Glories, 1984).

$$CI = A_{420} + A_{520} + A_{620} \quad (3)$$

$$T = A_{420} / A_{520} \quad (4)$$

$$Ye = 100 A_{420}/CI \quad (5)$$

$$Re = 100 A_{520}/CI \quad (6)$$

The antioxidant activity (Aox) was measured with the FRAP (ferric reducing antioxidant power; Benzie & Strain, 1996) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid; Re *et al.*, 1999) assays adapted to a microplates reader (Hernández-Rodríguez *et al.* 2019). The FRAP reagent was prepared with acetate buffer (300 mM, pH 3.6) mixed with a 10 mM solution of 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) in 40 mM HCl and 20 mM iron (III) chloride solution, in a 10:1:1 ratio. Aliquots of 20 μ L reacted with 180 μ L of FRAP reagent and 60 μ L of distilled water. Absorbance at 595 nm was measured with an UV/Vis spectrophotometer and antioxidant activity (Aox, FRAP) was quantified with the aid of a standard curve of Trolox ranging from 3.8 to 46.0 μ M. On the other hand, the ABTS⁺ free radical was generated with the reaction of ABTS 7.4 mM and sodium persulfate 2.6 mM, mixed in a 1:1 (v/v) ratio. Six hundred microliters of ABTS⁺ were taken and made up to 10 mL with methanol. Twenty microliters of extract were mixed with 180 μ L of the ABTS⁺ solution and the decrease of absorbance at 734 nm was measured in an UV/Vis spectrophotometer. A Trolox standard curve ranging from 4.99 to 59.93 μ M was prepared and Aox (ABTS) was calculated. Both methods expressed results in micromoles equivalent of Trolox per gram of fresh sample (μ mol g⁻¹) and per liter (μ mol L⁻¹) in the fermented product.

4.2.4. Mathematical modeling of the fermentation process

The fermentation process was modeled as described by Setford *et al.* (2019) and Miller *et al.* (2019) through Equations (7) to (10), which described the behavior of total yeast, active yeast, alcohol production, and sugars consumption, respectively.

$$\frac{d c_{Ty}}{dt} = \mu c_{Ay} \quad (7)$$

$$\frac{d c_{Ay}}{dt} = \mu c_{Ay} - k_d c_{Ay} \quad (8)$$

$$\frac{d c_{Et}}{dt} = B c_{Ay} \quad (9)$$

$$\frac{d c_S}{dt} = \frac{B c_{Ay}}{Y_{Et/S}} \quad (10)$$

In these models, c_{Ty} is total yeast concentration (g L^{-1}), c_{Ay} is active yeast concentration (g L^{-1}), c_{Et} is ethanol concentration (g L^{-1}), c_S is sugar concentration (g L^{-1}), μ (d^{-1}) is the specific rate of biomass production, expressed through Equation (11) in mass of total yeast per unit of mass of active yeast per unit of time (d^{-1}), k_d is the rate of biomass inactivation, described by Equation (12) in grams of inactivated yeast per liter of fermentation medium per day ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$), k'_d is the yeast sensitivity to ethanol, expressed in grams of inactivated yeast per grams of ethanol per day (d^{-1}), B is the mass of alcohol produced per unit of mass of active yeast and per unit of time (d^{-1}), described by Equation (13), $Y_{Et/S}$ is the ratio of alcohol production rate to sugar consumption rate (dimensionless), μ_{max} is the maximum specific rate of biomass or yeast growth (d^{-1}), B_{max} is the maximum rate of alcohol produced, expressed in grams of ethanol produced per grams of active yeast per day (d^{-1}), and k_s is the Monod constant expressed in grams of sugar per liter of fermentation medium (g L^{-1}).

$$\frac{d c_{Ty}}{dt} = \mu c_{Ay} \quad (7)$$

$$\frac{d c_{Ay}}{dt} = \mu c_{Ay} - k_d c_{Ay} \quad (8)$$

$$\frac{d c_{Et}}{dt} = B c_{Ay} \quad (9)$$

$$\frac{d c_S}{dt} = \frac{B c_{Ay}}{Y_{Et/S}} \quad (10)$$

$$\mu = \frac{\mu_{max} * c_S}{k_s + c_S} \quad (11)$$

$$k_d = k'_d c_{Et} \quad (12)$$

$$B = \frac{B_{max} * c_S}{k_s + c_S} \quad (13)$$

In addition, the Equation (14) was used to describe the rate of solubilization of phenols in the fermentation medium (Chan *et al.*, 2014), where k_1 is an extraction constant, expressed in grams of soluble phenols extracted per grams of ethanol per day (d^{-1}), c_{TSP} is total soluble phenol concentration ($g L^{-1}$), and c_{TSP}^{max} is the maximum soluble phenols concentration ($g L^{-1}$).

$$\frac{dc_{TSP}}{dt} = c_{Et} * k_1 (c_{TSP} - c_{TSP}^{max})^2 \quad (14)$$

Similarly, the Equation (15) described the modification of anthocyanins content (Fernandes *et al.*, 2020), where k_A is the constant of anthocyanins liberation ($g L^{-1} d^{-1}$), c_{Ant}^{max} is the maximum anthocyanins concentration ($g L^{-1}$), k_{dA} is a constant of anthocyanins degradation, in grams of anthocyanins degraded per gram of alcohol per day (d^{-1}), and c_{Ant} is anthocyanins concentration ($g L^{-1}$).

$$\frac{d c_{Ant}}{dt} = k_A \left(\frac{c_{Ant}^{max} - c_{Ant}}{c_{Ant}^{max}} \right) - k_{dA} c_{Et} \quad (15)$$

The fourth order Runge-Kutta method was applied to solve the differential equations together with the nonlinear least squares algorithm developed through the *lsqnonlin.m* function, available in the Optimization Toolbox of Matlab® (The Mathworks Inc., 2008), to calibrate B_{max} , k_s , $Y_{Et/S}$, μ_{max} , k'_d , k_1 , c_{TSP}^{max} , k_A , k_{dA} , and c_{Ant}^{max} . The default values for the iterations number (200) and the tolerance function (1×10^{-6}) were used.

4.2.5. Data analysis

The experimental organization was conducted as a completely randomized design to evaluate the effect of the type of yeast used (NY and SC). Also, the characteristics of the fermented products were compared with a commercial wine

(CW) that was obtained with ‘Tempranillo’ grapes. Routines of analysis of variance and comparison of means were performed with the Tukey's test, with significance level of 0.05. Three repetitions were used in all experimental routines. In addition, the simulated behavior corresponding to changes in concentrations of alcohol, sugars, soluble phenols, and anthocyanins, was compared with experimental data. In this regard, the goodness of fit was evaluated with the determination coefficient (r^2), defined in the form of Equation (16) (Madadi *et al.*, 2013), where x_{exp} represents experimental data, x_{mod} data estimated by equations, and x_{mean} the mean value, under the consideration that as r^2 results closer to unity the fitting of data to the model is considered adequate.

$$r^2 = \frac{\sum_1^n (x_{exp} - x_{mod})^2}{\sum_1^n (x_{exp} - x_{mean})^2} \quad (16)$$

4. 3 Results and discussion

4.3.1. Plant material

The fruits presented the characteristics shown in Table 4. pH and contents of TSS, soluble phenols and anthocyanins were lower than those reported by Flores-García *et al.* (2019) and Joaquín-Cruz *et al.* (2015), who evaluated fruits from Aguascalientes and Veracruz, México, respectively, which suggested that the composition of *A. compressa* can vary between regions. In this regard, the influence of environmental factors on the physicochemical characteristics of *Ardisia compressa* fruits has not yet been studied; however, the reported works refer to areas with different altitude conditions. In other fruits, such as those of *Prunus avium* L., it has already been reported that altitude has an effect on quality characteristics and antioxidant activity (Faniadis *et al.*, 2010).

Table 4. Physicochemical and phytochemical characteristics of *Ardisia compressa* fruits.

Parameter	Value	Parameter	Value
TSS (°Brix)	6.38 (±0.29)	TSP (mg/g)	9.62 (±0.72)
pH	3.15 (±0.18)	Ant (mg/g)	4.42 (±0.073)
Total acidity (g/kg)	18.77 (±0.22)	Aox FRAP (µmol/g)	53.30 (±2.43)
Moisture (%)	87.00 (±1.61)	Aox ABTS (µmol/g)	73.84 (±8.03)

TSS: total soluble solids; TSP: total soluble phenols; Ant: total anthocyanins; Aox: antioxidant activity. Values in parentheses are standard deviation.

4.3.2. Must and fermented products

SC and NY produced must with pH of 3.013 (±0.012) and 3.007 (±0.090), acidity of 15.83 (±0.017) and 23.27 (±0.47) g L⁻¹, TSP of 3.48 (±0.15) and 4.45 (±0.37) mg L⁻¹, and total anthocyanins of 0.81 (±0.08) and 1.22 (±0.09) mg L⁻¹, respectively. The fermented products had alcohol content of 73.63 and 95.88 g L⁻¹, respectively (Table 5), with significant difference between them ($p \leq 0.05$), but the latter was similar ($p > 0.05$) to the alcohol content of the CW (101.7 g L⁻¹). Besides, the alcohol content of the NY-product was higher than that reported between 60 and 64 g L⁻¹ by Flores-García *et al.* (2019).

Table 5. Phytochemical characteristics of the fermented product obtained with *Ardisia compressa* fruits using *Saccharomyces cerevisiae* and native yeast.

Parameter	<i>S. cerevisiae</i>	Native yeast	Commercial wine*
Alcohol content (g/L)	73.63 (±5.90) b	95.88 (±3.34) a	101.70 (±2.45) a
Total sugars (g/L)	4.48 (±0.37) b	3.83 (±0.015) b	6.56 (±0.02) a
Total acidity (g/L)	13.85 (±0.63) a	14.83 (±0.02) a	5.38 (±0.28) b
TSP (mg/L)	2367.00 (±75.25) a	2213.00 (±172.06) a	244.96 (±7.20) b
Ant (mg/L)	215.46 (±50.94) b	287.40 (±3.23) a	28.87 (±1.10) c
Aox (ABTS, µmol/L)	16832.0 (±343.12) b	18614.00 (±386.56) a	1168.22 (±15.08) c

*Commercial wine (CW) produced with 'Tempranillo' grapes. Equal letters indicate non-significant difference (Tukey, 0.05).

The sugar content varied between 3.8 and 4.5 g L⁻¹. No significant difference ($p > 0.05$) was found between products of SC and NY, thus the latter had more

capacity to produce alcohol from similar sugars quantities. This content was lower than that of the CW, where the value was 6.6 g L^{-1} and was similar to the value between 3.2 and 3.8 g L^{-1} obtained by Flores-García *et al.* (2019). The acidity varied between 13.8 and 14.9 g L^{-1} in the fermented products obtained with SC and NY, without difference ($p > 0.05$) between them, but it was 2.5 times higher than that of CW (Table 5), due to the acid character of *A. compressa* fruits. In this regard, Flores-García *et al.* (2019) obtained values between 8.6 and 9.2 g L^{-1} with less acid fruits. Based on criteria of the Organisation für Rebe und Wein, Navrátilová *et al.* (2020) indicated that a dry wine have sugar content of up to 4 g L^{-1} , but may have up to 9 g L^{-1} if the difference between sugars and acid contents is less than 2 g L^{-1} . In addition, authors indicated that a semi-dry wine has sugar content that exceeds the sugar content of the labeled “dry” up to 12 g L^{-1} , but it may have up to 18 g L^{-1} if the difference between sugars and acid contents is higher than that for the labeled as “dry”. In this regard, the fermented products obtained with SC and NY showed similar characteristics to those of a semi-dry wine, while the CW had the characteristics of a dry wine.

The TSP content varied between $2,200.0$ and $2,370.0 \text{ mg L}^{-1}$ and was similar ($p > 0.05$) in the products of both yeasts, but these values were higher ($p \leq 0.05$) to the concentration of 245.0 mg L^{-1} of CW (Table 2). In addition, the TSP content was similar to values between $1,110.0$ and $2,860.0 \text{ mg L}^{-1}$ reported by Flores-García *et al.* (2019), which suggested that the fermented product of *A. compressa* fruits can contain higher quantities of antioxidants. The concentration of anthocyanins varied between 215.0 and 288.0 mg L^{-1} , which was found higher ($p \leq 0.05$) in the product obtained with NY than in that obtained with SC (Table 2) and in the CW, with ratios of $1.33/1.00$ and $9.95/1.00$, respectively. The color in fermented beverages such as wines is associated with anthocyanin content (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2021). Similarly, based on the high anthocyanin content found in the material obtained from *A. compressa* fruits, it was accepted that the observed color was derived from the presence of these compounds. On the other hand, the content of phenolic compounds can be important in the antioxidant activity of a material (Adebo and Medina-Meza, 2020). In this regard, Joaquín-

Cruz *et al.* (2015) found that the antioxidant activity of *A. compressa* fruits is higher than that of fruits such as strawberry, blueberry, and blackberry, and explained that this was due to a higher concentration of phenolic compounds. Therefore, the higher content of soluble phenols and anthocyanins obtained with NY may be determinant to allow higher antioxidant activity in relation with SC and the CW (Table 5), with ratios of 1.11/1.00 and 15.93/1.00, respectively. Romero *et al.* (2016) demonstrated that the presence of anthocyanins acts synergistically with polyphenols, increasing the antioxidant activity of the fruits of *Syzygium cumini* L. In wines made from blueberry and grape fruits using NY and SC, Martín-Gómez *et al.* (2021) reported that the beverages obtained with spontaneous fermentation had higher total phenolic content and antioxidant activity.

4.3.3 Kinetics of changes in the fermentation process

There was a constant decrease in sugar content during the first eight days of the fermentation process, at a rate of 19.45 g d⁻¹ with SC and 17.23 g d⁻¹ with NY. Subsequently, the sugar content became approximately constant, with similar values between 4.5 and 3.8 g L⁻¹ (Fig. 7). Consistently, the alcohol content increased in the first stage, at 9.61 g d⁻¹ and 12.33 g d⁻¹ with SC and NY, respectively. Thereafter, it tended to 73.63 g L⁻¹ with SC, which was close to the alcohol content obtained by Flores-García *et al.* (2019) with *S. cerevisiae*. However, the concentration was 95.88 g L⁻¹ with native yeast. Experimental data of alcohol production fitted well Equation (9), with determination coefficients (r^2) of 0.979 and 0.912 for SC and NY, respectively (Fig. 7A). According to such model, the variation of alcohol produced (dc_{Et}/dt) is a function of the active yeast concentration (c_{Ay}). The ratio between them corresponds to the rate of alcohol produced per unit of mass of active yeast per unit of time (B ; d⁻¹), which was expressed through a Monod model, as a function of sugar concentration (c_s), that constituted the main fermentation substrate (Equation 11). In this regard, the maximum production of alcohol per unit of mass of active yeast and per unit of time (B_{max} ; Equation 13) was 1.20 and 2.31 d⁻¹ in processes with SC and NY, respectively, which explained that the concentration of alcohol was higher with the latter. Similarly to a Michaelis-Menten kinetics, the Monod constant (k_s)

expresses the concentration of substrate at which the reaction rate reduces to 50% relative to the maximum rate (Liu, 2013). The modeling process indicated that k_s was of 3.40 and 1.72 g L⁻¹ with SC and NY, respectively, which indicated that NY maintained higher alcohol production rates than SC, even at lower sugar concentrations.

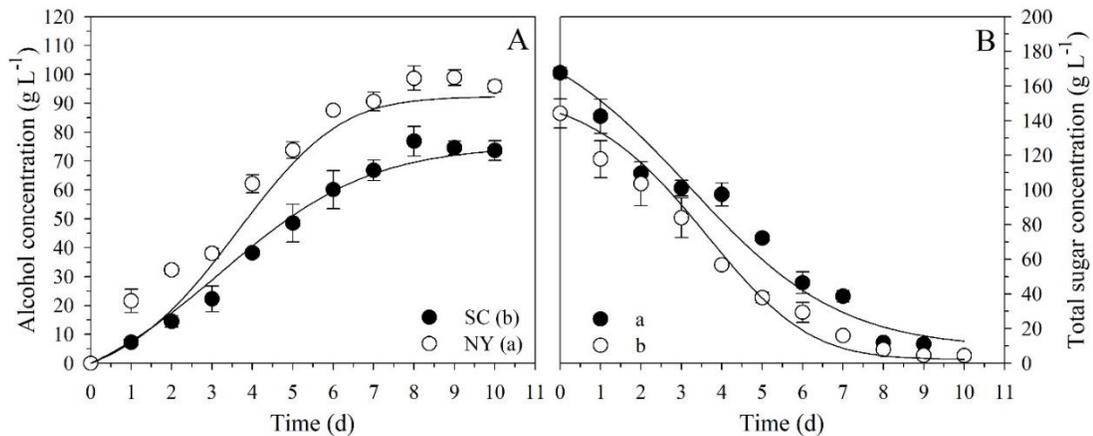


Fig. 7. Changes in alcohol (A) and sugar (B) contents during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* (SC) and native yeast (NY). Symbols are experimental data. Lines correspond to simulated behavior. Equal letters in legends indicate non-significant difference (Tukey, 0.05). Error bars correspond to standard deviation.

The rate of alcohol production was used to express the rate of sugar consumption (dc_s/dt) through dividing the former (dc_{Et}/dt) by the ratio of both ($Y_{Et/S}$). Data fitted well Equation (10), where r^2 and $Y_{E/S}$ were 0.976 and 0.50 with SC and 0.990 and 0.59 with NY, indicating better performance of NY (Fig. 7B). Besides, the sugar concentration (c_s) determined the rate of biomass production (μ ; Equation 11). In this regard, the simultaneous analysis of this model and Equations (7) and (8) indicated that the maximum variation of total yeast per unit of mass of active yeast and unit of time (μ_{max} ; d⁻¹) was 0.10 and 0.08 for SC and NY, respectively, which suggested that there was higher concentration of active native yeast than active *S. cerevisiae*. In fact, the model solution indicated that there was higher concentration of total native yeast than *S. cerevisiae* (Fig. 8), and also that the ratio of total yeast to active yeast was higher with NY than with SC.

In the case of total yeast, three stages were observed: an initial adaptation period, an accelerated growth stage, and a stationary stage. In this regard, the alcohol exerts an inhibitory effect on yeasts (Zhang *et al.*, 2018), which explained the last stage. However, according to Setford *et al.* (2019), a reduction in the concentration of active yeast occurs during the last stage, as described by Equation (8) and Fig. 8, where yeast sensitivity to ethanol (k'_d) was 0.0103 and 0.0110 d⁻¹ for processes based on SC and NY, respectively, which pointed out that the native yeast experienced higher sensitivity to the increment of alcohol concentration and, around 60 g L⁻¹, the accelerated stage ended and began the inactivation of the yeast. However, during most of the fermentation time, the active native yeast was maintained at higher concentration than *S. cerevisiae*, as indicated by k'_d , which again explained the better behavior of the former.

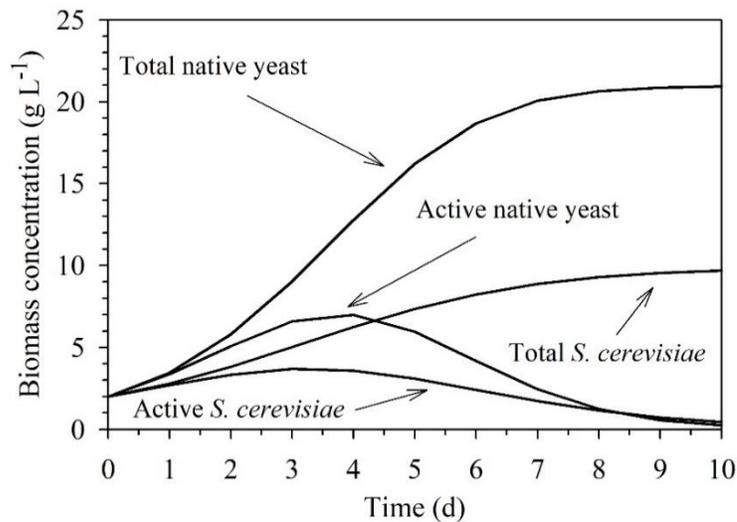


Fig. 8. Variation of total and active yeast during the fermentation process.

A fermented beverage can exhibit high quality and unique flavors when it is obtained with native or wild yeasts, but these can also cause deterioration of the product, since their behavior is unpredictable, so a careful evaluation of the process should be performed (Kumsa, 2020). In the present work, the native yeast showed a better performance than *S. cerevisiae*, but more investigation must be conducted to purify and identify the specific strain, which would allow to standardize the fermented product (Dellacassa *et al.*, 2017). Besides, the

evaluation of conditions at which the yeast can be propagated should be taken into account (Estrada-Martínez *et al.*, 2023). In this regard, according to Agbenorhevi *et al.* (2019), the changes in pH, titratable acidity, alcohol production, specific growth rate, polyphenol concentration, antioxidant activity, and quality of the final product are influenced by the type and amount of initial inoculum.

TSP varied between 1,504.0 (± 29.8) and 1,566.0 (± 20.0) $\mu\text{g mL}^{-1}$ at the beginning and increased rapidly during the first two days of fermentation. After, the trend was logarithmic towards values between 2,100 and 2,300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ at the end of 10 d, with no significant difference between yeasts (Fig. 9A). Experimental data fitted well Equation (14), where the extraction constant (k_1) was 0.110 and 0.485 d^{-1} , for processes with SC and NY, respectively. The raw material of the process was juice mixed with epidermis and seeds of fruits.

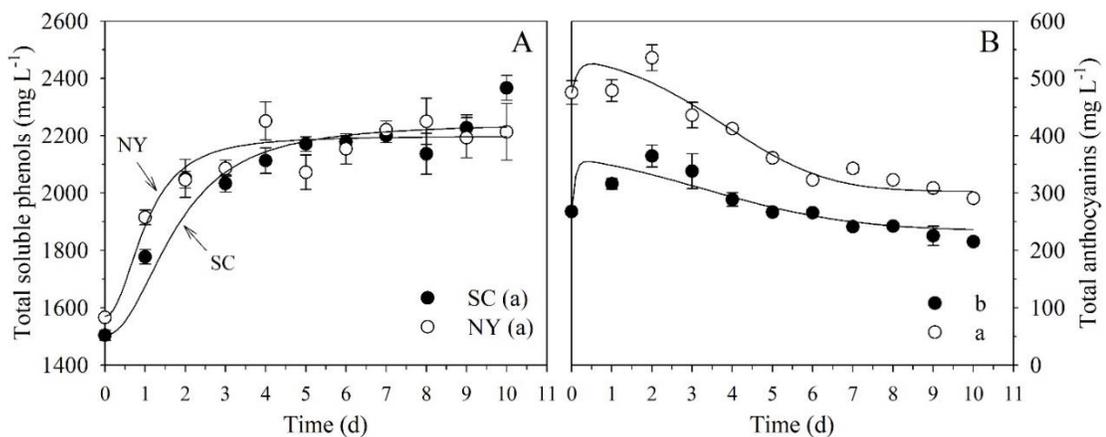


Fig. 9. Changes in the content of total soluble phenols (A) and total anthocyanins (B) during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* and native yeast. Symbols are experimental data. Lines correspond to simulated behavior. Equal letters in legends indicate non-significant difference (Tukey, 0.05). Error bars are standard deviation.

As the fermentation progressed, the native yeast allowed higher rate of alcohol production than *S. cerevisiae*, which favored greater extraction of soluble phenols from the solid phase, thus the extraction coefficient was higher. However, as time passed, the extraction capacity of soluble phenols was homogenized, which

caused that the maximum concentration of soluble phenols (c_{TSP}^{max}) reached the similar values of 2.25 and 2.20 g L⁻¹ for SC and NY, respectively.

The increment in phenolic content with fermentation has been reported before (Leonarski *et al.*, 2022; Mahmoudi *et al.*, 2021). According to Adebo and Medina-Meza (2020), this is due to breakdown of cell walls and enzymes activity that leads to compounds liberation. The initial content of soluble phenols corresponded to that of the liquid phase, while the rapid increase in concentration corresponded to compounds that came from the suspended solid phase, incorporated through a solid-liquid extraction phenomenon. Besides, the continuous upward trend suggested that phenolic compounds are in general not part of the fermentation substrate.

The raw material color largely determines the fermented product color. The *A. compressa* fruits contain high anthocyanin concentration, thus the appearance of the fermented beverage exhibited an intense red color. In particular, delphinidin-3-O-galactoside, petunidin-3-O-galactoside, and malvidin-3-O-galactoside have been found in greater proportion in these fruits (Joaquín-Cruz *et al.*, 2015). The total anthocyanin content was different between systems from the beginning (Fig. 3B), with 268.00 (± 4.68) mg L⁻¹ with SC and 465.00 (± 35.60) mg L⁻¹ with NY. Although both processes were prepared under similar conditions, they differed in the content of anthocyanins in the added must. In this regard, NY production was based on macerated whole fruits and the natural fermentation caused extraction of anthocyanins from the solid fraction. However, clarified juice and a portion of already pressed solid material were used with SC, which caused lower anthocyanin content.

The anthocyanin concentration increased from day zero to day two in both fermentations, but a rapid decrease occurred between days two and six, and such trend was maintained in the final stage, although at a lower rate. This behavior was coherent with Equation (15) (Fig. 9B) where, for the processes based on SC and NY, the constant of anthocyanins extraction (k_A) was 4.028 and 3.290 d⁻¹, the

constant of anthocyanins degradation (k_{dA}) was 0.019 and 0.015 d⁻¹, and the maximum anthocyanin concentration (c_{Ant}^{max}) was 0.360 and 0.538 g L⁻¹, respectively. In this regard, although the extraction constant was less with NY, the degradation constant was higher with SC, which allowed obtaining higher anthocyanin concentrations with the native strain.

The degradation of anthocyanins with the fermentation has been reported in other works. Wang *et al.* (2015) obtained a maximum peak of anthocyanins concentration on the first day of fermentation in the production of wine with blackberry. Also, Sun *et al.* (2011) found a higher quantity of anthocyanins on the second day of fermentation with grapes, but then the amount decreased. In the present work, the fruit of *A. compressa* was fermented with the skin from day zero to day 10, so it is assumed that there was a continuous transference of anthocyanins from the epidermis to the fermentation medium. However, the rate of extraction in the first few days was greater than the degradation or conversion to other compounds. In this regard, it was accepted that the alcohol acted as a solvent in a solid-liquid extraction phenomenon. Also, the concentration of monomeric anthocyanins changes constantly during fermentation, where products of the yeast metabolism, such as pyruvate, acetaldehyde, and vinylphenols, interact with anthocyanins to produce pyranoanthocyanins, anthocyanin oligomers, and polymeric pigments (Ruta and Farcasanu, 2019).

The color intensity (CI) was 0.465 with SC and 0.598 with NY at the fermentation beginning (Fig. 10A). Free or associated anthocyanins and the copigmentation effect with other phenolic compounds are important factors in the color of a wine. With maturation and aging, red tones shift towards red-orange, due to appearance of oligomeric and polymeric pigments (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2021). During the first days, the intense red color in red wines increases due to intra- and inter-molecular co-pigmentation reactions and self-association of anthocyanins, but later, co-pigmentation is interrupted by the alcohol production, giving rise to yellow tones (Casassa, 2017). Therefore, the higher CI value in NY systems was a

consequence of the higher concentration of anthocyanins in comparison with those based on SC.

Likewise, during the 2-3 d of fermentation, the CI increased in both cases, as a consequence of the increase in anthocyanins from the suspended solid phase. Subsequently, the CI value remained approximately constant, in the range from 0.84 to 0.90 in the system with NY and from 0.58 to 0.70 with SC. In addition, young wines exhibit maximum absorption at 520 nm and a shift towards higher absorbances at 420 nm occurs with maturation, thus the tone is evaluated as the ratio of the latter and that of the former (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2021). In the present work, the initial tone value was 0.70 in systems with SC and 0.51 with NY. In both, the value increased with fermentation (Fig. 10B), consistently with the kinetics reported for a traditional wine (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2021). In fact, the percentage of yellow shades increased during fermentation in both treatments, while that corresponding to red shades tended to decrease (Fig. 10C and 10D).

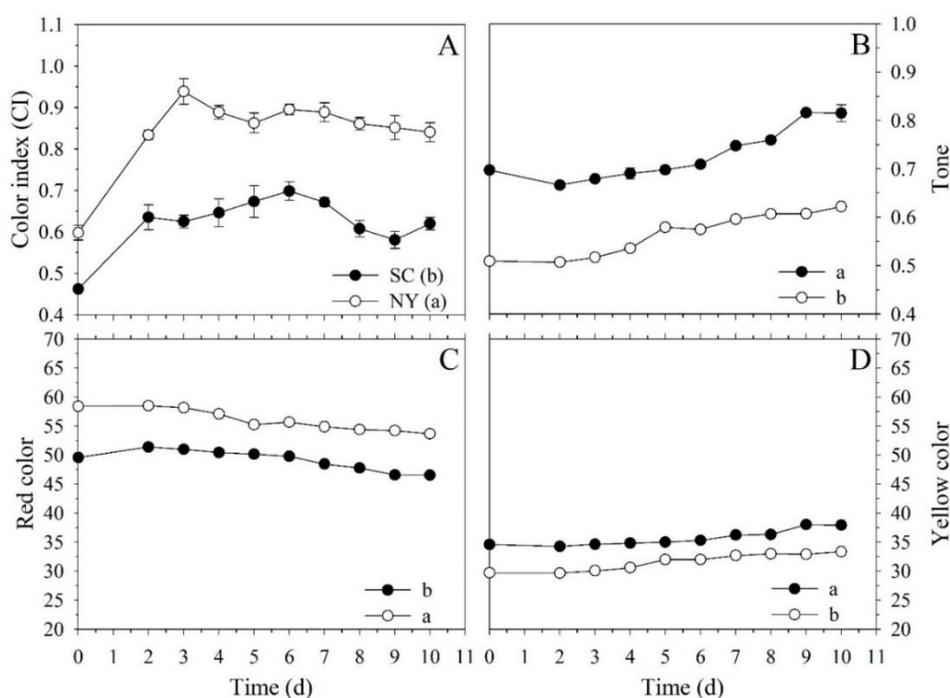


Fig. 10. Changes in color index (CI) (A), hue (B), percentage of red color (C), and percentage of yellow color (D) during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* and native yeast. Equal letters in legends indicate non-significant difference (Tukey, 0.05).

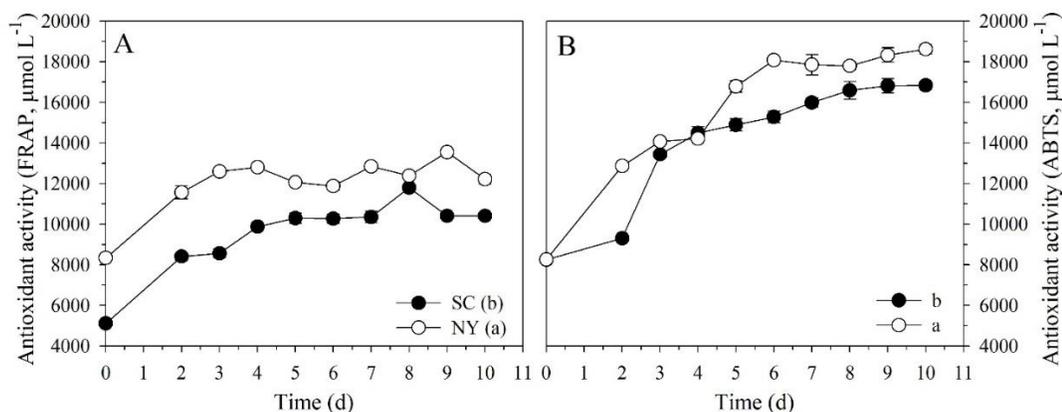


Fig. 11. Modification of the antioxidant capacity evaluated with the FRAP (A) and ABTS (B) assays during the alcoholic fermentation of *Ardisia compressa* fruits using *S. cerevisiae* and native yeast. Equal letters in legends indicate non-significant difference (Tukey, 0.05).

The antioxidant activity (Aox) was 5,110.0 (± 188.6) and 8,333.0 (± 205.7) $\mu\text{mol L}^{-1}$ with the FRAP assay at the beginning of fermentation with SC and NY, respectively (Fig. 11A). Meanwhile, the ABTS procedure yielded 8,253.0 (± 151.7) $\mu\text{mol L}^{-1}$ in both cases (Fig. 11B). The difference between methods is due to the first evaluates transference of hydrogen atoms, while the second evaluates transference of electrons (Shahidi and Zhong, 2015). The native yeast produced higher Aox than *S. cerevisiae* and this property increased rapidly between the beginning and the fourth day, although showed minor changes subsequently, reaching values of 10,406.0 (± 119.0) and 12,211.0 (± 396.6) $\mu\text{mol L}^{-1}$ with SC and NY, respectively, according to FRAP and values of 16,832.4 (± 343.0) and 18,614.2 (± 386.4) $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, according to ABTS. In fruits, different compounds interact to provide specific antioxidant properties. In grape, anthocyanins, flavan-3-ols, and flavonols are found mainly in the skin, seed and stalk, while non-flavonoids predominate in the pulp (Obreque-Slier *et al.*, 2010). Also, yeast metabolism products like acetaldehyde and other phenolics, such as hydroxycinnamic acids, participate in the formation of pigments derived from anthocyanins during and after alcoholic fermentation (Lingua *et al.*, 2016). According to Sun *et al.* (2011), the behavior of the antioxidant activity in a vinification process is due to a higher content of anthocyanins and total phenols

during the initial days, while in the advanced fermentation phase the antioxidant property is associated with a higher percentage of catechins, di and trimers of polymerized procyanidins, and polyphenols.

4.4 Conclusions

A fermented beverage was obtained from fruits of *Ardisia compressa*. The process was feasible both with a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (SC) and with native yeast (NY). The process with NY exhibited higher alcohol production and higher sugar consumption than with SC. The content of total soluble phenols was similar; however, the content of anthocyanins and antioxidant activity were higher with NY. Likewise, there was a greater change in anthocyanins with NY, which affected the color of the product and the antioxidant activity. The use of modeling allowed explaining the variation of yeast concentration, an increment of soluble phenols, and a depletion of anthocyanins. The native yeast was a better option to prepare a fermented beverage from *A. compressa* fruits.

Nomenclature

A_{420} , A_{520} , Absorbances at 420, 520, 620, and 700 nm, respectively.

A_{620} , A_{700}

A Absorbance obtained with Equation (2).

Ant (mg L⁻¹) Anthocyanin concentration (milligrams of anthocyanins per liter of sample).

B (d⁻¹) Rate of alcohol produced (grams of alcohol produced per gram of active yeast per day).

B_{max} (d⁻¹) Maximum rate of alcohol produced (grams of ethanol produced per grams of active yeast per day).

c_{Ant} (g L⁻¹) Anthocyanin concentration (grams of anthocyanins per liter of fermentation medium).

c_{Ant}^{max} (g L⁻¹) Maximum anthocyanin concentration (grams of anthocyanins per liter of fermentation medium).

c_{Ay} (g L ⁻¹)	Active yeast concentration (grams of active yeast per liter of fermentation medium).
c_{Et} (g L ⁻¹)	Ethanol concentration (grams of alcohol per liter of medium fermentation).
CI	Color index (dimensionless).
c_S (g L ⁻¹)	Sugar concentration (grams of sugars per liter of medium fermentation)
c_{TSP} (g L ⁻¹)	Total soluble phenols concentration (grams of soluble phenols per liter of fermentation medium).
c_{TSP}^{max} (g L ⁻¹)	Maximum concentration of soluble phenols (grams of soluble phenols per liter of fermentation medium).
c_{Ty} (g L ⁻¹)	Total yeast concentration (grams of yeast per liter of fermentation medium).
ε (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Molar extinction coefficient of cyanidin-3-O-glucoside.
k_1 (d ⁻¹)	Constant of extraction of soluble phenols (grams of soluble phenols extracted per grams of ethanol per day).
k_A (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Constant of anthocyanins liberation (grams of anthocyanins extracted per liter of fermentation medium per day).
k_d (g L ⁻¹ d ⁻¹)	Rate of biomass inactivation (grams of inactivated yeast per liter of fermentation medium per day).
k_{dA} (d ⁻¹)	Constant of anthocyanins degradation (grams of anthocyanins degraded per gram of alcohol per day).
k'_d (d ⁻¹)	Sensitivity of the yeast to ethanol (grams of inactivated yeast per grams of ethanol per day).
k_s (g L ⁻¹)	Monod constant (grams of sugar per liter of fermentation medium)
M	Molecular weight of cyanidin-3-O-glucoside.
μ (d ⁻¹)	Specific rate of biomass production (grams of total yeast produced per gram of active yeast per day).
μ_{max} (d ⁻¹)	Maximum specific rate of yeast growth (grams of total yeast produced per gram of active yeast per day).

r^2	Determination coefficient.
Re	Red percentage (dimensionless).
T	Tone (dimensionless).
t (d)	Process elapsed time (d).
x_{exp}	Experimental data.
x_{mean}	Mean experimental data.
x_{mod}	Data estimated by the model.
Ye	Yellow percentage (dimensionless).
$Y_{Et/S}$	Ratio of alcohol production rate to sugar consumption rate (daily grams of alcohol produced per daily grams of sugar consumed).

4.5 Acknowledgment

Authors are grateful for the support received from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) of Mexico.

4.6 References

- Adebo, O. A. and Medina-Meza, I. G. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: a mini review. *Molecules*, 25(4), 927. <https://doi.org/10.3390/molecules25040927>
- Agbenorhevi, J. K., Alemawor, F., Engmann, F. N. and Aduboffour, S. K. (2019). Quality of miracle berry wine as influenced by pH and inoculum levels. *Journal of Food and Nutrition Research*, 7(2), 148–154. <https://doi.org/10.12691/jfnr-7-2-7>
- Alcazar-Valle, M., Gschaedler, A., Gutierrez-Pulido, H., Arana-Sanchez, A. and Arellano-Plaza, M. (2019). Fermentative capabilities of native yeast strains grown on juices from different Agave species used for tequila and mezcal production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(2), 379–388. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00049-7>

- Álvarez-Ainza, M. L., Zamora-Quiñonez, K. A., Moreno-Ibarra, G. M. and Acedo-Félix, E. (2015). Genomic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated with alcoholic fermentation of bacanora produced by artisanal methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(5), 2668–2676. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1469-y>
- Antonio-Narcizo, L. C., Pérez-Pérez, W. D., Tomasini, A., García-Martínez, J. C. and León-Santiestebán, H. H. (2023). Ethanol production from Mexican fruit wastes using a new *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(1), 1–22. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2977>
- Bae, H. M., Haile, M. and Kang, W. H. (2022). Evaluation of antioxidant, organic acid, and volatile compounds in coffee pulp wine fermented with native yeasts isolated from coffee cherries. *Food Science and Technology International*, 28(8), 716–727. <https://doi.org/10.1177/10820132211051874>
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berbegal, C., Polo, L., Lizama, V., Álvarez, I., Ferrer, S., Pardo, I. and García-Esparza, M. J. (2023). Influence of native *S. cerevisiae* strains on the final characteristics of “Pago” garnacha wines from east Spain. *Beverages*, 9(1), 17. <https://doi.org/10.3390/beverages9010017>
- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D. and Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: the effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, 197, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.095>
- Blin, J. A., Hamid, R. A. and Khaza'ai, H. (2021). Bioactive fractions and compound of *Ardisia crispa* roots exhibit anti-arthritic properties mediated via angiogenesis inhibition *in vitro*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03341-y>
- Casassa, L. F. (2017). Flavonoid phenolics in red winemaking. In: *Phenolic*

Compounds - Natural Sources, Importance and Applications (M. Soto-Hernández, M. Palma-Tenango and M. R. and García-Mateos, eds.). IntechOpen, London, UK. <https://doi.org/10.5772/67452>

Chan, C. H., Yusoff, R. and Ngoh, G.-C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169–1186. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.10.001>

Dellacassa, E., Trenchs, O., Fariña, L., Debernardis, F., Perez, G., Boido, E. and Carrau, F. (2017). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) wine production in Angola: Characterisation of volatile aroma compounds and yeast native flora. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.014>

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

Estrada-Martínez, R. J., Favela-Torres, E., Soto-Cruz, N. O., Saucedo-Castañeda, G. and Martínez-Valdez, F. J. (2023). Respiro-fermentative metabolism in yeast cultivated in solid-state culture: The Crabtree effect and ethanol production. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 22(1), 1–18. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio3025>

Faniadis, D., Drogoudi, P. D. and Vasilakakis, M. (2010). Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 125(3), 301–304. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.04.013>

Fernandes, F. A. N., Fonteles, T. V., Rodrigues, S., de Brito, E. S. and Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and phenolics from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) peel: kinetics and mathematical modeling. *Journal of Food Science and Technology*, 57(6), 2321–2328. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04270-3>

- Flores-García, A., Márquez-Meléndez, R., Salas, E., Ayala-Soto, G., Salmerón, I. and Hernández-Ochoa, L. (2019). Physicochemical and sensory characteristics of a chagalapoli fruit (*Ardisia compressa*) beverage fermented using *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Science*, 2019, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/9687281>
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Ire partie : les équilibres des anthocyanes et des tanins. *OENO One*, 18(3), 195. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1984.18.3.1751>
- Hernández-Rodríguez, G., Espinosa-Solares, T., Pérez López, A., Salgado-Escobar, I. and Guerra-Ramírez, D. (2019). Antioxidant capacity of capulin (*Prunus serotina* subsp. capuli (Cav). McVaugh) fruit at different stages of ripening. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 6(16), 35–44. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1947>
- Islam, M. R., Naima, J., Proma, N. M., Hussain, M. S., Uddin, S. M. N. and Hossain, M. K. (2019). *In-vivo* and *in-vitro* evaluation of pharmacological activities of *Ardisia solanacea* leaf extract. *Clinical Phytoscience*, 5(32), 2–11. <https://doi.org/10.1186/s40816-019-0128-9>
- Joaquín-Cruz, E., Dueñas, M., García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C. and García-Salinas, C. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.033>
- Kumsa, N. A. (2020). Review on the effect of fruit wine quality and fermentation conditions on the quality of wine. *Food Science & Nutrition Technology*, 5(5), 1–9. <https://doi.org/10.23880/fsnt-16000226>
- Lee, J., Robert, W. D. and Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278. Doi:

<https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>

Leonarski, E., Guimarães, A. C., Cesca, K. and Poletto, P. (2022). Production process and characteristics of kombucha fermented from alternative raw materials. *Food Bioscience*, 49, 101841. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101841>

Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A. and Baroni, M. V. (2016). From grape to wine: changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208, 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.009>

Liu, S. (2013). *Kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*. Elsevier B.V., The Netherlands.

Madadi, B., Pazuki, G. and Nasernejad, B. (2013). Partitioning of cefazolin in biocompatible aqueous biphasic systems based on surfactant. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 58(10), 2785–2792. <https://doi.org/10.1021/je4004756>

Mahmoudi, B., Mousavi, Z. E. and Khodaiyan, F. (2021). A functional non-dairy beverage produced from jujube extract using probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 23(4), 813–824.

Manjato, N., Ravololomanana, N. and Razakamalala, R. (2020). Two new species of *Ardisia* (Primulaceae) from southeastern Madagascar. *Novon, A Journal for Botanical Nomenclature*, 28(1), 64–73. <https://doi.org/10.3417/2019440>

Martín-Gómez, J., García-Martínez, T., Varo, M. Á., Mérida, J. and Serratos, M. P. (2021). Phenolic compounds, antioxidant activity and color in the fermentation of mixed blueberry and grape juice with different yeasts. *LWT*, 146, 111661. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111661>

Miller, K. V., Oberholster, A. and Block, D. E. (2019). Predicting the impact of red winemaking practices using a reactor engineering model. *American Journal of Enology and Viticulture*, 70(2), 162–168. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.18076>

- Navrátilová, M., Beranová, M., Severová, L., Šrédli, K., Svoboda, R. and Abrhám, J. (2020). The impact of climate change on the sugar content of grapes and the sustainability of their production in the Czech Republic. *Sustainability*, 13(1), 222. <https://doi.org/10.3390/su13010222>
- Nuñez-Guerrero, M. E., Páez-Lerma, J. B., Rutiaga-Quiñones, O. M., González-Herrera, S. M. and Soto-Cruz, N. O. (2016). Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* juice. *Food Microbiology*, 54, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.011>
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Zamora-Marín, F., Ricardoda Silva, J. M. and Laureano, O. (2010). Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from carménère and cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3591–3599. <https://doi.org/10.1021/jf904314u>
- Portugal, C. B., de Silva, A. P., Bortoletto, A. M. and Alcarde, A. R. (2017). How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? *Food Research International*, 91, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.022>
- POWO. (2023). *Plants of the World Online*. Royal Botanic Gardens, Kew. Royal Botanic Gardens, Kew. <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
- Rai, A. K. and Anu Appaiah, K. A. (2014). Application of native yeast from garcinia (*Garcinia xanthochumus*) for the preparation of fermented beverage: Changes in biochemical and antioxidant properties. *Food Bioscience*, 5, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.008>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Do Neche, B. and Lonvaud, A. (2021).

Handbook of Enology. Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications (Third edit.). John Wiley & Sons, Ltd., New York, USA.

- Romero, O. C., Gómez, S. M., de la Rosa, Torres, C., Puertas-Mejia, M. A. and Rojano, B. (2016). Phenol and anthocyanin content and correlation with the antioxidant capacity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (jambolan). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(1), 63–70.
- Ruta, L. L. and Farcasanu, I. C. (2019). Anthocyanins and anthocyanin-derived products in yeast-fermented beverages. *Antioxidants*, 8(6), 182. <https://doi.org/10.3390/antiox8060182>
- Salgado-Escobar, I., Hernández-Rodríguez, G., Suárez-López, Y. del C., Mancera-Ugarte, M. J. and Guerra-Ramírez, D. (2020). Eficacia de métodos de desinfección y los efectos sobre las propiedades nutraceuticas en cilantro y fresa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(2), 327–337. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.1892>
- Sayyad, S. F., Chaudhari, S. R. and Panda, B. P. (2015). Quantitative determination of ethanol in arishta by using uv-visible spectrophotometer. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*, 2(5), 204–207.
- Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R. and Muhlack, R. A. (2019). Mathematical modelling of anthocyanin mass transfer to predict extraction in simulated red wine fermentation scenarios. *Food Research International*, 121, 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.044>
- Setford, P., Jeffery, D., Grbin, P. and Muhlack, R. (2018). Mass transfer of anthocyanins during extraction from pre-fermentative grape solids under simulated fermentation conditions: effect of convective conditions. *Molecules*, 24(1), 73. <https://doi.org/10.3390/molecules24010073>
- Shahidi, F. and Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>
- Singleton, V. L. and Rossi, J. J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of*

Enology and Viticulture, 16, 144–158.

- Sun, B., Neves, A. C., Fernandes, T. A., Fernandes, A. L., Mateus, N., De Freitas, V., Leandro, C. and Spranger, M. I. (2011). Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6550–6557. <https://doi.org/10.1021/jf201383e>
- The Mathworks Inc. (2008). *Optimization Toolbox™ 4 User's Guide*. Natick, Natick, Massachusetts, USA.
- Vázquez-Sánchez, A. Y., Aguilar-Zárate, P., Muñoz-Márquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A. and Martínez-Ávila, G. C. G. (2019). Effect of ultrasound treatment on the extraction of antioxidants from *Ardisia compressa* Kunth fruits and identification of phytochemicals by HPLC-ESI-MS. *Heliyon*, 5(12), e03058. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03058>
- Wang, L., Sun, X., Li, F., Yu, D., Liu, X., Huang, W. and Zhan, J. (2015). Dynamic changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity of mulberry wine during alcoholic fermentation. *Journal of Functional Foods*, 18, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.013>
- Wang, M. L., Wei, X., Shi, Y. C. and Kong, D. X. (2014). Growth and photosynthetic characteristics of *Ardisia corymbifera* var. *tuberifera* in bionic wild cultivation. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 37(10), 1721–1724.
- Zhang, G., Chen, W., Chen, W. and Chen, H. (2018). Improving the quality of matured coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water by low alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: antioxidant and volatile profiles. *Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 964–976. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3004-y>

5. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Ardisia compressa* SEPARADOS CON SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS CONTROLADOS POR pH

Resumen

Los frutos de *Ardisia* spp. contienen compuestos bioactivos con potencial antioxidante y antocianinas que pueden servir de pigmentos naturales, pero éstas son sensibles a pH y, además, están en mezcla con azúcares que pueden limitar su aprovechamiento. El objetivo fue evaluar el comportamiento de un sistema acuoso bifásico basado en citrato de sodio y acetona, así como ácido cítrico incorporado para controlar el pH, en la separación de antocianinas y compuestos bioactivos de frutos de *Ardisia compressa*, atendiendo la reducción de azúcares. Se estudiaron diagramas binodales de fase para la mezcla de citrato trisódico (Na_3Cit), ácido cítrico (HCit) y acetona. Con base en condiciones evaluadas en dos líneas de operación se prepararon sistemas acuosos bifásicos (ABS) y se verificó que, con base en la concentración fue factible obtener sistemas de separación con pH menor a 5.0. Los ABS se prepararon con jugo de frutos de *A. compressa* y se determinó que las antocianinas presentes migraron hacia la fase superior con rendimientos de separación que variaron entre 64.2 y 96.5%, en tanto que los azúcares fueron retenidos en la fase inferior, con rendimiento de separación que varió entre 38.2 y 88.2%. Se determinó que con un sistema basado en 14.02% Na_3Cit , 7.42% HCit y 27.60% acetona fue factible obtener extractos a partir de la fase superior de los ABS, con pH de 4.87, con 550.40 mg/L de antocianinas, equivalentes a la recuperación del 91.0% de estos compuestos. Mediante ensayos de pigmentación se determinó que las antocianinas pueden servir como agentes de pigmentación si se manejan en baja temperatura y oscuridad. Se concluyó que el uso de ABS con un agente acidificante como el ácido cítrico permitió la separación adecuada de compuestos bioactivos de fruto de *A. compressa*, lo que le da valor agregado a esta especie.

Palabras clave: *Ardisia* spp., antocianinas, pH, sistemas acuosos bifásicos, FTIR.

Tesis de Doctorado en Ingeniería del Programa de Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua,
Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Guillermina Hernández Rodríguez

Director de tesis: Dr. Salvador Valle Guadarrama

Abstract

The fruits of *Ardisia* spp. They contain bioactive compounds with antioxidant potential and anthocyanins that can serve as natural pigments, but these are sensitive to pH and, furthermore, they are mixed with sugars that can limit their use. The objective was to evaluate the behavior of a biphasic aqueous system based on sodium citrate and acetone, as well as citric acid incorporated to control the pH, in the separation of anthocyanins and bioactive compounds from *Ardisia compressa* fruits, addressing the reduction of sugars. Binodal phase diagrams for the mixture of trisodium citrate (Na₃Cit), citric acid (HCit) and acetone were studied. Based on conditions evaluated in two operating lines, biphasic aqueous systems (BAS) were prepared and it was verified that, based on the concentration, it was feasible to obtain separation systems with pH less than 5.0. The BAS were prepared with *A. compressa* fruit juice and it was determined that the anthocyanins present migrated to the upper phase with separation yields that varied between 64.2 and 96.5%, while the sugars were retained in the lower phase, with yields of separation that varied between 38.2 and 88.2%. It was determined that with a system based on 14.02% Na₃Cit, 7.42% Hcit and 27.60% acetone it was feasible to obtain extracts from the upper phase of the BAS, with a pH of 4.87, with 550.40 mg/L of anthocyanins, equivalent to the recovery of 91.0% of these compounds. Through pigmentation tests, it was determined that anthocyanins can serve as pigmentation agents if they are handled at low temperature and in the dark. It was concluded that the use of BAS with an acidifying agent such as citric acid allowed the adequate separation of bioactive compounds from the *A. compressa* fruit, which gives added value to this species.

Key words: *Ardisia* spp., anthocyanins, pH, biphasic aqueous systems, FTIR.

5.1 Introducción

El género *Ardisia* Sw. (Primulaceae) es pantropical y está integrado por arbustos, árboles o hierbas leñosas, pertenecientes a 720 especies que producen frutos globosos de una sola semilla (POWO, 2023). Las especies de este género han atraído mucho interés por su alto potencial antioxidante, derivado de la presencia de distintos compuestos bioactivos, donde sobresale el contenido fenólico o derivado (Joaquín-Cruz et al., 2015; Siti Azima, Noriham, & Manshoor, 2017; Tian-Liang et al., 2023; Vázquez-Sánchez et al., 2019).

El color del fruto de distintas especies de este género, tales como *A. compressa*, es causado por la presencia de antocianinas (Joaquín-Cruz et al., 2015; Siti Azima et al., 2017), que constituyen pigmentos polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, donde proporcionan colores rosa, rojo, púrpura y azul en diversos frutos, flores y hortalizas (Sinopoli, Calogero, & Bartolotta, 2019). Por esta capacidad para proveer color, las antocianinas han ganado interés para ser usadas como agentes pigmentantes de productos alimenticios, cosméticos y textiles (Brudzyńska, Sionkowska, & Grisel, 2021; Câmara et al., 2022), entre otros, y sustituir el uso de colorantes artificiales de tonalidad similar, los cuales han sido asociados con riesgos para la salud humana (Malabadi, Kolkar, & Chalannavar, 2022). En tal sentido, los frutos de *Ardisia* spp. con alto contenido de antocianinas pueden servir de base para impulsar una industria de pigmentos naturales en las regiones productoras y contribuir al fomento de su desarrollo económico.

Las antocianinas se pueden separar de diversas fuentes vegetales mediante extracción tradicional sólido-líquida con una mezcla de disolvente y agua (Tena & Asuero, 2022), auxiliada con ultrasonido, con aplicación de microondas (Caldas et al., 2018)(Da Porto & Natolino, 2018)(Romero-Díez et al., 2019) o el uso de enzimas (Benucci et al., 2017), o bien con fluidos presurizados o en condiciones supercríticas (García-Mendoza et al., 2017). Sin embargo, si el material es rico en azúcares, como ocurre en casos como *A. compressa*, el extracto mostrará alto

contenido de estos compuestos, lo cual puede dificultar el uso como ingrediente en productos alimenticios. Al respecto, diversos trabajos han mostrado que el uso de sistemas acuosos bifásicos permite separar antocianinas con eficiencia (Li et al., 2023; X. Zhang et al., 2022) y, asimismo, que esta técnica tiene potencial de reducir o eliminar azúcares en el extracto de antocianinas (Chandrasekhar Jampani & Raghavarao, 2015; Sandate-Flores et al., 2020).

Un sistema acuoso bifásico puede formarse con la mezcla de dos compuestos hidrosolubles, ya sea dos polímeros (Chen, Guo, Yang, Wan, & Cao, 2022), un polímero y una sal (Li et al., 2023; Sandate-Flores et al., 2020) o un solvente orgánico y una sal (Chong & Brooks, 2021; Le, Dao, Huynh, Tran, & Nguyen, 2023; Odabaş & Koca, 2020) donde, a partir de cierta concentración, la mezcla transita de una condición de una fase o solución homogénea a otra de dos fases inmiscibles, derivado de mecanismos de exclusión salina (salting-out) o formación de puentes de hidrógeno (Baghlani & Sadeghi, 2018; Cai et al., 2019; Zhu et al., 2022), lo que origina la separación de los componentes de la mezcla entre las fases desarrolladas.

Por otro lado, las antocianinas son sensibles a pH y estables en el rango de 3.0 a 5.0, pero en valores distintos experimentan degradación (Lee, Robert, & Wrolstad, 2005). En tal sentido, si un proceso de separación de antocianinas se basa en sistema acuosos bifásicos, debe cuidarse que los componentes permitan disponer de condiciones adecuadas en esta variable. Actualmente existe una tendencia al desarrollo de sistemas acuosos bifásicos basados en mezclas de solventes orgánicos y sales (Chong & Brooks, 2021; Le et al., 2023; Lima et al., 2021), por la facilidad de eliminar el disolvente mediante vaporización, pero, en tal caso, se debe buscar que este último exhiba un punto de ebullición bajo para evitar la degradación de las antocianinas por la exposición a temperatura alta. Al respecto, Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama (2020) mostraron que un sistema basado en acetona y citrato de sodio tiene potencial adecuado para separar compuestos fenólicos. Sin embargo, el citrato de sodio puede causar un incremento de pH en el sistema (Hamzehzadeh & Zafarani-Moattar, 2015), por lo

que es recomendable aplicar una estrategia de acidificación (Vidana Gamage, Lim, & Choo, 2021). Al respecto, el uso de una mezcla de citrato de sodio y ácido cítrico puede contribuir al control del pH durante el proceso de separación, pero es necesario evaluar si la adición del componente ácido permite también la formación de sistemas bifásicos. En tal sentido, el objetivo fue evaluar el comportamiento de un sistema acuoso bifásico basado en citrato de sodio y acetona, así como ácido cítrico adicionado para control de pH, en la separación de antocianinas de frutos de *Ardisia compressa*, atendiendo la reducción de azúcares.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Material vegetal

Se utilizaron frutos de *Ardisia compressa* colectados en madurez de consumo en Mecatlán, Xicotepec de Juárez, Puebla, México (20°15'39" N, 97°35'42" O; 960 m sobre el nivel del mar). El jugo y la pulpa de los frutos se caracterizaron en términos de contenidos de azúcares totales y antocianinas totales (ver sección "Cuantificación de concentraciones").

5.2.2 Diagrama binodal de fases

Se usaron soluciones de citrato de sodio anhidro ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; Na_3Cit) al 35 % (p/p), ácido cítrico anhidro ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; HCit) al 40 % (p/p), ambas preparadas con agua desionizada. Asimismo, se usó acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$; Acet) al 99.5 % (p/p). Se aplicó el método del punto de turbidez a 25 °C para identificar estados binodales o de transición de condición monofásica a bifásica (Merchuk, Andrews, & Asenjo, 1998). Se colocaron 3 g de solución de Na_3Cit y 1 g de solución de HCit en un tubo de 70 mL (Pyrex®) y se añadió acetona gota a gota con agitación manual hasta observar apariencia turbia permanente. Luego, se agregó gota a gota agua desionizada hasta obtener una apariencia transparente. Se repitió la adición gota a gota de acetona hasta tener apariencia turbia, luego la adición de agua hasta tener apariencia transparente y así sucesivamente. Con base en los pesos de cada estado y mediante rutinas de balance de materiales, se calcularon las

concentraciones binodales de Na₃Cit (x_N^{bin} , % w/w), HCit (y_C^{bin} , % w/w), y acetona (z_A^{bin} , % w/w). Con base en criterios de diferencias finitas, se estudiaron las relaciones $x_N^{bin} - z_A^{bin}$ y $y_C^{bin} - z_A^{bin}$ y se ajustaron a las Ecuaciones (1) y (2), respectivamente (Merchuk et al., 1998) con apoyo del software Sigma Plot (SPSS, 2000), donde k_1, k_2, k_3, k_4, k_5 , y k_6 , son constantes de regresión.

$$z_A^{bin} = k_1 e^{(k_2(x_N^{bin})^{0.5} - k_3(x_N^{bin})^3)} \quad (1)$$

$$z_A^{bin} = k_4 e^{(k_5(y_C^{bin})^{0.5} - k_6(y_C^{bin})^3)} \quad (2)$$

Se identificó la condición binodal con mayor concentración de acetona y menor de Na₃Cit y HCit, denotada como A ($x_N^{min}, y_C^{min}, z_A^{max}$) y también la de menor concentración de acetona y mayor de Na₃Cit y HCit, denotada como B ($x_N^{max}, y_C^{max}, z_A^{min}$). Para distintas concentraciones de acetona en el rango de z_A^{min} a z_A^{max} se determinaron las concentraciones binodales ajustadas y se graficaron para obtener una curva binodal. En adición, con base en los estados A ($x_N^{min}, y_C^{min}, z_A^{max}$) y B ($x_N^{max}, y_C^{max}, z_A^{min}$) se construyó una línea principal de operación, cuya pendiente se obtuvo con base en un criterio de diferencias finitas mediante las relaciones de la Ecuación (3). Asimismo, En adición, entre la línea principal de operación y la curva binodal se trazó una línea de operación secundaria (C-D), con la misma pendiente que la primera.

$$m_{XZ} = \frac{\Delta z_A}{\Delta x_N} = \frac{z_A^{max} - z_A^{min}}{x_N^{min} - x_N^{max}} \quad m_{YZ} = \frac{\Delta z_A}{\Delta y_C} = \frac{z_A^{max} - z_A^{min}}{y_C^{min} - y_C^{max}} \quad (3)$$

5.2.3 Sistemas acuosos bifásicos: pH y relación de volúmenes

Se eligieron cinco condiciones equidistantes sobre cada línea de operación (Figura 1B) para preparar soluciones a 25 °C con masa total de 20 g utilizando agua desionizada (pH 5.7±0.044) como disolvente con pH 5.7 (±0.044) y también jugo de los frutos de *A. compressa*. Las mezclas se agitaron en vórtex (Vortex Genie 2, Mod. G560, EE. UU.) durante 60 s, se dejaron en reposo durante 15

min, y se centrifugaron a 2,900×g durante 5 min (Ohaus, Mod.FC5718R, Germany). Se formaron dos fases líquidas, una superior (t), formada principalmente por acetona, y otra fase inferior (b), formada principalmente por Na₃Cit y HCit. Las fases se separaron, se les midió volumen con una probeta graduada, pH con un potenciómetro portátil (Hanna Instruments, modelo HI-8420, Italia) y se calculó la relación de volúmenes (V_r) mediante la Ecuación (4), donde V_t , (mL) fue el volumen de la fase superior y V_b (mL) el de la fase inferior (Raja, Murty, Thivaharan, Rajasekar, & Ramesh, 2011).

$$V_r = \frac{V_t}{V_b} \quad (4)$$

5.2.4 Separación y concentración de antocianinas y azúcares

Se prepararon sistemas acuosos bifásicos a 25 °C y masa total de 20 g, con la composición de los cinco estados elegidos sobre la línea de operación A-B y los cinco elegidos sobre la línea C-D. En cada caso se usó jugo de frutos de *A. compressa* como disolvente y el mismo procedimiento de agitación en vórtex, reposo, centrifugación y separación de fases descrito antes. Cada fase se sometió a evaluación de concentración de antocianinas (c_{ant}^t, c_{ant}^b ; mg/mL) y azúcares totales (c_{azu}^t, c_{azu}^b ; mg/mL) con las metodologías descritas en la sección “*Cuantificación de concentraciones*”. Con ello, se evaluó el rendimiento de separación de antocianinas y azúcares en la fase superior ($Y_{fst}^t, Y_{ant}^t, Y_{azu}^t$, %) y la fase inferior ($Y_{fst}^b, Y_{ant}^b, Y_{azu}^b$, %) de los sistemas mediante las Ecuaciones (5) y (6) (Chandrasekhar, Sonika, Madhusudhan, & Raghavarao, 2015).

$$Y_{ant}^t = \frac{100 c_{ant}^t V_t}{c_{ant}^t V_t + c_{ant}^b V_b} \quad Y_{azu}^t = \frac{100 c_{azu}^t V_t}{c_{azu}^t V_t + c_{azu}^b V_b} \quad (5)$$

$$Y_{ant}^b = \frac{100 c_{ant}^b V_b}{c_{ant}^t V_t + c_{ant}^b V_b} \quad Y_{azu}^b = \frac{100 c_{azu}^b V_b}{c_{azu}^t V_t + c_{azu}^b V_b} \quad (6)$$

5.2.5 Ensayos de pigmentación

Se eligió una condición del diagrama binodal de fases y se preparó el sistema acuoso bifásico correspondiente con jugo de frutos como disolvente. La fase superior se manejó en evaporador rotatorio (Buchi R-300, Suiza) para eliminar la acetona. Se adquirió yogur natural comercial (Alpura S.A. de C.V., México) que tuvo pH de 4.35 y se prepararon tres recipientes con 30 mL cada uno. En cada unidad se agregó extracto en forma gradual para tener concentración que varió de entre 0 y 6.3%. Después de cada adición, se evaluó color en términos de luminosidad (L^*), ángulo de tono (H^*) y cromaticidad (C^*) mediante un colorímetro Hunter Lab (Miniscan XE Plus, Hunter Lab®, USA). Los datos se analizaron con el software Sigma Plot (SPSS, 2000) y se ajustaron a modelos con la forma de las Ecuaciones (7) a (9), donde L_0^* , H_0^* , C_0^* , a_i , b_i , y c_i , son constantes de regresión y m_e es masa de extracto.

$$L^* = L_0^* + a_1(1 - e^{-b_1 m_e}) \quad (7)$$

$$H^* = H_0^* + a_2(1 - e^{-b_2 m_e}) \quad (8)$$

$$C^* = C_0^* + a_3(1 - e^{-b_3 m_e}) \quad (9)$$

Con la información de la Ecuación (8), se aplicaron las relaciones de la Ecuación (10) para evaluar el valor límite de luminosidad (L_{lim}^*), ángulo de tono (H_{lim}^*), y cromaticidad (C_{lim}^*) que podían alcanzarse con la adición de una cantidad infinita de extracto. Asimismo, se aplicó la Ecuación (11) para evaluar la cantidad de extracto requerida para tener pigmentación de 95% ($m_e^{0.95}$) respecto a H_{lim}^* .

$$L_{lim}^* = L_0^* + a_1; \quad H_{lim}^* = H_0^* + a_2; \quad C_{lim}^* = C_0^* + a_3 \quad (10)$$

$$m_e^{0.95} = \left(\frac{1}{b_2}\right) \ln(20) \quad (11)$$

Se prepararon nueve recipientes con yogur y se agregó extracto en la cantidad definida para $m_e^{0.95}$. Tres de los recipientes se colocaron en ambiente con luz a 35 °C, tres se colocaron en oscuridad a 27.5 °C y los tres restantes se colocaron en oscuridad a 4 °C. Diariamente y por un periodo de 26 d se evaluó color en las unidades en términos de L*, H* y C*.

5.2.6 Cuantificación de concentraciones

La concentración de antocianinas totales se evaluó mediante el protocolo espectrofotométrico de diferencial de pH descrito por Lee et al. (2005). Una alícuota de extracto, jugo o muestra de cada fase se mezcló con buffer pH 1 (0.025 M KCl). La absorbancia de la mezcla se midió a 510 y 700 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas (Synergy™ HTX, BioTek Instruments, Inc., USA). Otra alícuota se mezcló con buffer pH 4.5 y se le midió absorbancia a las longitudes de onda mencionadas. El contenido de antocianinas totales (Ant) fue determinado mediante el cálculo $[Ant = (A_{PM}/0.38 \epsilon)]$, donde A se obtuvo con la expresión $[A = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 1.0} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH 4.5}]$, PM es el peso molecular de la cianidina-3-O-glucósido (449.2 g mol⁻¹), ϵ es el coeficiente de extinción molar de este compuesto (26,900 L mol⁻¹cm⁻¹) y la constante 0.38 es la longitud de trayectoria de haz de luz. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de cianidina-3-O-glucósido por litro (mg/mL).

La concentración de azúcares totales se evaluó con el método de fenol-sulfúrico descrito por Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith (1956) con algunas modificaciones. Se usaron 300 µL de muestra jugo, extracto o muestra de fases superior e inferior y se mezclaron con 300 µL de solución de fenol al 5% y 1.5 mL de H₂SO₄. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante 25 min. Después se determinó la absorbancia a 490 nm con un espectrofotómetro Synergy™ HTX y se calculó el contenido de azúcares totales en miligramos equivalentes de glucosa por mililitro (mg/mL), con el apoyo de una curva estándar de glucosa preparada en el rango de 6.4 a 30 mg L⁻¹.

5.2.7 Análisis mediante FTIR

El jugo de *Ardisia compressa* y la fase superior obtenida de sistemas acuosos bifásicos, secados en horno de convección a 35 °C, se analizaron mediante espectrometría de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR, Cary 630, USA) en modo reflexión total atenuada (FTIR-ATR). El rango de frecuencia utilizado para cada muestra fue de 4000-650 cm⁻¹ a una resolución de 8 cm⁻¹ y aplicando 128 barridos. Se obtuvieron tres espectros de cada muestra a temperatura ambiente y se compararon con espectros FTIR-ATR obtenidos también para la acetona y agua utilizadas.

5.2.8 Análisis de datos

La organización experimental se realizó como un arreglo factorial 2x5x2 en un diseño completamente al azar. Los factores de variación fueron la línea de operación (A-B y C-D), la condición sobre la línea de operación (1, 2, 3, 4, 5) y las fases obtenidas (superior e inferior). En el análisis de relación de volúmenes y pH se consideró, además, el efecto del tipo de disolvente (agua y jugo). Los datos se sometieron a análisis de varianza y a rutinas de comparación de medias de tratamiento con el estadístico de Tukey, con nivel de significancia de 0.05. Todas las rutinas se hicieron por triplicado.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Material vegetal

Los frutos de *Ardisia compressa* tuvieron contenidos totales de antocianinas de 34.179 (±0.500) mg por gramo de pulpa fresca, respectivamente, que fueron menores a las reportadas por Joaquín-Cruz et al. (2015) (79.60 mg/g) en frutos colectados en San Andrés Tuxtla, Veracruz, México, lo que sugiere que la composición puede variar entre regiones. Estos autores identificaron la presencia de 12 antocianinas, entre las cuales malvidin-3-O-galactoside, delphinidin 3-O-galactoside y petunidin 3-O-galactoside se encontraron en mayor proporción. Entre los compuestos fenólicos no-antocianos que identificaron estuvieron catechin, epicatechin, epicatechin- 3,O-gallate, quercetin 3-O-rutinoside y

quercetin 3-O-glucoside. Por otro lado, se encontró contenido total de azúcares de 381.25 (± 48.75) mg/g que es muy superior al contenido de 9.6% de carbohidratos encontrado por Joaquín-Cruz et al. (2015). En adición, el jugo obtenido tuvo contenido total de antocianinas y azúcares de 0.41 (± 0.02) y 33.05 (± 3.30) mg/mL, respectivamente, lo que sugirió que el residuo sólido retuvo la mayor cantidad de antocianinas, en tanto que los azúcares se encontraron principalmente en el líquido.

5.3.2 Diagrama binodal de fases

El sistema formado con Na₃Cit, HCit y Acet presentó potencial para formar sistemas bifásicos. Mediante titulación turbidimétrica se encontraron estados binodales que separaron las condiciones de mezclas homogéneas de aquellas correspondientes a dos fases inmiscibles. (Figura 12A). Los datos binodales se ajustaron bien a las Ecuaciones (1) y (2), con valores R^2 iguales a 0.9998 (± 0.0001) y 0.9996 (± 0.0001), respectivamente y con constantes de regresión $k_1 = 74.2566$ (± 1.1959), $k_2 = -0.2772$ (± 0.0122), $k_3 = 0.000054$ (± 0.000006), $k_4 = 74.2879$ (± 1.4471), $k_5 = -0.3817$ (± 0.0237) y $k_6 = 0.000365$ (± 0.000023). La ordenada al origen de las Ecuaciones (1) y (2) linealizadas fue la misma ($k_1 \cong k_4$), debido a que en ambos ajustes la concentración de acetona fue la variable dependiente. En adición, entre el conjunto de datos binodales se identificó la condición A (2.7283, 1.4071, 47.0629 %) que correspondió al estado con menor concentración de Na₃Cit y HCit y mayor de acetona y, asimismo, la condición B (25.3078, 13.4302, 8.1366 %), que identificó el estado con mayor concentración de Na₃Cit y HCit y menor de acetona (Figura 12A).

Con las Ecuaciones (1) y (2) se determinaron los datos binodales ajustados en el rango de $z_A^{min} = 8.14$ % a $z_A^{max} = 47.06$ % y se graficaron para obtener una curva binodal ajustada. En adición, con los estados A y B se trazó una curva de operación principal (Figura 12B), que junto con la curva binodal ajustada delimitó la región donde era factible preparar sistemas acuosos bifásicos a partir de soluciones de Na₃Cit, HCit y acetona con concentración de 35, 40 y 95 %, respectivamente. Con base en las relaciones descritas por la Ecuación (3), la

línea principal tuvo pendiente de -1.7240 en la variación de la concentración de acetona respecto a la variación de citrato de sodio, en tanto que la pendiente fue de -3.2373 en la variación de acetona respecto al ácido cítrico, lo cual fue derivado del hecho de que la relación $\text{Na}_3\text{Cit}/\text{HCit}$ usada al inicio de la titulación turbidimétrica fue de 3/1. Por otro lado, para evaluar el efecto de la cercanía a la curva binodal, se trazó una línea de operación secundaria con las mismas pendientes, delimitada por los estados C (3.8500, 2.0500, 42.8626 %) y D (21.1000, 11.0500, 13.1236 %) y con menor longitud que la línea de operación principal.

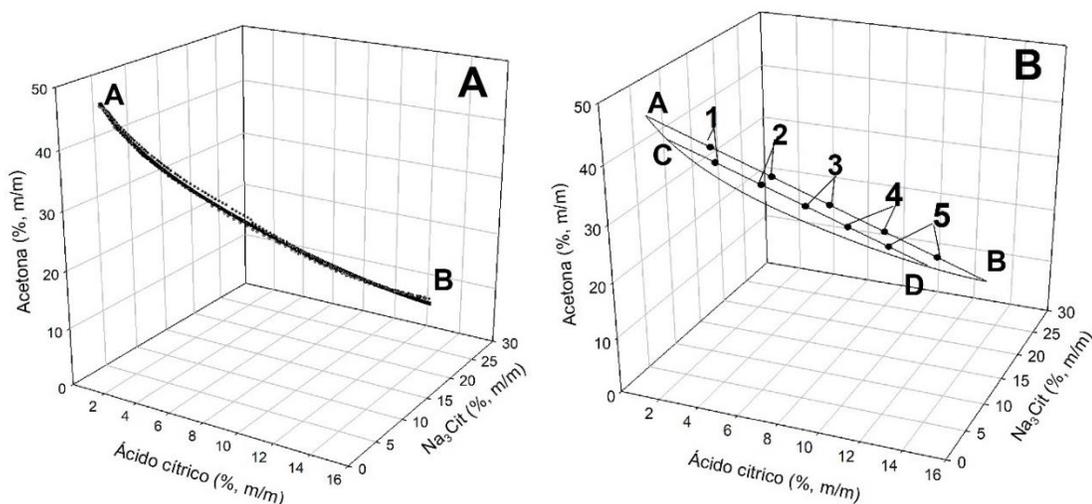


Fig. 12. Datos binodales experimentales y ajustados (A) y diagrama binodal de fases (B) de la mezcla formada por citrato trisódico (Na_3Cit), ácido cítrico y acetona. Los estados A, B, C y D, delimitan las líneas de operación y los puntos 1, 2, 3, 4 y 5 representan sistemas bifásicos evaluados.

5.3.3 Sistemas acuosos bifásicos

Sobre cada una de las líneas de operación, A-B y C-D, se identificaron cinco estados equidistantes (Figura 12B) con la composición descrita en el Cuadro 6 y se prepararon los sistemas acuosos bifásicos correspondientes. La relación entre el volumen de las fases formadas (V_r ; Ecuación 4) se afectó de manera significativa ($p \leq 0.05$) por la condición sobre la línea de operación, por la longitud de la línea de operación (A-B y C-D), por el disolvente usado y, en adición, hubo interacción significativa entre estos tres factores (Cuadro 7). El volumen de las fases varió con la transición de los estados rotulados con el número 1 a los

estados rotulados con el número 5 en ambas líneas de operación, de forma que la fase superior se redujo y la inferior aumentó. Con el aumento de la concentración de Na₃Cit y HCit y la disminución de acetona se produjo una reducción significativa ($p \leq 0.05$) de la relación de volúmenes (V_r ; Ecuación 7; Figura 13A), derivado de un aumento de la interacción de los componentes salinos y el agua y menor interacción de ésta con la acetona, lo que causó mayor retención del solvente en la fase inferior. En forma similar, la menor concentración de los componentes salinos en los estados de la línea de operación secundaria (C-D) causó mayores valores de V_r en éstos, en relación a los estados de la línea principal A-B ($p \leq 0.05$). Por otro lado, el uso de jugo de *A. compressa* como disolvente causó reducción muy significativa en la relación V_r ($p \leq 0.05$) y ello se debió a que la presencia de compuestos como los azúcares incrementó la interacción molecular con el disolvente y, por tanto, mayor retención de éste en la fase inferior (Figura 13A). Por otro lado, con la formación de fases, diversos compuestos son retenidos mayoritariamente en la fase superior, por lo que la reducción de ésta, a partir el incremento de la concentración de los componentes salinos, se ha usado para identificar condiciones de concentración de tales sustancias mediante una estrategia no-térmica basada en un fenómeno de exclusión salina (salting-out) (Rodríguez-Herrera, García-Cruz, & Valle-Guadarrama, 2023).

El pH de las distintas fases separadas se ubicó en el rango general de 4.55 a 5.32 (Figura 13B). Ambas fases de los sistemas, superior e inferior fueron afectadas por el disolvente usado (agua o jugo), por la ubicación de las líneas de operación y por la condición sobre éstas (Cuadro 7). Asimismo, la interacción entre los tres factores fue también significativa ($p \leq 0.05$). Las fases superiores exhibieron mayor pH que las inferiores ($p \leq 0.05$); sin embargo, la diferencia global promedio fue de sólo 0.185 en los sistemas que usaron agua como disolvente y de 0.215 en los basados en jugo de *A. compressa*.

Cuadro 6. Concentraciones en porcentaje (%) de citrato trisódico (Na₃Cit), ácido cítrico (HCit) y acetona, correspondientes a las condiciones del sistema acuoso en dos fases identificadas en el diagrama de fases binodal.

Condición	Línea de operación principal (A-B)			Línea de operación secundaria (C-D)		
	Na ₃ Cit	HCit	Acetona	Na ₃ Cit	HCit	Acetona
A	2.73	1.41	47.06	--	--	--
B	25.31	13.43	8.14	--	--	--
C	--	--	-	3.85	1.87	42.86
D	--	--	-	21.10	11.05	13.12
1	6.49	3.41	40.58	6.73	3.40	37.91
2	10.25	5.41	34.09	9.60	5.00	32.95
3	14.02	7.42	27.60	12.48	6.50	27.99
4	17.78	9.42	21.11	15.35	8.00	23.04
5	21.54	11.43	14.62	18.23	9.50	18.08

Está documentado que, después de la formación de fases, los componentes salinos son retenidos principalmente en la fase inferior, en tanto que los poliméricos (Du, Cheong, & Liu, 2018; Jiménez-Velázquez et al., 2020) u orgánicos (Odabaş & Koca, 2020) son retenidos en la superior. La naturaleza altamente hidrofílica del ácido cítrico (Ciriminna, Meneguzzo, Delisi, & Pagliaro, 2017) y su interacción con el Na₃Cit favorecen su migración mayoritaria hacia la fase inferior. Sin embargo, al haber disponibilidad de agua en la fase superior, una proporción de HCit se concentra en ella, permitiendo mantener el pH en valores cercanos a 5. El aumento de la solubilidad del HCit con el aumento de la concentración del Na₃Cit está relacionada con un efecto salting-in, el cual refiere que la solubilidad de una sustancia no electrolítica aumenta al incrementar la concentración de sal (Hyde et al., 2017).

La separación de antocianinas del fruto de *A. compressa* constituyó uno de principales propósitos de este trabajo. Las antocianinas son estables en el rango de 3.0 a 5.0 (Lee et al., 2005) y fuera de él experimentan degradación. El uso de jugo como disolvente causó menor pH en las fases separadas que el uso de agua como medio de solución ($p \leq 0.05$).

Cuadro 7. Análisis de varianza y comparación de medias de parámetros de separación en sistemas acuosos bifásicos.

FV	V_r	pH_t	pH_b	c_{Ant}^t	c_{Ant}^b	Y_{Ant}^t	c_{Sug}^t	c_{Sug}^b	Y_{Sug}^b
Agua	2.34 ^a	5.035 ^a	4.853 ^a	--	--	--	--	--	--
Jugo	1.81b	4.867b	4.648b	--	--	--	--	--	--
DSH	0.032	0.004	0.005	--	--	--	--	--	--
A-B	1.94b	5.000a	4.797 ^a	651.85Aa	80.87Bb	85.148a	12.82Ba	36.49Aa	70.789a
C-D	2.20 ^a	4.902b	4.704b	594.28Ab	123.04Ba	82.373b	13.62Ba	32.01Ab	62.467b
DSH	0.032	0.004	0.005	18.930	8.632	1.043	0.815	1.077	1.454
1	5.51 ^a	5.095 ^a	4.915 ^a	358.60Ae	64.45Bd	96.454a	14.93Ba	44.50Aa	38.151e
2	2.48b	4.987b	4.801b	429.65Ad	76.35Bcd	92.537b	12.71Bbc	35.34Ab	55.757d
3	1.22c	4.931c	4.726c	560.68Ac	87.89Bc	88.028c	12.49Bbc	31.72Ac	69.251c
4	0.59d	4.891d	4.673d	686.91Ab	117.73Bb	77.547d	11.96Bc	31.63Ac	81.740b
5	0.25e	4.853e	4.637e	1079.48Aa	163.36Ba	64.237e	14.02Bab	28.08Ad	88.239a
DSH	0.071	0.010	0.011	42.93	19.579	2.365	1.849	2.444	3.297
Di	<0.0001	<0.0001	<0.0001	--	--	--	--	--	--
LO	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0552	<0.0001	<0.0001
CLO	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0006	<0.0001	<0.0001
DixLO	0.0256	<0.0001	<0.0001	--	--	--	--	--	--
DixCLO	<0.0001	<0.0001	<0.0001	--	--	--	--	--	--
LOxCLO	<0.0001	0.0079	0.0005	<0.0001	0.0120	0.0025	0.0001	<0.0001	<0.0001
C.V.	2.987	0.171	0.205	3.989	11.115	1.634	8.095	4.129	2.864

FV: factor de variación; DSH: diferencia significativa honesta (Tukey, 0.05); V_r : relación de volúmenes; pH_t : pH de fase superior; pH_b : pH de fase inferior; c_{Ant}^t , c_{Ant}^b , c_{Sug}^t , c_{Sug}^b : concentraciones (mg/mL) de antocianinas totales (Ant) y azúcares totales (Sug) en fases superior (t) e inferior (b); Y_{Ant}^t , rendimiento de separación (%) de antocianinas en fase superior; Y_{Sug}^b : rendimiento de separación (%) de azúcares en fase inferior. Valores-p menores a 0.05 indican efecto significativo (prueba de Tukey). Letras minúsculas iguales indican diferencia no significativa (Tukey, 0.05) de medias al interior de una misma columna y bloque. Letras mayúsculas iguales indican diferencia no significativa entre fases (Tukey, 0.05), al interior de una misma hilera.

Al respecto, el agua desionizada utilizada tuvo pH de 5.7 (± 0.044), en tanto que el fruto de *A. compressa* se caracteriza por tener un pH tan bajo como 2.7 (Joaquín-Cruz et al., 2015) y la razón de que los sistemas no tuvieron un valor muy bajo en esta variable fue un equilibrio entre Na_3Cit y HCit . Al respecto, la presencia del ácido cítrico en el medio puede favorecer las condiciones para promover la acilación de los azúcares de las antocianinas con flavonoles, flavonas o ácidos fenólicos presentes en el jugo de *A. compressa*, tales como ácido glucónico, 4-cafeoilquínico y rosmarínico (Vázquez-Sánchez et al., 2019), provocando su estabilidad a pH cercano a 5. En adición, la acilación de las antocianinas mejora su estabilidad frente a los cambios de pH, a través de la copigmentación intramolecular e intermolecular, y las reacciones de auto-asociación (Giusti & Wrolstad, 2003). En este sentido, Zhang et al. (2017) demostraron que malvidina-3-glucosido puede dar lugar a interacciones de copigmentación intermolecular con algunos ácidos fenólicos. Por otro lado, la fase superior de los sistemas acuosos bifásicos correspondientes a la línea A-B preparados con agua como disolvente tuvieron pH entre 5.0 y 5.32, por lo que no fueron adecuados para apoyar la separación de antocianinas (Figura 13B). En situación similar estuvo la fase inferior del sistema rotulado con el número 1 de la línea A-B y la fase superior del sistema 1 de la línea C-D. El resto de los sistemas presentó pH adecuado para atender la separación de antocianinas.

El pH de todas las fases, tanto superiores como inferiores, experimentó disminución significativa ($p \leq 0.05$) a medida que disminuyó la concentración de acetona y aumentó la concentración de Na_3Cit y HCit , con la transición de los estados rotulados con el número 1 a los estados rotulados con el número 5 en el diagrama binodal (Figura 13B), lo cual fue originado por un incremento de la concentración de Na_3Cit y HCit . En adición, dado que las líneas de operación tuvieron pendiente negativa, cualquier perpendicular a ellas tuvo valor recíproco y positivo (Riddle, 1995), por lo que a menor distancia con la curva binodal se tuvo menor concentración de estas sustancias. Por ello, los sistemas basados en agua como disolvente de la línea A-B tuvieron mayor pH que los estados de la línea C-D. Sin embargo, este efecto no se observó en los sistemas basados en

jugo como disolvente, donde fue evidente que éste nulificó el efecto del cambio de concentración de Na_3Cit y HCit . El citrato de sodio es una sal que se ha probado con eficiencia en la separación de compuestos bioactivos y pigmentos mediante sistemas acuosos bifásicos (García-Cruz et al., 2021; Rodríguez-Salazar & Valle-Guadarrama, 2020) y su presencia residual en los extractos no impide que éstos puedan usarse en matrices alimenticias (Banipal, Kaur, Kaur, & Banipal, 2016). El citrato de sodio puede inducir un incremento de pH en el sistema (Hamzehzadeh & Zafarani-Moattar, 2015), lo que puede ser una desventaja si el objetivo es separar compuestos como antocianinas, que son inestables en pH alcalino (Lee et al., 2005). Sin embargo, aunque la concentración del Na_3Cit fue tres veces mayor que la de HCit en los sistemas del presente trabajo, el efecto del aumento de concentración de este último fue más notorio que el aumento de Na_3Cit y el pH tendió más bien a disminuir con el aumento de la concentración de estas sustancias.

5.3.4 Separación de compuestos bioactivos

La concentración total de antocianinas obtenidas de las distintas fracciones de los sistemas acuosos bifásicos varió entre 53 y 1175 mg/L (Figura 14). Este amplio rango fue resultado del efecto significativo de la fase formada, la localización de las líneas de operación y la variación de las condiciones sobre éstas, así como de la interacción significativa entre los distintos factores ($p \leq 0.05$; Cuadro 7). En todos los casos, el coeficiente de partición, definido como la razón de la concentración de un compuesto en la fase superior a su concentración en la fase inferior (Raja et al., 2011) varió entre 5.5 y 6.6, por lo que la fase superior fue elegida como extracto base para disponer de estos compuestos.

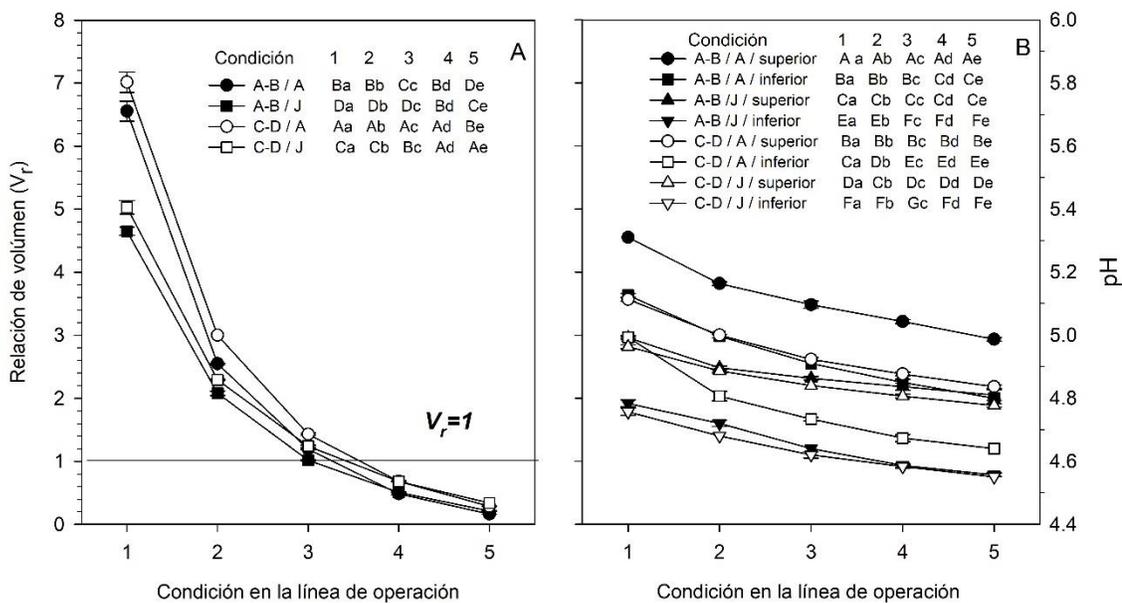


Fig. 13. A: variación de la relación de volúmenes (V_r) en función del disolvente usado y la longitud de la línea de operación. B: variación del pH en función del disolvente usado, la longitud de la línea de operación y la fase en el sistema. A-B: línea de operación principal; C-D: línea de operación secundaria; A: agua usada como disolvente; J: jugo usado como disolvente; superior: fase superior; inferior: fase inferior. Letras mayúsculas iguales indican diferencia no significativa entre estados similares sobre líneas de operación. Letras minúsculas iguales indican diferencia no significativa entre estados al interior de una línea de operación (Tukey, 0.05).

La formación de fases estuvo basada en un fenómeno donde el incremento de las interacciones de los componentes salinos con el agua indujo la exclusión de las moléculas de acetona, causando su hidrofobicidad y con ello la formación de dos fases separadas (Xie, Song, Fu, Yi, & Qiu, 2018). Con la misma fuerza impulsora de este efecto de salting-out, las antocianinas experimentaron un incremento de su hidrofobicidad y fueron desplazadas mayoritariamente hacia la fase acetónica. De acuerdo con Liu et al. (2014), las antocianinas pueden exhibir hidrofobicidad y ésta puede variar de un compuesto a otro en función de diferencias estructurales (malvidina-3-glucosido>petunidina-3-galactosido>delfinidina-3-galactosido). Así, las que tienen menos grupos hidroxilo libres y más grupos metoxi en el anillo B presentan mayor estabilidad. La antocianina mayoritaria en el jugo de *A. compressa* es malvidina-3-O-galactosido, cuyos sustituyentes en el anillo B son metoxilos, lo que supone su

relativa hidrofobicidad y explica su migración hacia la fase acetónica. Las demás antocianinas mayoritarias probablemente también migraron hacia la fase superior debido a que, de acuerdo con Phan et al. (2022), la acetona permite solubilizar tanto antocianinas como antocianidinas.

La migración de antocianinas hacia la fase acetónica ocurrió en grado menor en la línea C-D y mayor en la línea A-B (Cuadro 7), debido a la menor concentración de componentes salinos en C-D y por tanto menor efecto de salting-out en las condiciones de esa línea. En ambas líneas, la concentración de antocianinas de la fase superior aumentó con la transición del estado 1 al estado 5. Aunque los estados 1 y 2 tuvieron contenido similar, en los estados 4 y 5 (Figura 14A) se encontró mayor concentración en la línea A-B, lo que explicó la interacción significativa entre la ubicación de las líneas de operación y la condición sobre éstas (Cuadro 7). Así, la concentración promedio (mg/L) de antocianinas (Ant) en la fase superior fue, respectivamente, de 342.95, 415.27, 550.40, 755.66 y 1174.96 en los estados 1, 2, 3, 4 y 5 de la línea A-B, respectivamente, en tanto que se tuvo concentración promedio de 374.26, 444.02, 550.95, 618.15 y 983.99 en los mismos estados 1 a 5, respectivamente, de la línea secundaria (C-D) (Figura 14).

El rendimiento de separación expresa la cantidad porcentual de un compuesto que es retenida en una fase en particular (Ecuaciones 5 y 6). A este respecto, la tendencia de antocianinas a migrar hacia la fase superior causó que, en todos los casos, la mayor cantidad de estos compuestos fueran retenidos en esa fase (Figuras 14B y 14D). Asimismo, el rendimiento de separación de antocianinas en la fase superior fue mayor en la línea A-B que en la línea C-D, debido a un mayor efecto de salting-out en la primera en relación con la segunda, por el aumento de concentración de los componentes salinos. Por otro lado, el rendimiento de separación de la fase superior se redujo y el de la fase inferior aumentó con la transición de los estados 1 a los estados 5 (Figura 14B y 14D), es decir, con el aumento de los componentes salinos y reducción de acetona en los sistemas. A este respecto, el aumento de concentración de antocianinas en la fase superior

fue causada por dos factores. Por un lado, la reducción del volumen de la fase superior con la transición de los estados 1 a 5 causó aumento en la concentración de los compuestos. Por otro, en la medida que se incrementó la cantidad de disolvente y aumentó el volumen de la fase inferior, el efecto de salting-out se vio limitado, lo que propició mayor retención de estas sustancias en la fase inferior y, por tanto, reducción del rendimiento de separación en la fase superior. Con esta base, las mejores condiciones para obtener antocianinas se localizan sobre la línea A-B. En cuanto a, los estados 1, 2, 3, 4 y 5 de la línea A-B presentaron rendimiento de separación de antocianinas de 96.8, 93.0, 91.0, 80.3 y 64.6%, respectivamente, en las fases superiores. Por ello, el estado 3 se consideró una alternativa adecuada para disponer de los compuestos, por el hecho de que el rendimiento de separación se mantiene por arriba de 90%, aunque con concentración de antocianinas de 570.4 mg/L, que contrastó con la concentración de 1175.0 mg/L que puede obtenerse con el estado 5 de la línea A-B, pero con rendimiento efectivo de separación de 64.6% (Figuras 14B).

5.3.5 Separación de azúcares

La concentración de azúcares fue mayor en la fase inferior que en la fase superior ($p \leq 0.05$) en todos los casos (Figura 14C), lo que indicó que estos compuestos fueron retenidos principalmente en la fase inferior. Este era un resultado esperado, pues, por un lado, la presencia de azúcares causó reducción significativa de la relación de volúmenes (Cuadro 7), lo que implicó un aumento de la fase inferior, derivado del incremento de la interacción molecular de estos compuestos con el agua y por otro, la fase superior estuvo formada mayormente por acetona, disolvente en el cual los azúcares no presentan buena solubilidad (Chong, Stefanova, Zhang, & Brooks, 2020). Asimismo, se ha reportado que el uso de sistemas acuosos bifásicos constituye una estrategia viable para reducir el contenido de azúcares en un extracto. Al respecto, Sandate-Flores et al. (2020) y Jampani & Raghavarao (2015) mostraron que esta técnica tiene potencial de reducir o eliminar azúcares en extractos de antocianinas.

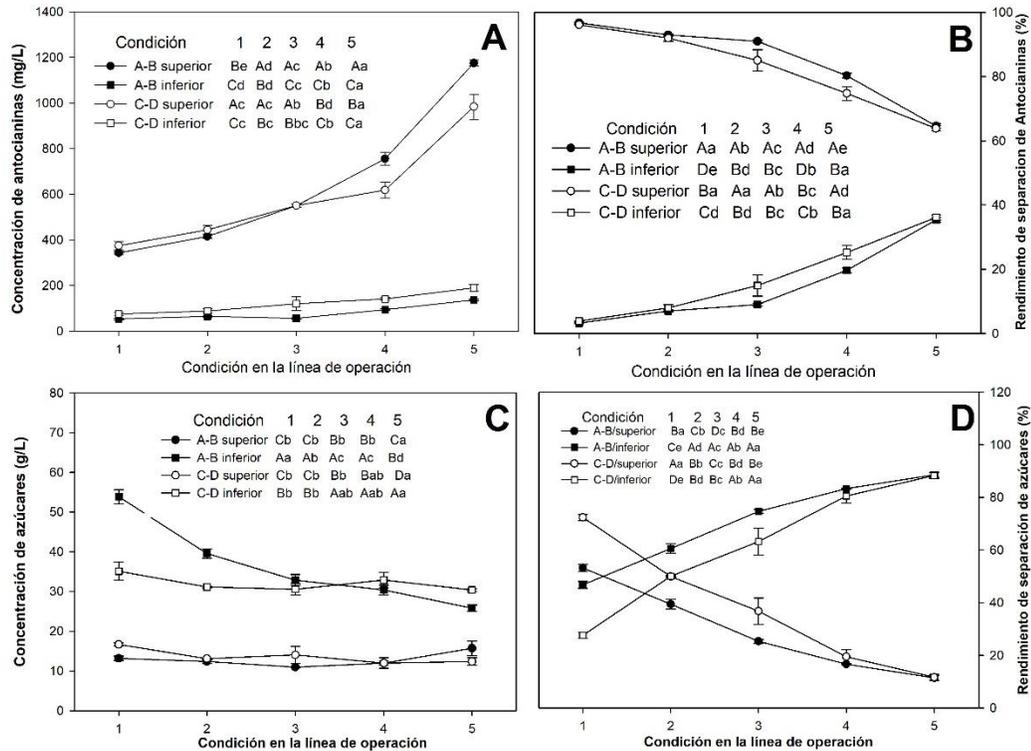


Fig. 14. Concentración y rendimientos de separación de antocianinas (A, B) y azúcares (C, D) en sistemas acuosos bifásicos preparados con citrato de sodio, ácido cítrico y acetona. A-B: línea de operación principal; C-D: línea de operación secundaria; top: fase superior; bottom: fase inferior. Letras mayúsculas iguales indican diferencia no significativa entre estados similares sobre líneas de operación. Letras minúsculas iguales indican diferencia no significativa entre estados al interior de una línea de operación (Tukey, 0.05).

En el caso de la fase superior no hubo diferencia significativa en el contenido de azúcares entre las líneas A-B y C-D, pero en la fase inferior se tuvo la mayor concentración en los estados de la línea A-B. De hecho, en ambas fases se tuvo interacción significativa ($p \leq 0.05$) entre la línea de operación y la condición evaluada sobre ésta (Cuadro 7). Al respecto, los estados 1 a 5 de ambas líneas de operación tuvieron aproximadamente la misma concentración de azúcares en las fases superiores y una situación similar se tuvo en los estados de la línea C-D (Figura 14C). Sin embargo, en el caso de las fases inferiores de la línea A-B se tuvo una reducción de la concentración de azúcares con el aumento de la concentración de Na_3Cit y HCit y reducción de acetona, lo cual fue debido al incremento de volumen de esa fase, de manera que la concentración fue, en

promedio, de 53.9, 39.6, 32.9, 30.4 y 25.8 g/L en los estados 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Por otro lado, el rendimiento de separación se redujo en las fases superiores y se incrementó en las fases inferiores de ambas líneas, de manera significativa ($p \leq 0.05$). El propósito del presente trabajo fue separar antocianinas de frutos de *Ardisia compressa* atendiendo la reducción del contenido de azúcares. Asimismo, se ha identificado a la fase superior como el extracto que permite obtener mayores cantidades de compuestos bioactivos y, en el caso de azúcares, los estados de la línea A-B permitieron menores rendimientos de separación de azúcares en esa fase superior, con valores de 53.2, 39.4, 25.3, 16.7, 11.4%, y concentraciones de 13.2, 12.4, 10.9, 11.9, 15.7 g/L en los estados 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Al respecto, se ha propuesto al estado 3 de la línea A-B como la condición adecuada para recuperar antocianinas y los datos relativos a azúcares mostraron que corresponde al estado que favorece la menor concentración de estos compuestos, aunque, nuevamente constituye una condición intermedia en lo que corresponde a rendimiento de separación.

5.3.5 Análisis por FTIR

La separación de antocianinas con reducción del contenido de azúcares se atendió con sistemas acuosos bifásicos basados en acetona, citrato de sodio y ácido cítrico. El uso en alimentos de extractos con cantidades residuales de Na₃Cit y HCit puede ser aceptado por los organismos reguladores correspondientes (Banipal et al., 2016). Sin embargo, la acetona debe eliminarse completamente, para lo cual se aplicó un procedimiento de evaporación de los extractos obtenidos de fases superiores de los sistemas. El análisis con FTIR de la acetona usada mostró los tres rasgos característicos de este compuesto (Figura 15), que consisten en la aparición de la banda de tensión del enlace carbonilo (C=O) a 1715 cm⁻¹, un sobretono de tensión del mismo enlace en el rango de 3500 a 3350 cm⁻¹ y una banda de tensión del enlace del carbono del grupo carbonilo con los carbonos vecinos a 1223 cm⁻¹ (Fernández, 2011). En el caso del agua, el análisis de FTIR mostró una banda muy amplia alrededor de

3280 cm^{-1} , que corresponde a estiramientos del enlace O-H y, asimismo, un pico a 1645 cm^{-1} , que corresponde al doblez en la estructura de enlaces H-O-H (Stuart, 2004).

Por otro lado, el espectro de infrarrojo del jugo mostró que éste exhibió también una amplia banda alrededor de 3280 cm^{-1} , derivado de la presencia de agua y, asimismo, una banda similar a la de la acetona a 1720 cm^{-1} . Sin embargo, en este caso, el jugo de *A. compressa* se caracteriza por ser ácido y presentar un pH tan bajo como 2.7 (Joaquín-Cruz et al., 2015), por lo que las bandas a 1720 y 1222 cm^{-1} pudieron corresponder a efectos de tensión de enlaces carbonilo de grupos carboxílicos exhibidos en la estructura de ácidos orgánicos presentes en el material evaluado (Bureau, Cozzolino, & Clark, 2019). Asimismo, Johnson, El Orche, & Naiker (2022) señalaron que las antocianinas encontradas en frutos de ciruela contribuyen a los espectros de infrarrojo en varias regiones, resaltando el rango de 2200 a 2000 cm^{-1} , por lo que la banda observada a 2120 cm^{-1} pudo deberse a estos compuestos. Por otro lado, de acuerdo con Joaquín-Cruz et al. (2015), los compuestos fenólicos no-antocianos de mayor concentración en el fruto de *A. compressa* son quercetina O-desoxihexósido, quercetina 3-O-rutinósido y quercetina 3-O-glucósido. Talarico, Consumi, Leone, Tamasi, & Magnani (2021) obtuvieron el espectro FTIR de la quercetina y encontraron que en el rango de 1014 a 1520 aparecen bandas correspondientes a enlaces aromáticos C=C, enlaces =C-OH, enlaces =C-OH de grupos fenólicos y estiramientos de enlaces C-O-C, además de estiramientos de grupos OH en 3402 y 3324 cm^{-1} . Además, Bureau et al. (2019) mostraron que, en jugos de naranja, picos a 1135, 1105, 1054, 998 y 926 cm^{-1} son característicos de estiramientos y flexiones en la estructura de azúcares, por lo que los picos encontrados en estos rangos de número de onda pueden deberse a la presencia de quercetina, a azúcares del jugo o a grupos glucósido. Por otro lado, el espectro FTIR de la fase superior obtenida de los sistemas acuosos bifásicos mostró características muy similares a las del jugo, pero no hubo evidencia contundente de la presencia de acetona en ese extracto, por lo que se consideró que la deshidratación permitió la eliminación del solvente.

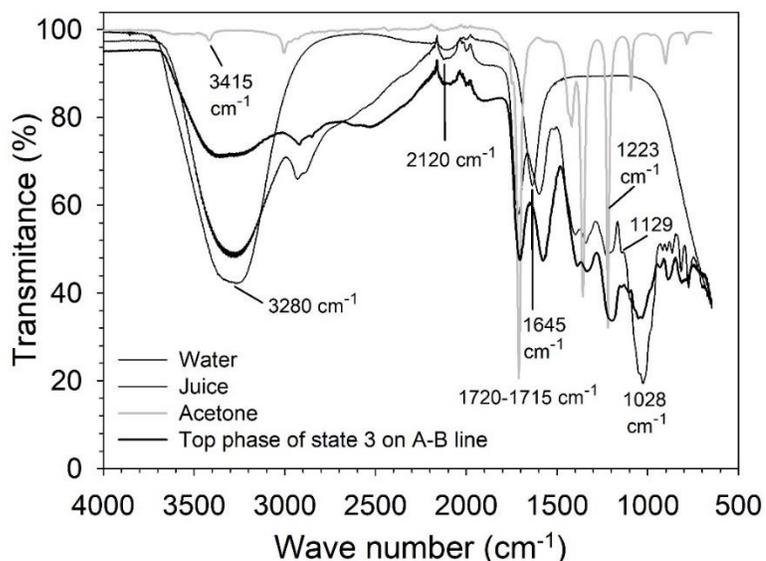


Fig. 15. Espectro de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR) correspondiente a acetona, agua, jugo de *A. compressa* y extracto obtenido de fase superior de los sistemas acuosos bifásicos.

5.3.6 Ensayos de pigmentación

Se eligió el estado 3 sobre la línea A-B para realizar ensayos de pigmentación. Así, se prepararon sistemas acuosos bifásicos con 14.02% de Na₃Cit, 7.42% de HCit, 27.60% de acetona y jugo de frutos como disolvente. A partir de la fase superior se obtuvo un extracto con 1,233.19 (±137.16) mg/L de antocianinas. El yogur usado como material de trabajo para ensayos de pigmentación tuvo color definido por luminosidad de 72.12% (±1.00), ángulo de tono de 101.83° (±0.21) y cromaticidad de 6.82 (±0.07). A partir de allí, la adición gradual del extracto causó pigmentación con comportamiento logarítmico con disminución de luminosidad y ángulo de tono con tendencia a valores mínimos y aumento de cromaticidad hasta un valor máximo (Fig. 16).

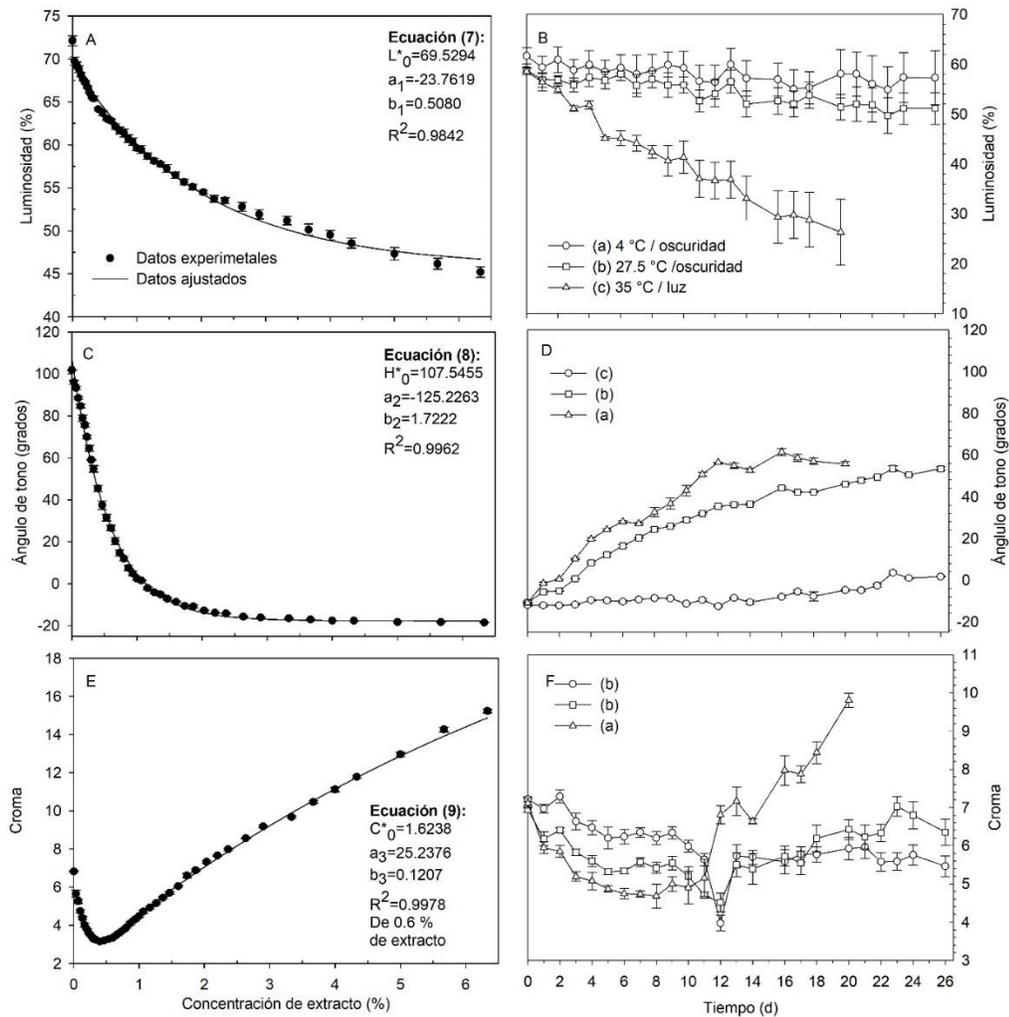


Fig. 16. Variación de la luminosidad (A, B), ángulo de tono (C, D) y cromaticidad (E, F) durante ensayos de pigmentación (izquierda) estabilidad de color durante almacenamientos en condiciones conservativas y deteriorativas (derecha). Las barras de error representan desviación estándar. Letras minúsculas iguales al interior de los recuadros de la derecha indican diferencia no significativa (Tukey. 0.05).

Los datos experimentales de pigmentación se ajustaron bien a las Ecuaciones (7) a (9), con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.98 (Fig. 16). Los datos de cromaticidad sugirieron que el uso de cantidades de extracto menores a 0.6% causaron pérdida de la pureza de color, pero con cantidades mayores a ese límite la pureza se incrementó. Con ello, a partir de las relaciones de la Ecuación (10), los valores límite de luminosidad, ángulo de tono y cromaticidad que podían alcanzarse con la adición infinita de extracto fueron 45.77%, -17.67°

(377.67°), y 26.86, respectivamente. El ángulo de tono varía de 0 o 360°, correspondiente al rojo, a 90° que define el amarillo, al verde con 180° y al azul, con 270°. La luminosidad tiene escala que varía de 0 a 100, entre negro y blanco, respectivamente, en tanto que la cromaticidad varía de cero con estado no saturado caracterizado por el gris, a valores de saturación cromática completa que tipifican cada color (McGuire, 1992). Así, la adición de extracto puede causar la transición de color desde valores de baja pureza cercanos al amarillo y muy claros hasta tonalidad roja de alta pureza y luminosidad intermedia. Por el comportamiento logarítmico, la obtención de estos atributos requiere cantidades muy grandes de extracto, por lo que se decidió usar pigmentación con base en ángulo de tono y con valor de 95% del límite que puede alcanzarse (H_{lim}^*). Así, con base en la Ecuación (11) se determinó que la concentración requerida de extracto para tener ese nivel de pigmentación fue 1.6%. Por otro lado, el yogur pigmentado con esta concentración y evaluado durante 26 d mostró que la estabilidad de color depende de que el producto se mantenga en condiciones no deteriorativas (Fig. 16), pues L^* , H^* , y C^* tuvieron cambios de 5.16%, 14.07° y 1.61 con manejo a 4 °C y oscuridad, en tanto que los cambios fueron de 8.19%, 63.10° y 0.22, respectivamente, con manejo a 27.5 °C y oscuridad, pero la modificación fue de 31.01%, 67.21° y 2.01, respectivamente con el uso de 35 °C y exposición a luz y, además, los cambios en esta última condición ocurrieron en sólo 19 d. A este respecto, si bien es necesario aceptar la correlación con el grado de deterioro del propio producto pigmentado, está documentado que el uso de antocianinas para aprovechar sus propiedades antioxidantes o pigmentantes requiere de la atención de diversos factores, que incluyen temperatura, luz y pH, entre otros (Enaru, Dreţcanu, Pop, Stănilă, & Diaconeasa, 2021). Si bien el presente trabajo atendió el control de pH desde la estrategia de obtención de las antocianinas, los resultados muestran que es necesario cuidar el uso del producto pigmentado en condiciones de baja temperatura y ausencia de luz.

5.4 Conclusiones

Se demostró la capacidad del sistema acuoso bifásico basado en citrato trisódico, ácido cítrico y acetona para estabilizar antocianinas obtenidas de frutos de *Ardisia compressa*. La adición del ácido cítrico permitió controlar el pH en rango adecuado para evitar la degradación de los pigmentos. Las antocianinas mostraron tendencia para migrar a la fase superior de los sistemas, en tanto que los azúcares fueron retenidos principalmente en la fase inferior, lo que permitió obtener extractos de antocianinas en la fase superior con contenido reducido de azúcares. Las antocianinas pueden servir como agentes de pigmentación si se manejan en baja temperatura y oscuridad. Se verificó la factibilidad de eliminar la acetona mediante una estrategia de desecación de los extractos, lo que permitió obtener un extracto libre de este solvente.

5.5 Literatura citada

- Baghlani, M., & Sadeghi, R. (2018). Thermodynamics investigation of phase behavior of deep eutectic solvents-polymer aqueous biphasic systems. *Polymer*, *143*, 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2018.04.003>
- Banipal, T. S., Kaur, H., Kaur, A., & Banipal, P. K. (2016). Effect of tartarate and citrate based food additives on the micellar properties of sodium dodecylsulfate for prospective use as food emulsifier. *Food Chemistry*, *190*, 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.130>
- Benucci, I., Río Segade, S., Cerreti, M., Giacosa, S., Paissoni, M. A., Liburdi, K., ... Rolle, L. (2017). Application of enzyme preparations for extraction of berry skin phenolics in withered winegrapes. *Food Chemistry*, *237*, 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.003>
- Brudzyńska, P., Sionkowska, A., & Grisel, M. (2021). Plant-derived colorants for food, cosmetic and textile industries: a review. *Materials*, *14*(13), 3484. <https://doi.org/10.3390/ma14133484>
- Bureau, S., Cozzolino, D., & Clark, C. J. (2019). Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A

- review. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.10.003>
- Cai, C., Wu, S., Wang, C., Yang, Y., Sun, D., Li, F., & Tan, Z. (2019). Deep eutectic solvents used as adjuvants for improving the salting-out extraction of ursolic acid from *Cynomorium songaricum* Rupr. in aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 209, 112–118.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.07.017>
- Caldas, T. W., Mazza, K. E. L., Teles, A. S. C., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., ... Tonon, R. V. (2018). Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 111, 86–91.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.012>
- Câmara, J. S., Locatelli, M., Pereira, J. A. M., Oliveira, H., Arlorio, M., Fernandes, I., ... Bordiga, M. (2022). Behind the scenes of anthocyanins—from the health benefits to potential applications in food, pharmaceutical and cosmetic fields. *Nutrients*, 14(23), 5133.
<https://doi.org/10.3390/nu14235133>
- Chandrasekhar, J., Sonika, G., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Differential partitioning of betacyanins and betaxanthins employing aqueous two phase extraction. *Journal of Food Engineering*, 144, 156–163.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.07.018>
- Chen, X., Guo, Y., Yang, T., Wan, J., & Cao, X. (2022). Separation of antibody IgG201 by an aqueous two-phase system with recyclable pH-responsive polymers. *Process Biochemistry*, 113, 125–133.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.017>
- Chong, K. Y., & Brooks, M. S.-L. (2021). Effects of recycling on the aqueous two-phase extraction of bioactives from haskap leaves. *Separation and Purification Technology*, 255, 117755.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117755>

- Chong, K. Y., Stefanova, R., Zhang, J., & Brooks, M. S.-L. (2020). Aqueous two-phase extraction of bioactive compounds from haskap leaves (*Lonicera caerulea*): Comparison of salt/ethanol and sugar/propanol systems. *Separation and Purification Technology*, 252, 117399. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117399>
- Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., & Pagliaro, M. (2017). Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y>
- Da Porto, C., & Natolino, A. (2018). Extraction kinetic modelling of total polyphenols and total anthocyanins from saffron floral bio-residues: Comparison of extraction methods. *Food Chemistry*, 258, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.059>
- Du, L.-P., Cheong, K.-L., & Liu, Y. (2018). Optimization of an aqueous two-phase extraction method for the selective separation of sulfated polysaccharides from a crude natural mixture. *Separation and Purification Technology*, 202, 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.03.071>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- Enaru, B., Dreţcanu, G., Pop, T. D., Stănilă, A., & Diaconeasa, Z. (2021). Anthocyanins: factors affecting their stability and degradation. *Antioxidants*, 10(12), 1967. <https://doi.org/10.3390/antiox10121967>
- Fernández, G. (2011). *Fundamentos de química orgánica*. Academiaminas.com.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Soto-Hernández, R. M., Guerra-Ramírez, D., Zuleta-Prada, H., Martínez-Damián, M. T., & Ramírez-Valencia, Y. D. (2021). Separation of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) betaxanthins, betacyanins, and soluble phenols through multistage aqueous two-phase systems. *Food and Bioprocess Technology*, 14(10), 1791–1804. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02676-1>

- Garcia-Mendoza, M. del P., Espinosa-Pardo, F. A., Baseggio, A. M., Barbero, G. F., Maróstica Junior, M. R., Rostagno, M. A., & Martínez, J. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (*Euterpe edulis* Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 119, 9–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.08.014>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)
- Hamzehzadeh, S., & Zafarani-Moattar, M. T. (2015). Phase separation in aqueous solutions of polypropylene glycol and sodium citrate: effects of temperature and pH. *Fluid Phase Equilibria*, 385, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2014.10.045>
- Hyde, A. M., Zultanski, S. L., Waldman, J. H., Zhong, Y.-L., Shevlin, M., & Peng, F. (2017). General principles and strategies for salting-Out informed by the Hofmeister series. *Organic Process Research & Development*, 21(9), 1355–1370. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00197>
- Jampani, C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Process integration for purification and concentration of red cabbage (*Brassica oleracea* L.) anthocyanins. *Separation and Purification Technology*, 141, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.11.024>
- Jampani, Chandrasekhar, & Raghavarao, K. S. M. S. (2015). Differential partitioning for purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* L. *Separation and Purification Technology*, 151, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.030>
- Jiménez-Velázquez, P., Valle-Guadarrama, S., Alia-Tejacal, I., Salinas-Moreno, Y., García-Cruz, L., Pérez-López, A., & Guerra-Ramírez, D. (2020). Separation of bioactive compounds from epicarp of 'Hass' avocado fruit through aqueous two-phase systems. *Food and Bioprocess Processing*, 123, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.004>

- Joaquín-Cruz, E., Dueñas, M., García-Cruz, L., Salinas-Moreno, Y., Santos-Buelga, C., & García-Salinas, C. (2015). Anthocyanin and phenolic characterization, chemical composition and antioxidant activity of chagalapoli (*Ardisia compressa* K.) fruit: A tropical source of natural pigments. *Food Research International*, 70, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.033>
- Johnson, J. B., El Orche, A., & Naiker, M. (2022). Prediction of anthocyanin content and variety in plum extracts using ATR-FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 121, 103406. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2022.103406>
- Le, P. H., Dao, D. N., Huynh, T. Q., Tran, T. T. T., & Nguyen, V. (2023). Extraction and purification of anthocyanins from *Peristrophe bivalvis* (L.) Merr. leaf (Acanthaceae) using aqueous two-phase systems. *Natural Product Research*, 37(1), 154–158. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1952203>
- Lee, J., Robert, W. D., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Li, Y.-T., Huang, T., Wang, J.-Z., Yan, C.-H., Gong, L.-C., Wu, F.-A., & Wang, J. (2023). Efficient acquisition of high-purity cyanidin-3-O-glucoside from mulberry fruits: An integrated process of ATPS whole-cell transformation and semi-preparative HPLC purification. *Food Chemistry*, 404, 134651. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134651>
- Lima, Á. S., Oliveira, B. S. de, Shabudin, S. V., Almeida, M., Freire, M. G., & Bica, K. (2021). Purification of anthocyanins from grape pomace by centrifugal partition chromatography. *Journal of Molecular Liquids*, 326, 115324. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115324>
- Liu, Y., Zhang, D., Wu, Y., Wang, D., Wei, Y., Wu, J., & Ji, B. (2014). Stability and absorption of anthocyanins from blueberries subjected to a simulated

- digestion process. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(4), 440–448. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.869798>
- Malabadi, R. B., Kolkar, K. P., & Chalannavar, R. K. (2022). Plant natural pigment colorants-health benefits: toxicity of synthetic or artificial food colorants. *International Journal of Innovation Scientific Research and Review*, 4(10), 3418–3429.
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, 27(12), 1254–1255. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.12.1254>
- Merchuk, J. C., Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1998). Aqueous two-phase systems for protein separation Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B*, 711, 285–293. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00594-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00594-X)
- Odabaş, H. İ., & Koca, I. (2020). Process for production of microencapsulated anthocyanin pigments from *Rosa pimpinellifolia* L. fruits: optimization of aqueous two-phase extraction, microencapsulation by spray and freeze-drying, and storage stability evaluation. *International Journal of Food Engineering*, 16(9). <https://doi.org/10.1515/ijfe-2020-0057>
- Phan, K., Den Broeck, E. Van, Raes, K., De Clerck, K., Speybroeck, V. Van, & De Meester, S. (2022). A comparative theoretical study on the solvent dependency of anthocyanin extraction profiles. *Journal of Molecular Liquids*, 351, 118606. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118606>
- POWO. (2023). *Plants of the World Online*. Royal Botanic Gardens, Kew. Retrieved from <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. *Science and Technology*, 1(1), 7–16. <https://doi.org/10.5923/j.scit.20110101.02>
- Riddle, D. F. (1995). *Analytic geometry*. Boston, MA, USA: Cengage Learning Inc.
- Rodríguez-Herrera, V. V., García-Cruz, L., & Valle-Guadarrama, S. (2023).

- Aqueous two-phase extraction: A non-thermal technique to separate and concentrate betalains from *Bougainvillea glabra* Choisy bracts. *Industrial Crops and Products*, 193, 116245. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116245>
- Rodríguez-Salazar, N., & Valle-Guadarrama, S. (2020). Separation of phenolic compounds from roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces with aqueous two-phase extraction based on sodium citrate and polyethylene glycol or acetone. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 55(13), 2313–2324. <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1634730>
- Romero-Díez, R., Matos, M., Rodrigues, L., Bronze, M. R., Rodríguez-Rojo, S., Cocero, M. J., & Matias, A. A. (2019). Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. *Food Chemistry*, 272, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.016>
- Sandate-Flores, L., Rodríguez-Rodríguez, J., Velázquez, G., Mayolo-Deloisa, K., Rito-Palomares, M., Torres, J. A., & Parra-Saldívar, R. (2020). Low-sugar content betaxanthins extracts from yellow pitaya (*Stenocereus prinosus*). *Food and Bioprocess Technology*, 121, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.02.006>
- Sinopoli, A., Calogero, G., & Bartolotta, A. (2019). Computational aspects of anthocyanidins and anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 297, 124898. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.172>
- Siti Azima, A. M., Noriham, A., & Manshoor, N. (2017). Phenolics, antioxidants and color properties of aqueous pigmented plant extracts: *Ardisia colorata* var. *elliptica*, *Clitoria ternatea*, *Garcinia mangostana* and *Syzygium cumini*. *Journal of Functional Foods*, 38, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.018>
- SPSS, I. (2000). *Sigma Plot 2000 User's Guide*. Chicago, USA: SPSS Inc.
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*.

England: John Wiley & Sons Ltd.

- Talarico, L., Consumi, M., Leone, G., Tamasi, G., & Magnani, A. (2021). Solid lipid nanoparticles produced via a coacervation method as promising carriers for controlled release of quercetin. *Molecules*, 26(9), 2694. <https://doi.org/10.3390/molecules26092694>
- Tena, N., & Asuero, A. G. (2022). Up-to-date analysis of the extraction methods for anthocyanins: principles of the techniques, optimization, technical progress, and industrial application. *Antioxidants*, 11(2), 286. <https://doi.org/10.3390/antiox11020286>
- Tian-Liang, Xi-Gu-Ri-Gan, Yu, J., Qu, S., Xie, Q., Shama, R., ... Borjigidai, A. (2023). *Ardisia gigantifolia* stapf (Primulaceae): A review of ethnobotany, phytochemistry, pharmacology, clinical application, and toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 305, 116079. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.116079>
- Vázquez-Sánchez, A. Y., Aguilar-Zárate, P., Muñoz-Márquez, D. B., Wong-Paz, J. E., Rojas, R., Ascacio-Valdés, J. A., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2019). Effect of ultrasound treatment on the extraction of antioxidants from *Ardisia compressa* Kunth fruits and identification of phytochemicals by HPLC-ESI-MS. *Heliyon*, 5(12), e03058. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03058>
- Vidana Gamage, G. C., Lim, Y. Y., & Choo, W. S. (2021). Black Goji Berry Anthocyanins: Extraction, Stability, Health Benefits, and Applications. *ACS Food Science & Technology*, 1(8), 1360–1370. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00203>
- Xie, S., Song, W., Fu, C., Yi, C., & Qiu, X. (2018). Separation of acetone: From a water miscible system to an efficient aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 192, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.09.056>
- Zhang, B., Yang, X.-S., Li, N.-N., Zhu, X., Sheng, W.-J., He, F., ... Han, S.-Y. (2017). Colorimetric study of malvidin-3- O -glucoside copigmented by

phenolic compounds: The effect of molar ratio, temperature, pH, and ethanol content on color expression of red wine model solutions. *Food Research International*, 102, 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.034>

Zhang, X., Zhao, Y., Li, B., Guo, M., Lv, J., & Wei, Y. (2022). Comparison of three extraction methods for anthocyanins from perilla frutescens leaves. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 29, 100817. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100817>

Zhu, J., Kou, X., Wu, C., Fan, G., Li, T., Dou, J., & Shen, D. (2022). Enhanced extraction of bioactive natural products using ultrasound-assisted aqueous two-phase system: Application to flavonoids extraction from jujube peels. *Food Chemistry*, 395, 133530. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133530>

6. CONCLUSIONES GENERALES

En la primera fase de investigación se obtuvo una bebida fermentada a partir de frutos de *Ardisia compressa* Kunt. El proceso fue factible tanto con *Saccharomyces cerevisiae* (SC) como con levadura nativa (LN). El proceso con LN exhibió mayor producción de alcohol y mayor consumo de azúcar que con SC. El contenido de fenoles solubles totales fue similar; sin embargo, el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante fueron mayores con LN. Asimismo, hubo mayor cambio de antocianinas con LN, lo que afectó el color del producto y la capacidad antioxidante. El uso de modelos permitió explicar la variación de la concentración de levadura, un incremento de fenoles solubles y un agotamiento de antocianinas. La levadura nativa fue una mejor opción para preparar una bebida fermentada a partir de frutos de *A. compressa* Kunt.

En la segunda fase de la investigación se demostró la capacidad del sistema acuoso bifásico basado en citrato trisódico, ácido cítrico y acetona para estabilizar antocianinas obtenidas de frutos de *Ardisia compressa* Kunt. La adición del ácido cítrico permitió controlar el pH en el rango adecuado para evitar la degradación de los pigmentos. Las antocianinas mostraron tendencia para migrar a la fase superior de los sistemas, en tanto que los azúcares fueron retenidos principalmente en la fase inferior, lo que permitió obtener extractos de antocianinas en la fase superior con contenido reducido de azúcares. Las antocianinas pueden servir como agentes de pigmentación si se manejan en baja temperatura y oscuridad. Se verificó la factibilidad de eliminar la acetona mediante una estrategia de desecación de los extractos, lo que permitió obtener un extracto libre de este solvente.

Los resultados indicaron que es posible obtener una bebida fermentada a partir de los frutos de *Ardisia compressa* Kunt así como recuperar pigmentos aplicando

métodos de separación como la extracción acuosa en dos fases. La producción de la bebida fermentada es viable y una alternativa de procesamiento de los frutos para los productores de Xicotepec, ya que actualmente el procesamiento del fruto es enfocado principalmente a la elaboración de licor implicando costos relacionados con los insumos (etanol y azúcar) y con el procesamiento de los frutos. Sin embargo, para desarrollar el producto primero es necesario realizar una caracterización de las levaduras responsables del proceso de fermentación, ya que la levadura nativa fue la que proporcionó mejores características al producto fermentado. Por tal motivo, es necesario determinar el tipo de levaduras presentes en el fruto para estudiar la relación entre los microorganismos y su influencia en los atributos de la bebida. Al respecto, es conveniente realizar pruebas de toxicidad y sensoriales para caracterizar la bebida y establecer el diagrama y condiciones de proceso que permitan ofrecer un producto de calidad óptima.

Los niveles de antioxidantes obtenidos, después de la fermentación, fueron adecuados y mayores a los cuantificados en productos comerciales, pero como se observó degradación de color, en futuros trabajos es necesario atender la posible adición de antocianinas, obtenidas mediante sistemas acuosos bifásicos, después de la fermentación alcohólica para mejorar el color y las propiedades del producto final. También es necesario realizar estudios de HPLC para determinar la estructura y pureza de las antocianinas obtenidas en la fase superior (orgánica) del sistema.