



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS
TERMOESTABLES DEL CAMOTE MORADO
(*Ipomoea batata* (L.) Lam) Y SU APLICACIÓN
COMO BIOCOLORANTE EN ALIMENTOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ANDREA TORRES ALCALÁ



MEXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. ARTURO NAVARRO OCAÑA

Vocal: Prof. JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PEREZ

Secretario: Prof. JOSE GUILLERMO DE JESUS AGUILAR OSORIO

1er Suplente: Prof. INES MIRANDA MARTINEZ

2do Suplente: Prof. JORGE ARTURO ABURTO ANELL

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Alimentos y Biotecnología

Facultad de Química, U.N.A.M., Conjunto E, Laboratorio 321.

Asesor del tema:

Dr. Arturo Navarro Ocaña.

Sustentante:

Andrea Torres Alcalá.

Contenido

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Camote	6
3.1.1 Origen del camote.....	7
3.1.2 Cultivo de camote	7
3.1.3 Composición nutrimental	8
3.1.3.1 Otros compuestos.....	9
3.1.4 Enzimas involucradas (PFO) en el camote.....	14
3.2 Colorantes.....	16
3.3 Antocianinas.....	19
3.3.1 Estructura de las antocianinas.....	20
3.3.2 Estabilidad	21
3.3.2.1 pH	21
3.3.2.2 Temperatura	22
3.3.2.3 Oxígeno	22
3.3.2.4 Efecto de las enzimas	22
3.3.2.5 Acilación.....	23
3.4 Métodos de extracción	25
3.4.1 Alta presión hidrostática.....	25
3.4.2 Campos eléctricos pulsados	26
3.4.3 Microondas	26
3.4.4 Ultrasonidos.....	27
3.4.5 Extracción asistida por enzimas	27
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos particulares.....	29

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	30
6.1 Material y equipo.....	31
6.2 Desarrollo experimental por etapas	32
6.2.1 Etapa 1. Preparación de la muestra	32
6.2.2 Etapa 2. Variables de extracción	36
6.2.3 Etapa 3. Identificación parcial de las antocianinas	39
6.2.4 Etapa 4. Aplicación del biocolorante a alimentos.....	41
6.3 Métodos de análisis.....	44
6.3.1 La actividad de la enzima (polifenoloxidasa)	44
6.3.2 Determinación de antocianinas totales	46
6.3.3 Identificación parcial de antocianinas por HPLC.....	47
6.3.4 Análisis estadístico empleado.....	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1 Etapa 1. Tratamientos de la muestra	48
7.2 Etapa 2. Variables de extracción.....	56
Tipo de ácido	56
Efecto del disolvente y proporción de disolvente	60
Efecto de la temperatura.....	67
Enzimas	69
7.3 Etapa 3. Identificación parcial de las antocianinas.....	72
7.4 Etapa 4. Aplicación a alimentos	76
Caramelo	77
Manteca de cacao	79
Malvavisco	80
8. CONCLUSIONES	82
9. REFERENCIAS	84

1. RESUMEN

Debido a la creciente demanda de los biocolorantes en la industria alimentaria para sustituir a los colorantes artificiales es importante realizar estudios que permitan desarrollar procesos de obtención de colorantes naturales que sean competitivos con sus análogos artificiales.

El camote (*Ipomoea batata* (L.) Lam) en su variedad morada es una fuente natural que se puede aprovechar para la extracción de antocianinas. En el camote morado dichos compuestos se encuentran distribuidos tanto en la cascara como en toda la pulpa.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un proceso de extracción para obtener a escala preparativa extractos enriquecidos y estandarizados de antocianinas del camote morado para usarlo como biocolorante de alimentos.

El camote morado contiene dentro de su estructura polifenoloxidasas, estas enzimas están involucradas en la degradación de las antocianinas produciendo un color marrón. Con el fin de evitar las pérdidas de antocianinas en el proceso de extracción por las reacciones de pardeamiento enzimático, se probaron tres tratamientos de inactivación; ácido, térmico y secado por liofilización.

Ya que se definió que el mejor tratamiento de la muestra fue el secado por liofilización, se estudió el efecto sobre los rendimientos de extracción de las 6 variables que a continuación se presentan:

- Ácido
- Disolvente
- Concentración de disolventes
- Temperatura
- Tiempo

En todos los casos se utilizó el ultrasonido como auxiliar de la extracción. Para cada experimento se determinaron las antocianinas totales con el método de pH-diferencial, y se realizó una comparación entre cada una de las variables con un

análisis de varianza (ANOVA). Se seleccionó al ácido málico, con una relación de disolvente 40-60 agua- acetona, a 60°C y 20 minutos de sonicación.

Una vez que se realizó la extracción de antocianinas, se observó que el residuo sólido aún presentaba una cierta coloración, a este material se le realizó una extracción asistida por amilasas en concentraciones de 1 y 5% p/p.

Posteriormente se identificó parcialmente (por tiempos de retención) el perfil de antocianinas del camote morado usando la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) corroborándose que se trataba de antocianinas aciladas (termoestables).

Por último, ya que se obtuvieron las mejores condiciones extracción de antocianinas de camote, se usaron estas para obtener un lote de colorante a escala preparativa (g) y este extracto estandarizado se usó como colorante para caramelo, manteca de cacao, malvavisco.

2. INTRODUCCIÓN

El camote o boniato constituyó el segundo cultivo en importancia para muchos pueblos de la América, antes de la llegada de los españoles, y aún hoy es un cultivo esencial para el sustento de muchas comunidades.

Esta planta y sus raíces, llamaron la atención de los colonizadores, Colon el 4 de noviembre de 1492 anotó:

...Estas tierras son muy fértiles; ellos las tienen llenas de ñames como zanahorias que tienen sabor a castañas...

El término ñame o name, lo conoció Colón en África y lo utilizó en este caso con idea genérica, más tarde Las Casas (1619) aclara, que el almirante, se refería a los camotes.



Figura 1. Variedades de color en el camote.

Hay algunas variedades de esta planta distintas sólo por el color de la raíz, (pues tienen todas tallos volubles, hojas angulosas y redondas y flores con figura de cálices blanca con púrpura), que a veces es roja por fuera y blanca por dentro, y se llama acamotli; otras veces la membrana exterior es de color púrpura y la parte interior es blanca, y se llama ihacamotli; cuando el exterior es blanco y el interior es amarillo con rojizo, se le llama xochicamotli; hay veces que tanto el interior como el exterior son morados o completamente blancos, y se le llama entonces camapalcamotli o poxcauhcamotli, nombres impuestos desde hace muchos siglos según la variedad de color. (Gispert y Álvarez, 1998).

El camapalcamotli de exterior y pulpa morada (camote morado) es una fuente natural rica de antocianinas que puede ser utilizada como biocolorante en alimentos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Camote

El Camote es una planta perenne, cultivada anualmente. A diferencia de la papa que es un tubérculo, o esqueje engrosado, el camote es una raíz reservante (http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/CAMOTE.HTM último acceso: 20-01-2013), ya que el lugar donde tienen acumuladas las reservas de nutrientes son diferentes.

Los nombres más comunes para esta planta en Latinoamérica son: camote, boniato, batata, douce, apichu y kumara.

La clasificación sistemática del camote es la siguiente:

Familia : ***Convolvulaceae***
Género : ***Ipomoeae***
Subgénero : ***Quamoclit***
Sección : ***Batatas***
Especie : ***Ipomoea batatas (L.) Lam.***

Esta especie fue descrita por Linneo en 1753 como *Convolvulus batatas*. Sin embargo, fue hasta 1791 que Lamarck clasificó esta especie dentro del género *Ipomoea* en base a la forma del estigma y a la superficie de los granos de polen. Por lo tanto el nombre fue cambiado a *Ipomoea batatas (L.) Lam.* (Huamán, 1992).

El camote es uno de los cultivos tradicionales más antiguos y valiosos, sembrado ampliamente en los países en vías de desarrollo. Destaca por su rusticidad y su alta productividad por unidad de área y de tiempo; además de ser un cultivo rico en vitaminas y minerales. (González, *et al.*, 2005). Entre las variedades más comunes del camote se encuentran: el camote Morado, Chileno, Viudo, Rosado, Pata de gallo, Costeño, Alforjero amarillo, Zapallo, Lancetillo.

3.1.1 Origen del camote

Existen dos teorías sobre el origen del camote; en una de ellas se le considera nativo del continente Americano, situándolo en México y Centroamérica, en virtud de la división del material genético y por la evidencia arqueológica de la antigüedad de su cultivo. La otra teoría sostiene que su origen se encuentra en el continente Asiático, en particular en China.

En la actualidad, la primera teoría tiene mayor aceptación tomando en cuenta que existe mayor cantidad de especies que en el continente Asiático, con alto potencial de rendimiento y con mayor desarrollo vegetativo, favoreciendo la floración y la fructificación (González, *et al.*, 2005).

En México los nahuas englobaron a esta especie en la categoría de camohtli (raíz comestible). Sahagún menciona: “[...] que son las ‘vatatas de esta tierra’, que son raíces buenas de comer, que se hacen como nabos debajo de la tierra y que se comen cocidas, crudas y asadas”. (Linares, *et al.*, 2008).

3.1.2 Cultivo de camote



Figura 2. Camote recién cosechado.

El camote es uno de los cultivos ampliamente sembrado en los países en vías de desarrollo, a nivel agronómico ofrece muchas ventajas tales como: resistencia a las condiciones adversas del campo, requiere poca atención y labores agronómicas durante su crecimiento, altos rendimientos por hectárea y una buena adaptabilidad; lo que implica un

bajo costo de producción comparado con otros cultivos considerándolo un cultivo alternativo para los agricultores de escasos recursos económicos. (Quispe, *et al.*, 2006).

El camote es el sexto cultivo alimentario más importante del mundo, luego del arroz, el trigo, la papa, el maíz y la yuca; pero en los países en desarrollo es el quinto más importante. Cada año se producen más de 105 millones de toneladas métricas en el mundo, 95% de las cuales crecen en los países en desarrollo.

Aunque es nativo de América Latina, Asia es hoy la principal región productora de camote del mundo, con cifras por encima de los 90 millones de toneladas producidas al año. China, con 85 millones de toneladas, es el principal productor en el mundo. (CIP (Centro Internacional de la papa), 2010).

En México, se siembran variedades con pulpa blanca, amarilla, naranja, rojiza o púrpura en dos ciclos agrícolas: el de primavera-verano y el de otoño-invierno.

Con datos de la Secretaría de Agricultura, ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa), se sabe que se planta prácticamente en todos los estados de la República con una producción aproximada de 61,098 toneladas en 2908 hectáreas, siendo los más productivos Guanajuato (27,328 toneladas) y Michoacán (10,756 toneladas).

En la región central de México se prefieren las variedades blancas, pero también se consumen las moradas y amarillas. Las blancas y moradas se encuentran comúnmente en los mercados y tianguis, y en el caso de las moradas sólo en cierta temporada llegan a los supermercados, a diferencia de las variedades amarillas y blancas que se comercializan a mayor escala y por lo general están a la venta todo el año.(Linares, *et al.*, 2008).

3.1.3 Composición nutrimental

El camote es un alimento de alta energía, sus raíces tienen un contenido de carbohidratos totales de 25 a 30%, de los cuales el 98% es considerado fácilmente digestible. Es una fuente excelente de carotenoides de provitamina A. Recientes estudios del papel de la vitamina A y la fibra sobre la salud humana puede realzar aún más la imagen del camote. También es una fuente de vitamina C, potasio,

hierro y calcio. El contenido de aminoácidos es bien balanceado, con un mayor porcentaje de lisina que el arroz o el trigo, pero un contenido limitado de leucina.

(http:

//www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/CAMOTE.HTM, último acceso 04-11-2012).

Tabla 1. Datos de la composición nutricional se deben interpretar por 100 g de la porción comestible.

COMPUESTO	CANTIDAD
Calorías	105 Kcal
Agua	72.84 g
Proteína	1.65 g
Grasa	0.30 g
Cenizas	0.95 g
Carbohidratos	24.28 g
Azúcares	10.95g
Almidones	13.33g
Fibra	3 g
Calcio	22 mg
Hierro	0.59 mg
Fósforo	28 mg
Potasio	337 mg
Vitamina C	22.7 mg
Vitamina A	14.545 IU

Fuente: http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.ply, Linares, *et al.*, 2008.

3.1.3.1 Otros compuestos

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos del camote incluyen ácidos clorogénicos, una familia de ésteres formados a partir de ciertos ácidos cinámico y quínico, incluyendo 3 isómeros ácido mono-cafeoil quínico (CQA): 3-CQA (ácido neoclorogénico), 4-CQA (ácido criptoclorogénico) y 5-CQA (ácido clorogénico) y 3 ácidos di-cafeoil quínico: 3,5-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA (ácido isoclorogénico A, B y C respectivamente). Las cantidades de estos compuestos varían según la variedad del camote. Aunque los ácidos clorogénicos e isoclorogénicos parecen ser más

abundantes. El camote contiene significativamente más ácidos isoclorogénicos que otros alimentos.

El color y variedad puede influir en los niveles y perfiles de los compuestos fenólicos así como de antocianinas y carotenoides.

Se ha reportado que el camote de pulpa blanca contiene el nivel más alto de ácidos clorogénicos, mientras que la variedad de pulpa morada tiene los niveles más altos de las di-CQA. (Levin, *et al.*, 2011).



Figura 3. Diferentes colores del camote

Se ha demostrado que dichos polifenoles exhiben actividad captadora de radicales (RSA), actividad antimutagénica, actividad anticancerígena, antidiabética, antibacteriano, anti-inflamatoria, y anti-VIH y actividad para inhibir la producción de melanina tanto *in vitro* como *in vivo*. (Ishiguro, *et al.*, 2007).

Los compuestos polifenólicos también juegan un papel importante en los sistemas de defensa contra insectos, otros patógenos y en el proceso de maduración del camote.

Carotenoides

Los carotenoides se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y su estructura poliénica les permite capturar o inactivar radicales libres y oxígeno singulete. El β -caroteno es la principal fuente de pro vitamina A en la naturaleza y es el responsable de la coloración naranja-amarilla en el camote (el camote amarillo contiene de 53-86 $\mu\text{g/g}$ b.s. de β - caroteno (Lugo, *et al.*, 2001)).

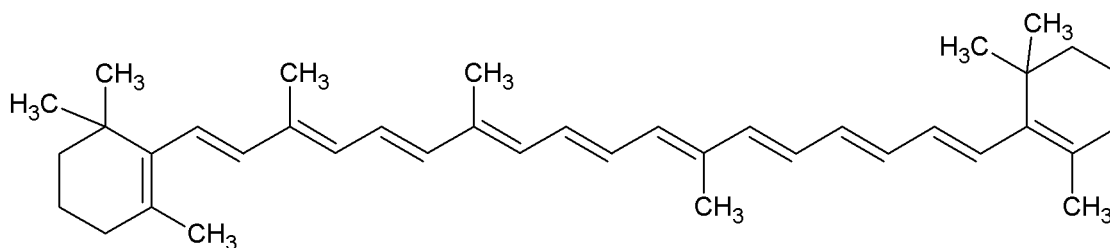


Figura 4. Estructura del β - caroteno.

Los carotenoides son tetraterpenos que funcionan como antioxidantes. Los carotenoides están presentes en vegetales amarillos y rojos, los más conocidos son el β - caroteno, α -caroteno, luteína, zeaxantina y licopeno. El consumo excesivo de β - caroteno ocasiona elevación reversible en los niveles sanguíneos (carotenemia) pero no genera toxicidad por vitamina A debido a que es un precursor de baja capacidad de esta vitamina. Al igual que el escualeno, los carotenoides protegen la piel contra la radiación ultravioleta. Las propiedades antioxidantes de los carotenoides han sido relacionadas en la prevención contra la peroxidación de lípidos y ácidos nucleicos, aterogénesis y cáncer. (Drago, *et al.*, 2006).

Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos flavonoides, responsables del color rojo y morado de la piel y pulpa de los camotes; son de gran interés por su importancia en la ingesta diaria recomendada (180 a 215 mg*día*habitante) en relación a la de otros flavonoides (23 mg*día*habitante) (Arizio, 2008).

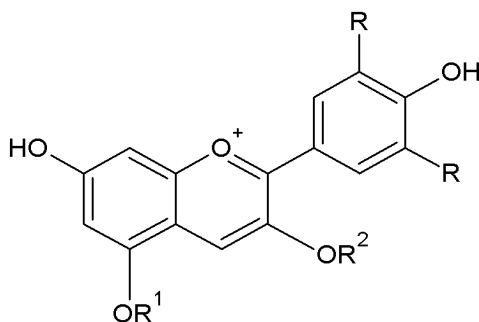


Figura 5. Estructura general de las antocianinas.

El número de antocianinas del camote morado, se encuentra en el mismo rango que algunas fuentes de frutas y verduras de la más alta producción de antocianinas como arándanos, uvas, y moras. Tabla 2. (Bridgers, *et al.*, 2010).

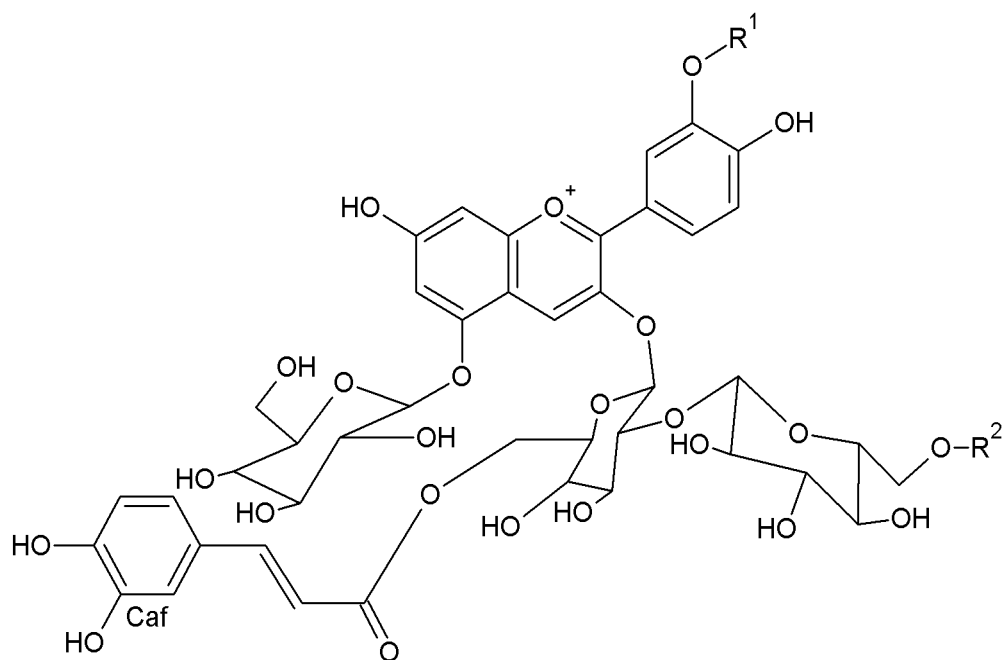
Tabla 2. Contenido de antocianinas de algunas frutas y verduras

Fuente	Contenido de antocianinas (mg/100 g peso fresco)
Ciruela	2-25
Cebollas rojas	7-21
Rábanos rojos	11-60
Fresas	15-35
Frambuesas rojas	20-60
Col roja	25
Arándano azul	25-495
Moras	83-326
Arándano	60-200
Uvas	6-600
Camote morado	84-174

Fuente: Bridgers, *et al.*, 2010.

Las antocianinas en el camote morado se encuentran principalmente como compuestos mono o di acilados de la peonidina o cianidina como se muestra en la Figura 5, expresando una alta estabilidad de pH y temperatura. (Woong, *et al.*, 2011).

Jie L., *et al.*, 2012 identificaron 13 antocianinas del camote morado, entre las principales fueron 3-soforósido-5-glucósido de cianidina y de peonidina, acilados con ácido *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, cafeico; únicamente identificaron una delfidina-3,5-diglucósido.



	R ¹	R ²
Base de cianidina		
YGM-1^a	H	Phb
YGM-1b	H	Caf
YGM-2	H	H
YGM-3	H	Fer
Base de peonidina		
YGM-4b	CH ₃	Caf
YGM-5^a	CH ₃	Phb
YGM-5b	CH ₃	H
YGM-6	CH ₃	Fer

Figura 6. Antocianinas del camote morado (Phb, ácido p-hidroxibenzoico; Caf, ácido cafeico; Fer, ácido ferúlico). Fuente: Terahara y Matsui. 2008.

3.1.4 Enzimas involucradas (PFO) en el camote

El camote, contiene dentro de su estructura compuestos polifenólicos que al entrar en contacto con el oxígeno y en presencia de las enzimas polifenoloxidasas (PFO) son oxidados dando como resultado un producto indeseable de color parduzco.



Figura 7. Oxidación del camote morado. (A) Camote morado fresco. (B) Camote morado fresco oxidado.

La Comisión de Enzimas (EC) clasifica la polifenoloxidasa, con el número 1.10.3.1. dentro de la clase de las Oxidoreductasas, actuando sobre difenoles con oxígeno como aceptor. La polifenoloxidasa conocida como tirosinasa, fenolasa, catecol oxidasa, o-difenoloxidasa, monofenol oxidasa cresolasa; actúa sobre dos tipos de sustratos: monohidroxifenoles como el *p*-cresol hidroxilándolos en posición orto con respecto al grupo hidroxilo original, y sobre dihidroxifenoles tales como el catecol, oxidándolos a benzoquinona por remoción de hidrógenos del grupo hidroxilo. (Guerrero, 2009).

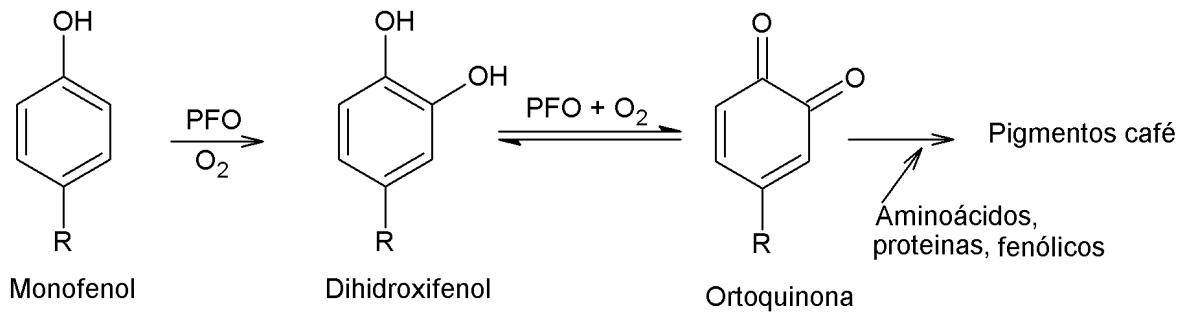


Figura 8. Acción de la PFO sobre los compuestos fenólicos. Fuente: García, *et al.* 2006.

El pardeamiento enzimático puede ser controlado a través del uso de métodos químicos y físicos.

Métodos químicos:

- Ajustando las condiciones de pH con ácidos cítrico, ascórbico, o málico. Estos acidulantes son aplicados generalmente para mantener el pH por debajo del punto óptimo de actividad catalítica de la polifenoloxidasas (pH > 4-4.5) (Gasull y Becerra, 2006).
- Existen también inhibidores como las sales, la más usada es NaCl, cuya acción impide la actividad de la polifenoloxidasas frente al ácido clorogénico.

Métodos físicos

- Tales como, los procesos térmicos (se inactiva la PFO a temperaturas superiores a los 70°C (Becerra, 2006)), además de tecnologías emergentes como los campos eléctricos pulsados, altas presiones hidrostáticas, rayos Gamma.
- La eliminación del oxígeno, exclusión o limitación de la influencia del O₂ del aire al trabajar y envasar rápidamente el material y en caso necesario con ayuda de atmósfera inerte representan medidas satisfactorias para mantener ciertas frutas al estado lo más natural posible, especialmente en lo que se refiere a textura y sabor.

- El secado llevando a a_w menores a 0.4 limita la actividad enzimática. Por ejemplo la liofilización, este proceso se basa en la sublimación del agua presente en el producto congelado. Al aplicar la liofilización; se reduce el contenido de agua y se inactivan algunas enzimas, en particular las que están compuestas de subunidades. (Valenzuela y Ortíz, 2007).

Los tratamientos por calor para la inhibición de enzimas causan sobre las frutas y hortalizas efectos adversos tales como la pérdida de color, alteraciones en su sabor, olor y pérdida de su valor nutricional. (Guerrero, 2009).

3.2 Colorantes

La calidad de un alimento depende, en primer lugar, de su valor nutritivo, pero es evidente que los caracteres sensoriales también desempeñan un papel importante, cuando no primordial. Es lógico, ya que el consumidor establece un primer contacto con los alimentos a través de su aspecto, forma y color, y posteriormente con su textura y sabor. El color proporciona información sensorial, que puede interactuar con las propiedades gustativas, olfatorias y de textura, que determinan la aceptabilidad del producto. Por lo tanto, el color de los alimentos es un factor a tener en cuenta en la mayoría de los alimentos, ya sea en su forma natural como elaborada, les corresponde un color mediante el cual el consumidor los identifica. En consecuencia, aunque el alimento tenga un elevado valor nutritivo, aromático y esté bien texturizado, no será ingerido a menos que presente un color correcto. (Muñoz, *et al.*, 2003).

Colorantes sintéticos

Son pigmentos obtenidos por síntesis química. Pueden ser de dos clases: síntesis de moléculas nuevas o síntesis de moléculas iguales a las que se encuentran en el medio natural.

Los sintéticos requieren de una certificación y los principales son:

- Azoicos: su estructura es de mono, di o triazo. Producen casi todos los colores, se caracterizan por tener un grupo cromóforo $-N=N-$.
- Antraquinonas: su estructura es uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados, tienen al menos tres anillos condensados. (Badui, 2006).

Debido a que en los últimos años la preocupación pública por la seguridad de los colorantes sintéticos en los alimentos ha llevado a una creciente atención a los biocolorantes como alternativas. (Fan, et. al., 2007). Por ejemplo, los colorantes rojo No. 2 y No. 40 se han prohibido en Austria, Japón, Noruega y Suecia, pero el rojo No. 40 aún se encuentra en escrutinio en Estados Unidos. Al mismo tiempo, dichos hallazgos se relacionan con modificaciones en la hiperactividad de niños de edad escolar lo cual puede considerarse un mal neuronal agudo. Tales antecedentes son indicios suficientes para disminuir la demanda de colorantes artificiales a favor del consumo generalizado de colorantes naturales. (Garzón, 2008).

Colorante naturales (biocolorantes)

Los pigmentos naturales son aquellos obtenidos de fuentes presentes en la naturaleza, usados para impartir color a algunos productos. Dichos pigmentos son generados por microorganismos, vegetales, animales o minerales, y difieren ampliamente en su estructura química. Aunque hay colorantes poco comunes, como el ácido carmínico, los más distribuidos en los alimentos pueden agruparse en ocho categorías. (En pigmentos fenólicos se agrupan 3):

1. Carotenoides.



2. Clorofilas.



3. Pigmentos fenólicos:
flavonoides, antocianinas y
taninos.



4. Betalaínas.



5. Hemopigmentos.



6. Otros pigmentos naturales.

Los cuatro primeros son de fuentes vegetales, aun cuando llegan a estar presentes en alimentos de origen animal, a los que ingresan a través de la dieta. La mayoría de los pigmentos vegetales se localiza en el protoplasma de las células, dentro de los organelos especializados llamados plástidos, en algunos

casos, cuando son solubles en agua, se encuentran disueltos en las vacuolas de las células.

El quinto grupo solo se encuentra en productos de origen animal. El sexto grupo se incluyen pigmentos que imparten color tanto a los tejidos vegetales como a los animales y son poco abundantes en la naturaleza. (Baduí, 2006).

Además de sus características cromáticas, ciertos pigmentos naturales poseen propiedades vitamínicas, siendo esto una poderosa razón que justifica plenamente el interés por la investigación de todos los aspectos relacionados con la extracción, purificación y estabilización de los pigmentos naturales para su empleo en alimentos.

Se estima que las antocianinas son los colorantes rojos de origen vegetal con mayor porvenir para ser utilizados como biocolorantes en alimentos. (Muñoz, *et al.* 2003).

La producción global de antocianinas está orientada a las industrias alimentarias productoras de:

- ❖ Bebidas pasteurizadas
- ❖ Confitería
- ❖ Productos lácteos



Figura 9. Confitería color rojo-rosa

3.3 Antocianinas

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de las frutas y flores. (Fennema, 2008).

La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de los animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Además se encargan de la filtración de la luz o pueden acumularse como resultado de estrés.

Dentro de las vacuolas, las antocianinas, pueden estar localizadas en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos, que se forman mientras la síntesis de pigmentos esta en operación. (Leyva, 2009).

3.3.1 Estructura de las antocianinas

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos 1 y 2 unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo 2 resultan en seis antocianidinas conocidas (figura 10) (Garzon, 2008).

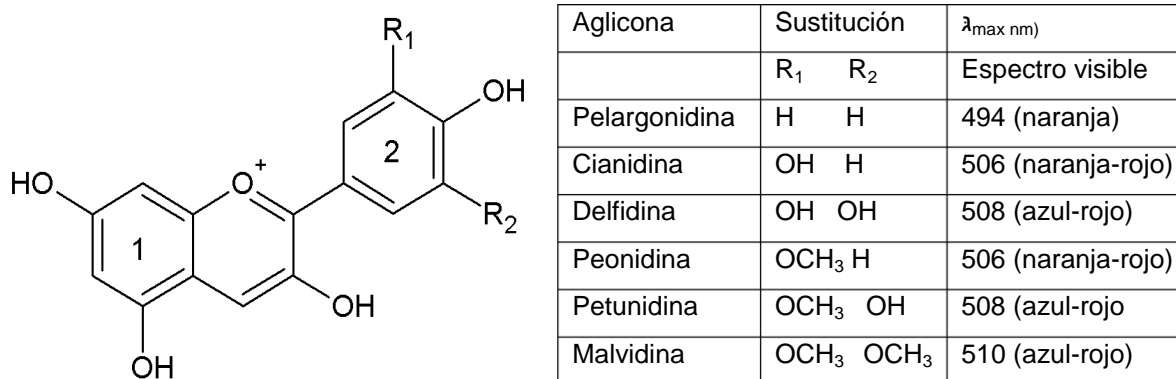


Figura 10. Estructura y sustituyentes de las antocianinas. (Garzón, 2008).

Dentro de cada grupo existe una gran variedad de compuestos cuyo color depende de la presencia y número de diferentes radicales unidos a la estructura principal. Las antocianinas se distinguen por el número de radicales hidroxilo y/o

metoxilo presente, por el tipo, número y puntos de unión de azúcares en la molécula, y por el tipo y número de ácidos alifáticos o aromáticos que están unidos a los azúcares en la molécula. (Fennema, 2008).

Los azúcares comúnmente unidos a las antocianidinas son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, así como di y tri sacáridos formados de la combinación de estos cuatro monosacáridos. En algunos casos estos residuos se encuentran acilados con ácidos cafeíco, *p*-cumárico, ferúlico, malónico, *p*-hidroxibenzoico, y acético.

3.3.2 Estabilidad

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento. (Garzón 2008). Factores como su estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno determinan la estabilidad del pigmento.

3.3.2.1 pH

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula.

En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH⁺) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal y la forma chalcona, o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire. (Garzón, 2008).

3.3.2.2 Temperatura

La estabilidad de las antocianinas en los alimentos depende en gran medida de la temperatura. En general, las estructuras que tienden a mejorar la estabilidad frente al pH también conducen a un aumento en la estabilidad térmica. Las antocianinas con un alto grado de hidroxilación son menos estables que las antocianinas metiladas, glicosiladas o aciladas. (Fennema, 2008).

Al incrementar la temperatura, el equilibrio se desplaza hacia la formación de la chalcona, y la reacción inversa es mucho más lenta que la reacción hacia la chalcona. Al disminuir la temperatura, la base quinoidal y carbinol se transforman rápidamente a forma de catión flavilio, pero el cambio de la chalcona es muy lento.

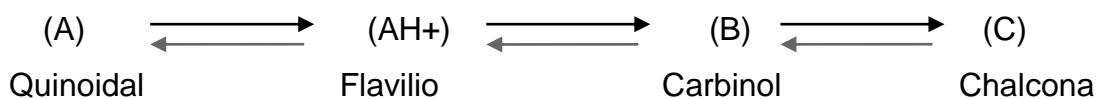


Figura 11. Equilibrio de las antocianinas.

3.3.2.3 Oxígeno

El oxígeno disuelto también tiene un efecto negativo en la estabilidad de las antocianinas; causando grandes pérdidas de las mismas (Badui, 2006).

3.3.2.4 Efecto de las enzimas

Algunas enzimas han sido implicadas en la decoloración de las antocianinas. Se han identificados dos grupos: las glicosidasas y las polifenoloxidasas. A ambas se las denomina antocianasas.

Las glicosidasas, hidrolizan enlaces glicosídicos, rindiendo azúcares y aglicona. La pérdida de la intensidad del color deriva de la menor solubilidad de las antocianidinas y su transformación en productos incoloros.

Las polifenoloxidasas actúan en presencia de o-difenoles y oxígeno para oxidar las antocianinas. La enzima primero oxida el o-difenol a o-benzoquinona que a su vez reacciona con las antocianinas mediante un mecanismo no enzimático para formar antocianinas oxidadas y productos de degradación como se muestra en la figura 12. (Fennema, 2008).

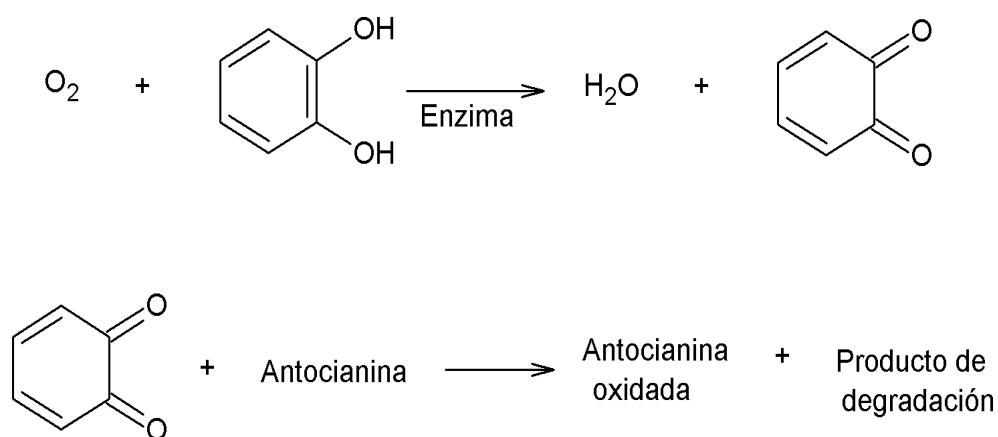


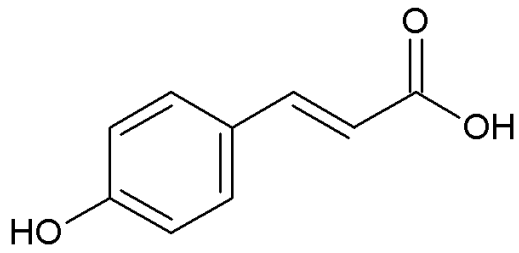
Figura 12. Mecanismo propuesto para la degradación de las antocianinas por la polifenoloxidasas. Fennema 2008

3.3.2.5 Acilación

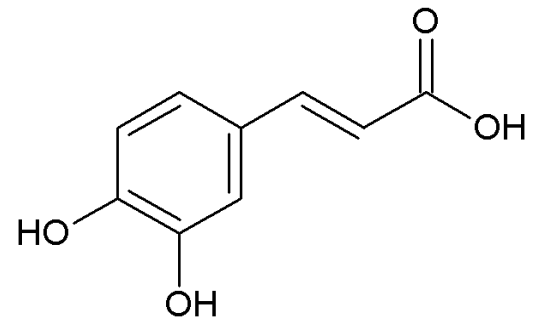
El descubrimiento de antocianinas aciladas con ácidos cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, malónico, *p*-hidroxibenzoico, y acético han mostrado alta estabilidad permitiendo la posibilidad de que estos pigmentos pudieran impartir el color y la estabilidad deseables en productos alimenticios comerciales.

Estos pigmentos son significativamente más estables a los cambios en el pH, a las condiciones de almacenamientos y procesado, y proporcionan colores que van desde el amarillo- naranja al rojo.

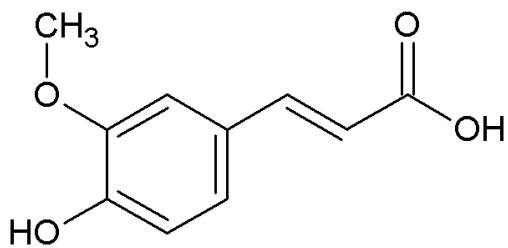
La mayor estabilidad de estos pigmentos, junto con el valor añadido de sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud, ofrece nuevas oportunidades para su empleo en gran variedad de aplicaciones. (Fennema, 2008).



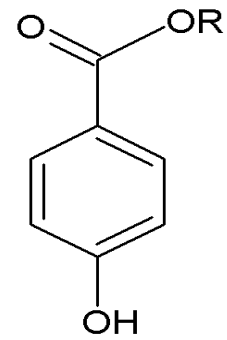
Ácido cumárico



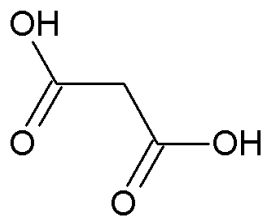
Ácido cafeico



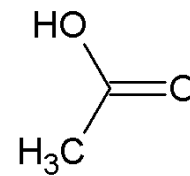
Ácido ferúlico



Ácido p-hidroxibenzoico



Ácido malónico



Ácido acético

Figura 13. Ácidos con los que se encuentran aciladas las antocianinas.

3.4 Métodos de extracción

La extracción de antocianinas, se realiza comúnmente empleando la técnica de maceración; sin embargo dicha técnica implica largos periodos de tiempo así como bajos rendimientos en la obtención de antocianinas.

La extracción por maceración puede realizarse en menor tiempo si se realiza a temperaturas elevadas, sin embargo se ha demostrado que esta variable afecta los rendimientos de extracción de antocianinas.

Las antocianinas también pueden someterse a desnaturalización cuando son extraídas de una fuente natural. El proceso de extracción implica una pérdida de color seguido de la formación de productos de degradación de color marrón y compuestos insolubles. (Yang y Zhai, 2010).

Por esta razón se han desarrollado técnicas modernas para hacer más eficiente el proceso de extracción de antocianinas como alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsados, microondas, ultrasonidos y asistida por enzimas.

3.4.1 Alta presión hidrostática

El procesamiento por alta presión hidrostática (APH) a temperatura de refrigeración, temperatura ambiente o con calentamiento moderado, evitan las consecuencias negativas de los tratamientos térmicos convencionales.

Mediante este tipo de procesado se facilita la conservación de las características organolépticas y sensoriales de los alimentos “frescos” o no procesados, y mantiene el valor nutritivo, por ser un tratamiento menos agresivo para los compuestos con actividad antioxidante como las antocianinas. Esto se debe a que la presión rompe los enlaces por puentes de hidrógeno pero no los enlaces covalentes de los compuestos, lo que evita cambios en la composición química de los alimentos. (Sánchez, *et al*, 2012).

3.4.2 Campos eléctricos pulsados

La aplicación de campos eléctricos pulsado de alto voltaje (PEAV) es una tecnología de procesado no térmico que está comenzando a ser utilizada en la industria alimentaria. Se fundamenta en la aplicación de un campo eléctrico de alta intensidad y corta duración (pulsos) con vistas a favorecer la difusión de distintos compuestos de interés como consecuencia del aumento de la permeabilidad de las membranas celulares.

Se ha evaluado el empleo de la técnica de campos eléctricos pulsantes de alto voltaje (PEAV) para incrementar la presencia de antocianinas, taninos, y en general de otros compuestos fenólicos, en los vinos. (Piñero, *et al.*, 2012)

3.4.3 Microondas

Extracción asistida por microondas (MAE) utiliza la energía de las microondas para provocar el movimiento molecular y la rotación de líquidos con un dipolo permanente, lo que lleva a un calentamiento rápido del disolvente y la muestra.

Tiene ventajas sobre los métodos convencionales de extracción, como la mejora de la eficiencia, la reducción del tiempo de extracción, un bajo consumo de disolvente y un alto nivel de automatización. Además de estas ventajas, es posible emplear una gran variedad de disolventes, ya que la técnica es menos dependiente de la afinidad con el disolvente (Yang y Zhai, 2010) y permite simultáneamente tratar diversas muestras. En comparación con el método de extracción convencional, el método de extracción asistida por microondas fue altamente eficiente para la extracción de antocianinas de las mazorcas de maíz morado chino. (Liazid, *et al.*, 2011).

3.4.4 Ultrasonidos

Los ultrasonidos mejoran los flujos de transferencia de masa por las fuerzas de cavitación, formando burbujas en la extracción líquido/sólido que colapsan generando una presión localizada; causando la ruptura del tejido de la planta y mejorando la liberación de sustancias intracelulares en el solvente. (Corrales, *et al.*, 2008).

Las ventajas de la sonicación incluyen la reducción del tiempo de procesamiento, un incremento en el rendimiento, menor consumo de energía y reducción de los efectos de termodegradación. Además de que los ultrasonidos han sido identificados como una tecnología potencial para satisfacer el requisito de la FDA de una reducción de 5 log en microorganismos encontrados en los zumos de fruta. (Tiwari, *et al.*, 2009).

Corrales *et al.*, 2008 mostró una gran viabilidad empleando ultrasonidos para extraer antocianinas de la uva. Después de 1 h de extracción, el contenido fenólico total de muestras sometidas a la sonicación fue 50% más alta que en las muestras de control (extrayendo los compuestos fenólicos mediante maceración).

3.4.5 Extracción asistida por enzimas

El tratamiento enzimático en las muestras vegetales puede ser una alternativa adecuada para aumentar la recuperación de antocianinas.

Las enzimas comúnmente utilizadas en la industria alimentaria catalizan una variedad de reacciones de hidrólisis. (Laroze *et al.*, 2010).

Además, la extracción con ayuda de enzimas permite la utilización de subproductos agro-industriales proporcionando una nueva alternativa para dar valor añadido a los residuos no utilizados.

El mecanismo para la extracción asistida por enzimas de compuestos fenólicos de fuentes residuales se basa en que las enzimas degradan la pared celular, dejando

los materiales intracelulares más expuestos a la extracción. De esta manera, la descomposición o degradación parcial de los polisacáridos de la pared celular también permite la extracción de los compuestos bioactivos. (Gómez, *et al.*, 2012).

La adición de enzimas pectinolíticas o mezcla de estas con amilasas, durante o después del macerado se ha ensayado a nivel piloto y parece tener amplias perspectivas. En particular, se ha propuesto su uso en procesos de extracción de antocianinas en donde se han obtenido mejoras en los rendimientos del pigmento. La adición de estos bicatalizadores se ha propuesto principalmente en la remoción de sólidos del extracto crudo para la obtención de antocianinas de la uva, agregándose pectinasa (100-150 ppm) y amilasa fúngica (250 ppm), permitiendo su acción durante 4-14 días. También se ha ensayado en la extracción de los pigmentos, la adición de 1000 unidades/kg de material de celulasa, pectinasa, polisacaridasa y proteinasa por dos horas en agitación a 4°C. Este último método se ha aplicado a uvas, frambuesa, flores de *Delphinium* en la extracción de antocianinas y en betabel, para producir betalaínas. Sin embargo, puede extenderse a cualquier proceso de extracción de colorantes naturales a partir de frutos y vegetales. (López, *et al.* 2004).

4. HIPÓTESIS

Si las antocianinas presentes en el camote morado soportan altas temperaturas de extracción, se debe a que las antocianinas son aciladas; resistiendo así las condiciones de proceso para su aplicación como biocolorante en alimentos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar un proceso de extracción para obtener a escala preparativa extractos enriquecidos y estandarizados de antocianinas del camote morado para usarlo como biocolorante de alimentos.

5.2 Objetivos particulares

- Proponer un tratamiento del camote morado (ácido, térmico, secado), que favorezca la mayor concentración de antocianinas y la menor actividad enzimática
- Evaluar los parámetros de extracción que permita la máxima extracción (ácido, disolvente, temperatura, tiempo) de antocianinas.
- Identificar parcialmente las antocianinas presentes en el camote morado.
- Aplicación como biocolorante a alimentos (caramelos, manteca de cacao, malvavisco).

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La metodología experimental desarrollada para alcanzar los objetivos propuestos fue la siguiente:



Figura 14. Diagrama general de la investigación. Dividida en 4 etapas.

6.1 Material y equipo

El material, los equipos y reactivos que se emplearon en el trabajo experimental fueron los siguientes:

- ❖ Liofilizadora Labconco 7522900
- ❖ Congelador -80°C Revco Harris
- ❖ Balanza analítica OHAUS AP1105
- ❖ Balanza triple beam balance 700 series OHAUS
- ❖ Licuadora Osterizer
- ❖ Molino para café/ spice Grinder- Krups G*4100
- ❖ Sonificador cole porme 8892 335 W, 50-60 Hz
- ❖ Rotavapor R-215, con baño de calentamiento B-491(Heatin Bath), bomba de vacío V-700, vacuum controller v-850 marca Büchi.
- ❖ Espectrofotómetro GBC-cintral.
- ❖ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC: autoinyector Waters 2707, bomba Waters 1525, detector UV Waters 2478 y desgasificador, el software que se usó fue Empower.
- ❖ Columna Hypersil Gold 250*4.6 mm 5µm, marca Thermo sicientific.
- ❖ Agitadora Lab-line
- ❖ Vaporera
- ❖ Camote de la central de abastos.
- ❖ Amilase An FP 160
Amilase activity 200 U/mL
Xilanasa activity 26 U/mL
Pectinasa activity 9 U/mL
pH = 6
ID 120503

6.2 Desarrollo experimental por etapas

La metodología experimental consistió en 4 etapas: 1) tratamiento previo de la muestra, para inactivar las enzimas polifenoloxidasas, 2) estudio de seis variables sobre la extracción de antocianinas, 3) identificación parcial de antocianinas de camote y 4) aplicación del biocoloante a varios alimentos.

A continuación se detalla el procedimiento experimental para cada una de las etapas.

6.2.1 Etapa 1. Preparación de la muestra

Para obtener un mayor rendimiento en la extracción de antocianinas totales de camote se inactivó la polifenoloxidasa aplicando tres tratamientos; térmico, ácido y secado, antes de la extracción. En la Figura 15 se muestra el diagrama experimental para cada uno de los procedimientos.

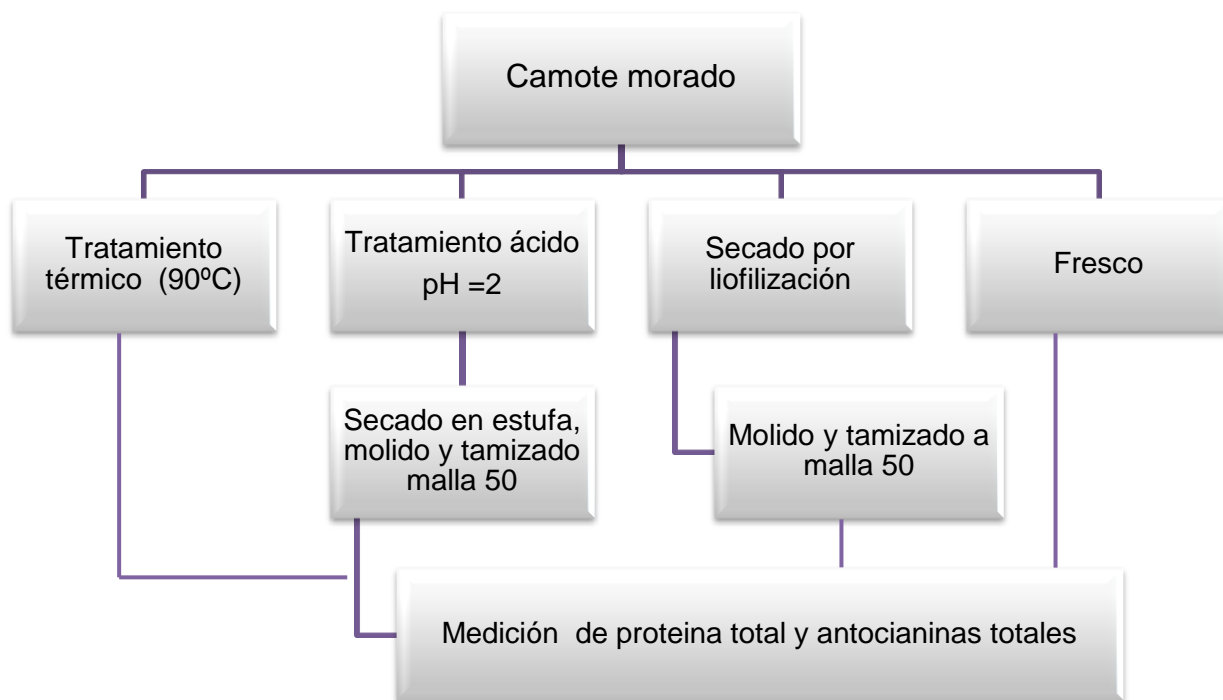


Figura15. Diagrama experimental de tratamientos de la muestra.

❖ Camote Fresco

Determinación de humedad

Se tomó una muestra de camote morado que se cortó en cuadros de 5x5 mm para determinar el porcentaje de humedad. Se usó el método de secado en estufa durante 24 horas a una temperatura de 50 °C.

Se tomó una muestra de camote morado que se cortó en cuadros de 5x5 mm y se le midió proteína total y antocianinas totales

❖ Tratamiento Térmico

En este tratamiento, el camote morado fresco se cortó en rodajas de 10 mm de espesor aproximadamente; las rodajas se colocaron en una vaporera a 90°C (temperatura de vapor) durante un tiempo de 4 minutos, posteriormente se sacaron del equipo y se cortaron en cuadros de 2x2 mm con los cuales se realizó la medición de proteína total y antocianinas totales.

❖ Tratamiento ácido

Para el tratamiento ácido, el camote fresco se cortó en rodajas de 10 mm de espesor que fueron sumergidas en una solución de ácido cítrico pH=2 durante dos minutos, posteriormente las rodajas se colocaron en la estufa a 50° C durante dos horas. Una vez que las rodajas se secaron, se llevaron a un tratamiento de molienda y se tamizó a malla 50, finalmente se midió proteína total y antocianinas totales.

❖ Secado por liofilización

Para el secado por liofilización, el camote morado se cortó en rebanadas de 5 mm de espesor y se refrigeró a -80°C durante 1 hora; la muestra se liofilizó por 36 horas. Una vez transcurrido el tiempo de secado, la muestra se pulverizó y se tamizó con malla 50 para realizar la determinación de proteína total y antocianinas totales.

❖ Medición de la actividad de la enzima PFO

Para determinar la actividad enzimática se pesó 1g de muestra y se colocó en un matraz de 25 mL al que se le adicionaron 10 mL de buffer de fosfatos y 0.25 g de carbón activado. Para separar la fase sólida se filtró al vacío empleando un embudo Büchner y una cama de Celita.

De la fase líquida se tomó una alícuota de 1 mL en un tubo de ensayo y se le agregaron 4 mL de catecol (4mg/mL) como sustrato; inmediatamente después de adicionar el catecol se realizó la medición de la absorbancia a 470nm cada 10 segundos durante 10 minutos. Se emplearon celdas de cuarzo de 2 mL.

❖ Cuantificación de la concentración de proteína total

La cuantificación de la proteína se determinó por el método de Bradford; el cual cuantifica la unión del colorante Azul de Coomasie a una proteína desconocida y se compara con el estándar de diferentes concentraciones de proteína suero de albúmina bovina (BSA). (García, et. al., 2006).

Para cada tratamiento de inactivación de la PFO se tomaron 0.10g de muestra y se colocaron en un matraz de 25mL al que se le adicionaron 20 mL de buffer de fosfatos pH 7 y 0.25 g de carbón activado. La solución se filtró al vacío con un embudo Büchner y una cama de Celita. De la fase líquida se tomó una alícuota de 1 mL y se le agregó 1 mL de reactivo de Bradford; posteriormente se vertió en una

celda de cuarzo de 2 mL y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 470nm.

❖ Cuantificación de antocianinas por el método de pH-diferencial

Para la medición de antocianinas totales se pesó 1 g de la muestra y se colocó en un matraz de 25 mL al cual se agregaron 20 mL de una solución de metanol: agua 80:20% y 1% de ácido tartárico; posteriormente la solución se sonicó durante 40 minutos a temperatura ambiente. Por último se filtró al vacío con un embudo Büchner. Y se leyó en el espectrofotómetro siguiendo el método de pH-diferencial.

6.2.2 Etapa 2. Variables de extracción

Para determinar las condiciones que permiten extraer la mayor cantidad de antocianinas totales con el menor tiempo de sonicación, se evaluó el efecto del ácido extractante, disolvente, proporción de agua/disolvente, tiempo y temperatura.

En la figura 16 se muestra en detalle las condiciones que se evaluaron.

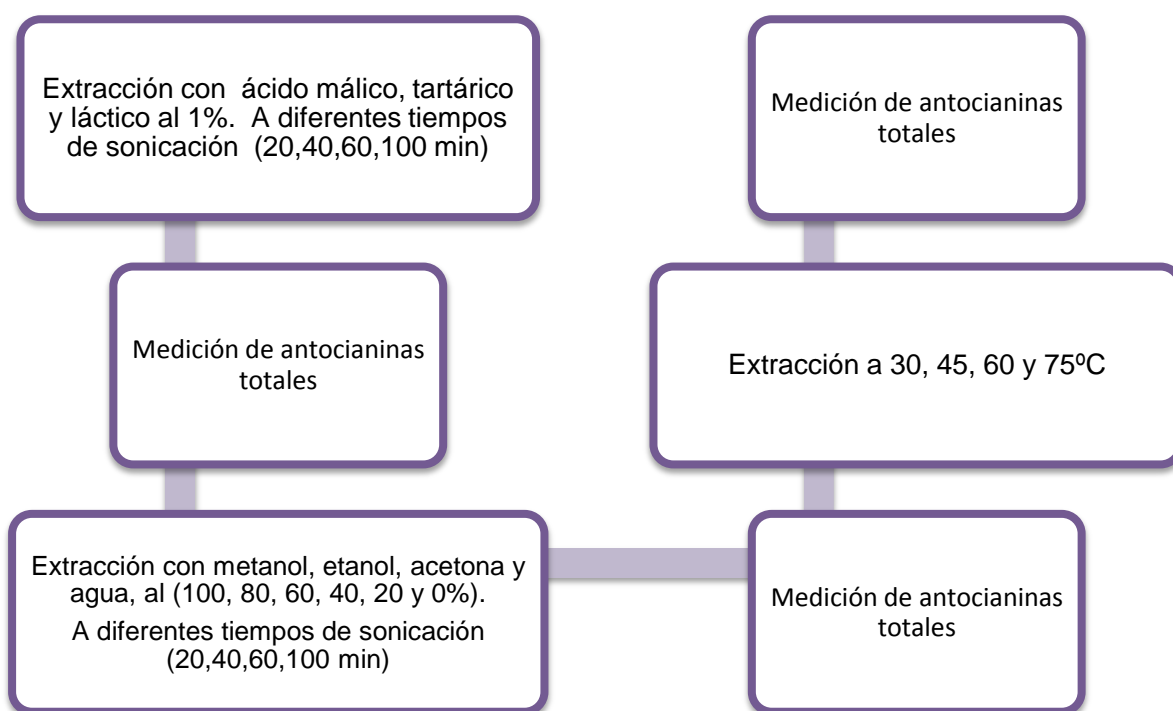


Figura16. Diagrama experimental de variables de extracción

❖ Efecto del Ácido

Una vez que se determinó el tratamiento previo de la muestra (previo a la extracción) que presentó el mayor rendimiento de antocianinas totales y la menor actividad de polifenoloxidasas, se estudió el tipo de ácido permitido en alimentos:

ácido láctico, ácido tartárico y ácido málico al 1% sobre el rendimiento de antocianinas.

La extracción de antocianinas con diferentes ácidos se realizó de la siguiente manera:

A 1g de la muestra se le adicionaron 20 mL de una solución de metanol al 80%, con 1% del ácido correspondiente. La solución se sonicó a distintos tiempos (20, 40, 60 y 100 minutos) a una temperatura de 30°C. A cada uno de los tiempos se tomó una alícuota del sobrenadante y se le midió antocianinas totales.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los ácidos propuestos; este experimento permitió seleccionar el ácido que presentó los mejores rendimientos de antocianinas y el menor tiempo de sonicación.

❖ Efecto del disolvente y la proporción agua/disolvente

Se probaron los siguientes disolventes permitidos en alimentos: etanol, acetona y agua; además se empleó metanol, ya que en investigaciones previas se ha reportado como el disolventes que recupera la mayor concentración de antocianinas (Galicia, et al., 2008), pero debido a su elevada toxicidad no esta permitido su uso en alimentos. Las proporciones de etanol-agua, acetona-agua y metanol-agua que se estudiaron fueron: 100, 80, 60, 40, 20 y 0% de disolvente.

En un matraz de 25 mL se pesó 1g de la muestra al que se le adicionaron 20 mL del disolvente con 1% del ácido seleccionado en la fase anterior. La solución se sonicó a distintos tiempos (20, 40, 60 y 100 minutos) a una temperatura de 30°C. A cada tiempo se tomó una alícuota del sobrenadante y se le midió antocianinas totales.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los disolventes así como para cada una de las mezclas propuesta. Esta serie de experimentos permitió seleccionar el disolvente y la mezcla de disolventes que presentó la mejor

concentración de antocianinas (mg de antocianinas/g de muestra) y el menor tiempo de sonicación.

❖ Efecto de la temperatura

Se analizaron distintos valores de temperaturas: 30, 45, 60 y 75°C. Para cada uno de los experimentos la muestra se preparó de la siguiente manera:

Se pesó 1g de la muestra en un matraz de 25 mL al que se agregaron 20mL del disolvente y 1% de ácido con las condiciones previamente seleccionadas (tipo y proporción de la mezcla de disolventes, tipo de ácido y tiempo). La solución se sonicó a las temperaturas propuestas y se realizó la medición de antocianinas totales.

Se seleccionó la temperatura con la que se obtuvo el mayor contenido de antocianinas totales.

❖ Efecto de la enzima

Debido a que el residuo sólido de las extracciones presentaba una coloración rosada, se decidió probar una segunda extracción asistida por amilasas.

En la extracción asistida se usaron dos concentraciones al 1% y 5% de extracto enzimático. Se pesaron 0.5 g del residuo sólido, al cual se le agregaron 10 mL de buffer de fosfatos (pH 5) y la cantidad de amilasa correspondiente. La solución se agitó a 300rpm por un tiempo 24 horas a una temperatura de 24°C. Posteriormente se filtró al vacío con un embudo Büchner y la fase líquida se colocó en un matraz bola y se evaporó en un rotavapor.

El extracto obtenido se le determinó antocianinas totales.

6.2.3 Etapa 3. Identificación parcial de las antocianinas

Para llevar a cabo la identificación parcial de las antocianinas, se realizó una purificación del concentrado de camote morado en una columna de Amberlita, eluyendo con un gradiente de disolvente y ácido.

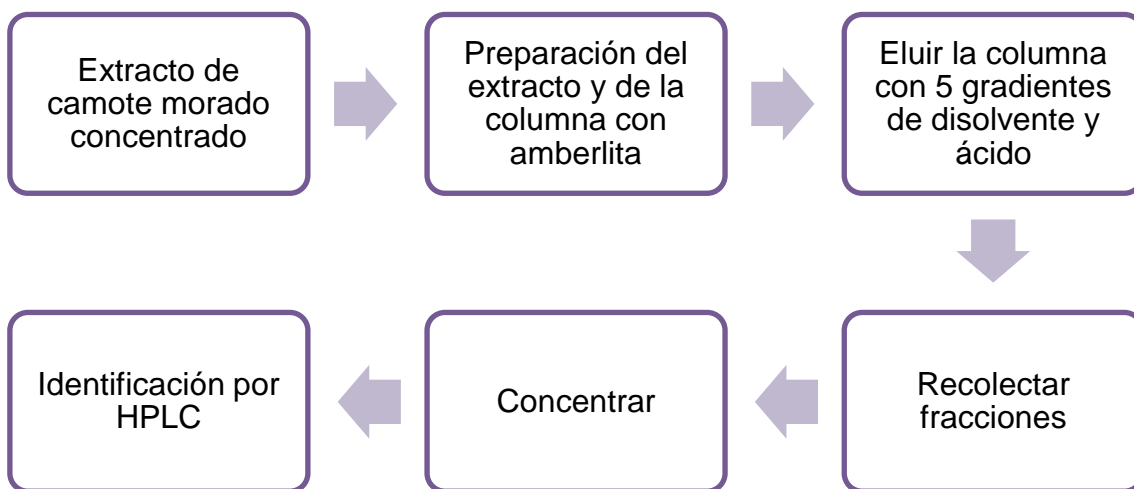


Figura17. Diagrama experimental de la identificación de antocianinas.

Para realizar la identificación parcial de antocianinas de camote morado, se preparó un extracto empleando las mejores condiciones de extracción que se obtuvieron previamente. Del concentrado se tomaron 10 g de material sólido, y se le realizaron 5 lavados empleando 10 mL de acetato de etilo separando lo soluble de lo insoluble. De la parte insoluble se pesaron 100mg en un vaso de precipitado de 10 mL y se le agregaron 50 μ L de disolvente ácido.

❖ Purificación del extracto de antocianinas

Para realizar la purificación, se empacó una columna de 3 cm de diámetro con 30 g de Amberlita; una vez empacada la columna se vertió la parte insoluble con el disolvente ácido eluyendo la columna con un gradiente de agua-metanol-ácido como se describe a continuación.

1. 100mL de una solución de agua con 0.01% de ácido acético. Se recolectó una fracción en un matraz erlen meyer.
2. 200 mL de una solución 80:29:1, agua- metanol - ácido acético. Se recolectaron 4 fracciones.
3. 200mL una solución 60:39:1 agua- metanol- ácido acético. Se recolectaron 6 fracciones.
4. 400mL de otra solución 50:50:5 agua-metanol-ácido acético. Se recolectó 11 fracciones.
5. 200mL de una solución 75:25:5 metanol-agua-ácido acético. Se recolectó 7 fracciones.

Por último cada una de las fracciones se vertieron en un matraz bola y se concentraron en el rotavapor, a cada uno de los concentrados se analizó por HPLC.

6.2.4 Etapa 4. Aplicación del biocolorante a alimentos

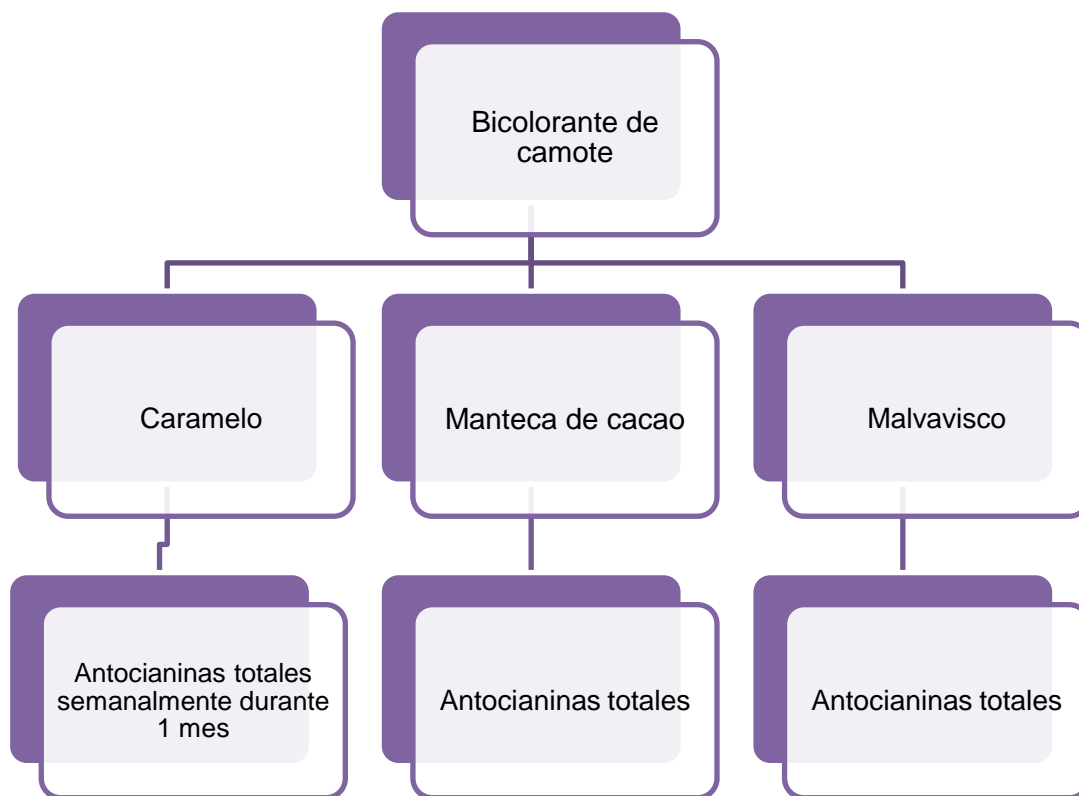


Figura18. Diagrama experimental de aplicación del biocolorante a alimentos.

Se preparó un extracto con 100g de camote morado y 2000mL de disolvente, en las mejores condiciones obtenidas en las etapas 1 y 2.

El extracto se almacenó a temperatura ambiente para ser aplicado a los siguientes alimentos:

❖ Caramelo duro

- Se mezclaron 100g de azúcar refinada con 260g de glucosa y 250mL de agua en un recipiente de aluminio.
- La mezcla de azúcares se calentó en la estufa sin hervir, hasta obtener una solución.
- Posteriormente la solución se hirvió hasta llegar a 160°C y se le agregaron con una espátula 0.13g de biocolorante.

- Una vez incorporado el colorante, la solución colorida se retiró del fuego y se vació en moldes de silicón.
- Los caramelos de color se almacenaron a temperatura controlada de 23°C durante 1 mes.
- Semanalmente a los caramelos se les determinó antocianinas. Para esta determinación se pesó 1g de caramelo duro en un matraz de 25 mL, se le adicionaron 20 mL de disolvente ácido y se le extrajeron las antocianinas.

❖ Manteca de cacao

- Se pesaron 200g de manteca de cacao.
- La manteca se calentó a baño maría en un recipiente de aluminio hasta llegar a una temperatura aproximadamente de 55-60°C.
- Se le agregaron con una espátula 0.13g de biocolorante.
- Se le midió antocianinas totales de la siguientes manera:
 - . Se pesaron 5g de manteca de cacao en un matraz de 250 mL con extracto de camote morado. Posteriormente se le adicionaron 100 mL de disolvente ácido y se extrajeron las antocianinas.
 - . Al extracto obtenido se le hicieron 4 lavados con hexano para eliminar la grasa.
 - . A dicho extracto se le midieron antocianinas totales.

❖ Malvavisco

- Se hidrataron 21g de grenetina con 120 mL de agua en un recipiente de plástico.
- Se mezclaron 400g de azúcar con 180g de glucosa y 60mL de agua en un recipiente de aluminio, se disolvieron y se calentaron hasta llegar a 121°C. Se retiró el recipiente de aluminio del fuego.

- Se mezclaron la gredina hidratada con el azúcar, glucosa y agua en el recipiente de plástico.
- Se batió la mezcla hasta ser aireada y se le agregaron con una espátula 0.13g de biocolorante.
- Se moldeó en recipientes de vidrio previamente glaseados.
- Se extrajeron antocianinas pesando 1 gramo de la muestra en un matraz de 25 mL con 20 mL de disolvente ácido.
- Por último se determinaron antocianinas totales.

6.3 Métodos de análisis

6.3.1 La actividad de la enzima (polifenoloxidasas)

La actividad de una enzima se determina conociendo la velocidad de la reacción que cataliza. La velocidad de reacción se define como la cantidad de sustrato consumido o de producto formado por unidad de tiempo.

A partir de una curva de tiempo contra absorbancia a 470nm se calcula la velocidad inicial de la reacción como la pendiente (a) de la parte lineal de la curva de progreso.

Conociendo la pendiente (a) se podrá determinar la actividad enzimática de la polifenoloxidasas en U/g, sabiendo que U de actividad es la cantidad de enzima que cataliza la aparición de 1 micromol de producto por minuto.

El cálculo de la concentración se basa en la ley de Lambert-Beer, considerándose el volumen del ensayo y el factor de dilución:

$$a = \varepsilon * A * I$$

$$A = \frac{a * Vol\ del\ ensayo * Factor\ de\ dilución}{\varepsilon * I} = U/g$$

Dónde:

a = Pendiente de la absorbancia/tiempo (min^{-1})

I = 1 cm (espesor de la celda)

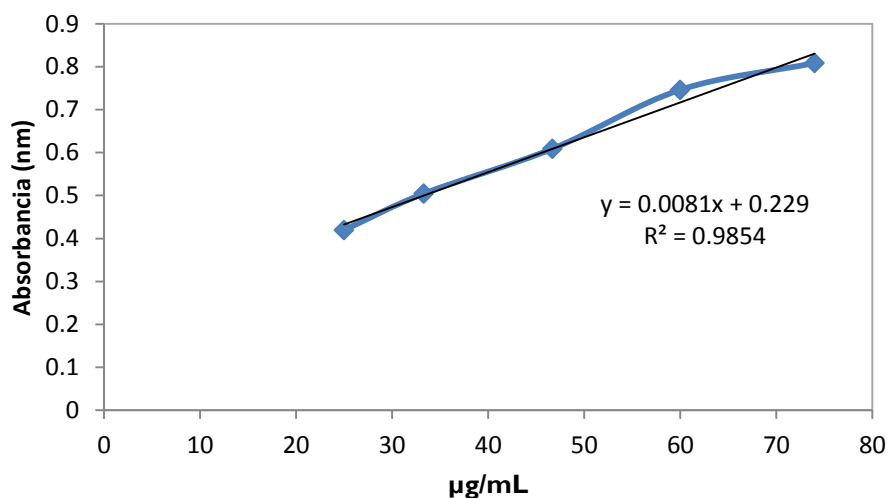
ε = Coeficiente de extinción molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Determinación de la cantidad de proteína soluble y actividad específica

La cuantificación de la proteína soluble se determinó por el método de Bradford, que se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre.

Se tomó 1 mL del extracto enzimático en un tubo de ensayo de 10 mL y se le agregó 1 mL del reactivo de Bradford, midiéndose por último en celdas de cuarzo de 2 mL la absorbancia a 470nm.

Para conocer la concentración de enzima total en la muestra se elaboró una curva patrón con albúmina bovina (ABS) en un rango de concentración de 25-74 µg/mL, interpolándose los datos.



Gráfica 1. Curva patrón de la albúmina bovina.

Obteniéndose de esta manera la actividad específica que se calcula:

$$AE = \frac{A (U/g)}{C_{deproteína} \left(\frac{mg}{g}\right)} = \frac{U}{mg}$$

6.3.2 Determinación de antocianinas totales

La determinación de antocianinas totales se llevó a cabo de acuerdo a la metodología del pH diferencial descrita por Giusti y Wrolstad, 2001 (Figuroa, *et al.* 2011) Ésta se basa en las transformaciones estructurales que sufren las antocianinas monoméricas con un cambio en el pH; estos compuestos adquieren la conformación de catión flavilio (color rojo intenso) a pH 1 y la forma hemiacetal (incolora) a pH 4.5.

La medición se hizo tomando 200 µL del extracto obtenido, mezclándose con 1800 µL de buffer de cloruros 0.025M pH 1 en un tubo de ensaye, y se tomaron otros 200 µL de extracto con 1800 µL de buffer de acetatos 0.4M pH 4.5.

Para cada solución, se midió la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de las antocianinas) y a 700 nm en un espectrofotómetro UV visible usando agua destilada como blanco. El contenido de antocianinas totales se expresa como mg/L de cianidina 3-glucósido. La absorbancia final se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A^* = (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{520nm} - A_{700nm})_{pH4.5}$$

$$AT = \frac{A^* \times PM \times FD \times 1000}{\Sigma \times 1}$$

Dónde:

PM = Peso molecular de la cianidina 3-glucósido = 449.2 g/mol

FD = Factor de dilución: 10

Σ = Absortividad molar de la cianidina 3-glucósido = 26900 L/cm mg

La concentración final se obtiene en función del volumen de disolvente empleado y peso de la muestra obteniéndose unidades de mg de antocianinas totales/g de muestra

6.3.3 Identificación parcial de antocianinas por HPLC

Para hacer la identificación del perfil de antocianinas, se utilizó el HPLC.

Del extracto concentrado en el rotavapor, se tomó 2mg y se aforó a 1 mL con el disolvente que se extrajo las antocianinas y se bajó a un pH de 1.84 con ácido clorhídrico y lograr de esta manera una eficaz resolución de señales. Finalmente se inyectó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Se utilizó una columna Hypersi Gold (250 x 45mm, 5 μ m), sistema HPLC con detector dual de absorbancia, flujo de 1.2 mL/min. Se usó sistema de gradiente, y fase móvil de dos disolventes: 90% de A: ácido acético- agua (10:90), y 10% B: metanol-agua- ácido acético (50:40:10). El gradiente fue 0-5 min: 90% A y 10 % B, de 5-10 min: 100% B y de 10-20 min: 90% A y 10% B.

6.3.4 Análisis estadístico empleado

Todas las mediciones se realizaron por triplicado, se les calculó la media, la desviación estándar (δ) que mide que tan separados están los datos, y el coeficiente de variación que es la relación entre la desviación estándar de una muestra y su media, por lo que define la confiabilidad del resultado.

Para determinar si había o no diferencia significativa de los datos entre cada tratamiento se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%.

Y la prueba del rango múltiple de Duncan, para cuando existe diferencia significativa entre las muestras en un análisis de varianza y así poder saber específicamente entre que muestras existe la diferencia con un nivel de confianza del 95%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Etapa 1. Tratamientos de la muestra

Las raíces del camote morado usadas en este trabajo fueron obtenidas en la central de abastos de la ciudad de México y según el proveedor se produjeron en Salvatierra, Guanajuato, las raíces estudiadas fueron de la cosecha 2012.

Las muestras de camote se lavaron, secaron y guardaron en refrigeración a -80 °C hasta su uso.

Al camote fresco se le midió el contenido de humedad, observándose en la tabla 3 más del 50% de su peso es agua, lo que lo hace un producto fresco muy perecedero:

Tabla 3. Humedad del camote morado (%).

% Humedad	64.62
Desviación estándar	0.12

Inactivación enzimática.

Al cortar el camote morado se observó un oscurecimiento paulatino (figura19), coincidiendo con lo reportado por Quispe, *et al.* 2006, quienes dicen que el camote morado contiene dentro de su estructura compuestos polifenólicos que al entrar en contacto con el oxígeno y en presencia de la polifenoloxidasas son oxidados.

Dicho oscurecimiento del camote se debe al pardeamiento enzimático, que es un conjunto complejo de reacciones, se inicia por la o las reacciones catalizadas por las oxidasas presentes en el camote. Los productos finales de estas reacciones son las melaninas, que son de color muy oscuro, o negro, e insolubles en agua. (<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>, último acceso 19-11-2012).

Una consecuencia del pardeamiento enzimático en el camote es la parcial o total degradación de las antocianinas responsables del color del vegetal. Existen varios procedimientos para evitar el pardeamiento enzimático en vegetales, los más conocidos son: inhibición de las PFO por agentes reductores, agentes quelantes de metales, modificación del pH, calentamiento y control de la actividad acuosa. En este trabajo se estudió el efecto del ácido, de la temperatura y del tipo de secado sobre la descomposición de las antocianinas del camote por las PFOs para evitar las reacciones de oxidación y por tanto bajos rendimientos en la extracción del colorante.

El camote morado se sometió a tres diferentes tratamientos para evaluar la acción de la PFO sobre las antocianinas, también se midió la actividad específica de la PFO y el contenido de antocianinas tanto en camote fresco como en el tratado.

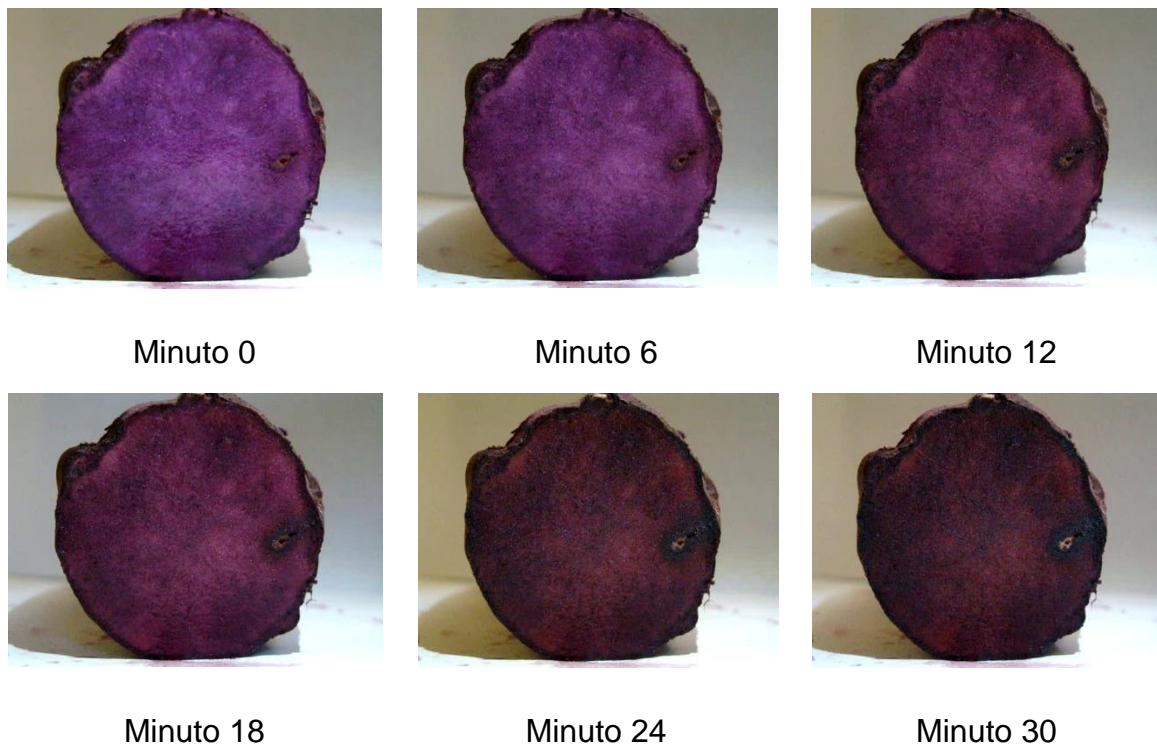
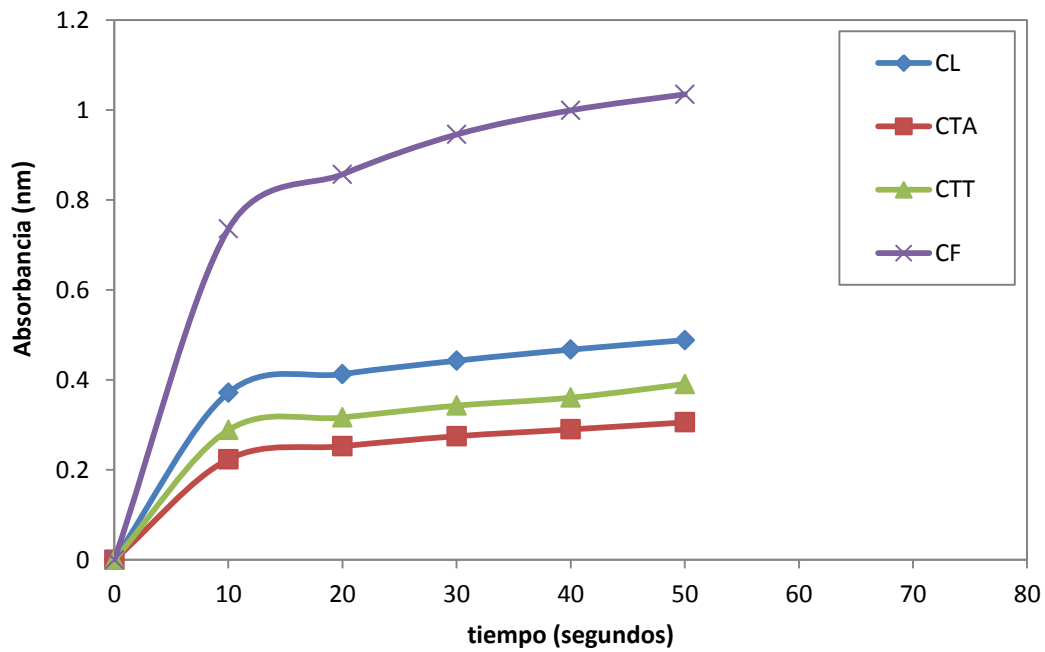


Figura 19. Oscurecimiento del camote morado a través del tiempo.

La Gráfica 2 muestra las cinética de reacción de las PFOs del camote fresco, liofilizado, calentado y puesto en una solución de ácido cítrico pH=2.



Gráfica 2. Cinética de reacción de la polifenoloxidasasa. (CL: Camote morado liofilizado, CTA: camote morado tratamiento ácido, CTT: camote morado tratamiento térmico, CF: camote morado fresco).

Con la Ley de Lambert- Beer y sabiendo la concentración de proteína soluble total se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los valores de actividad específica que se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4. Actividad, actividad específica y porcentaje de inactivación enzimática de los 3 tratamientos estudiados.

Tratamiento	Actividad (U/g)	Actividad específica (U/mg)	% de inactivación
Camote morado fresco (CF)	19.62	2.25	0
Camote morado liofilizado (CL)	16.15	0.58	74.40
Camote morado t. térmico (CTT)	13.85	0.59	73.75
Camote morado t. ácido (CTA)	11.53	0.50	77.79

Como se puede observar en la Tabla 4 el tratamiento previo a la extracción que inactiva en mayor porcentaje la polifenoloxidasas es la inmersión del camote en una solución ácida (77.79% de inactivación) con respecto al camote morado sin tratamiento (CF), mostrando diferencia estadística significativa a un nivel de confianza del 95% con los otros dos tratamientos previos.

Esto se debe a que el vegetal fue sumergido en una solución de pH 2, cesando la actividad enzimática de la polifenoloxidasas, que tiene una actividad óptima a un pH>4-4.5 (Gasull y Becerra, 2006), y por tanto impidiendo el pardeamiento enzimático.

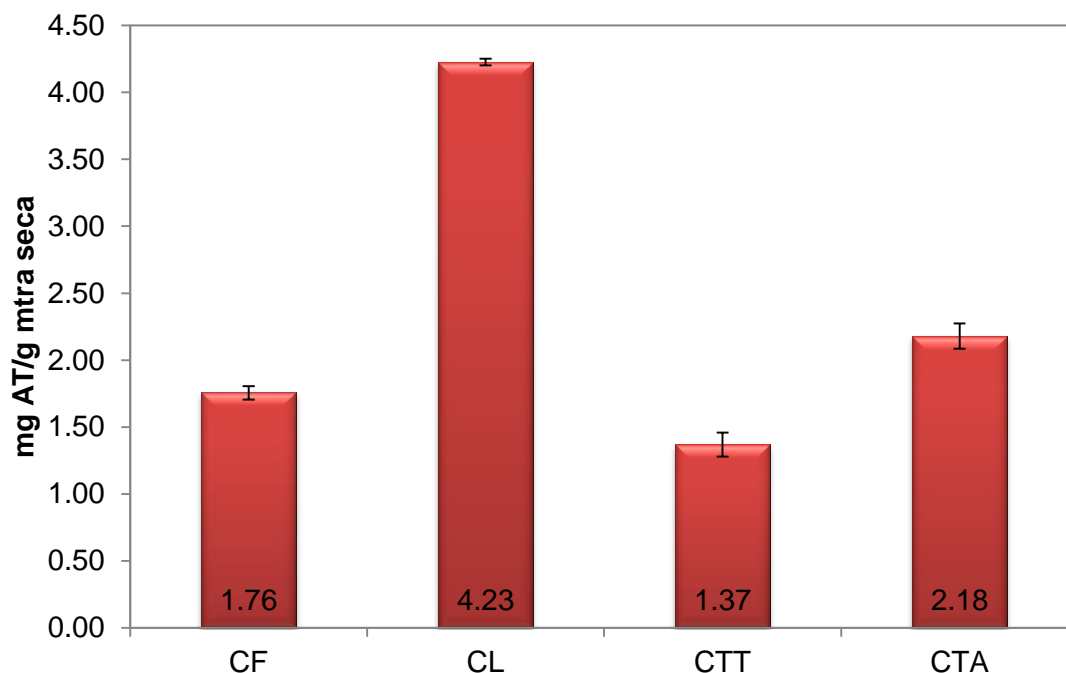
Sin embargo se esperaba que el tratamiento térmico (CTT) mostrara una mayor inactivación enzimática ya que con temperaturas superiores a 60°C la enzima pierde su actividad debido a un cambio en su estructura (debilitando los puentes de hidrógeno de las enzimas (Gasull y Becerra, 2006)); siendo el tratamiento térmico, el que mostró menor inactivación enzimática (73.75%) con respecto al camote morado sin tratamiento (CF).

Esto se debe a que el camote morado se sometió 4 minutos a temperatura de vapor, por lo que probablemente era necesario un mayor tiempo de calentamiento, para inactivar de manera más eficiente la PFO. Algunos trabajos de blanqueamiento de camote señalan que con 1 o 2 minutos de calentamiento se logra inactivar la PFO en más del 90% (Quispe, *et al.* 2006). Sin mostrar diferencia estadística significativa con el tratamiento previo del camote secado por liofilización.

El secado por liofilización muestra una inactivación enzimática considerable del 74.4% con respecto a la actividad específica del camote morado sin tratamiento (CF). Esta baja actividad se debe a 3 posibles causas, la primera es que en la liofilización (proceso que consiste en dos etapas principales: la congelación y el secado del sólido congelado bajo vacío) se genera una variedad de tensiones, que tienden a desestabilizar a la enzima desnaturalizándola (Wong. 2000). La segunda es que cuando se mide la actividad enzimática la muestra se pone en solución (buffer) impidiendo la entrada de oxígeno, por lo tanto limitando la actividad enzimática. La tercera se debe a que en este tratamiento se elimina el medio acuoso, es decir, el medio de reacción enzimático, sabiéndose que la actividad enzimática decrece al disminuir la actividad acuosa (<http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r45967.PDF> último acceso 22-01-2013), y según lo reportado por Albán y Figueroa (2011) el camote morado fresco tiene un a_w a 30°C de 0.98 y después de secarlo (secado por charolas) tiene un a_w a 30°C de 0.38.

Medición de antocianinas totales (AT)

En paralelo a la medición de la actividad de la PFO se midió antocianinas totales a cada uno de los tratamientos al que fue sometido el camote morado y se les comparó con el camote sin tratamiento, la Gráfica 3 muestra los resultados obtenidos, (todos reportados en base seca):



Gráfica 3. Antocianinas totales (mg AT/ g) de camote morado de cada tratamiento previo realizado. (CL: Camote morado liofilizado, CTA: camote morado tratamiento ácido, CTT: camote morado tratamiento térmico, CF: camote morado fresco).

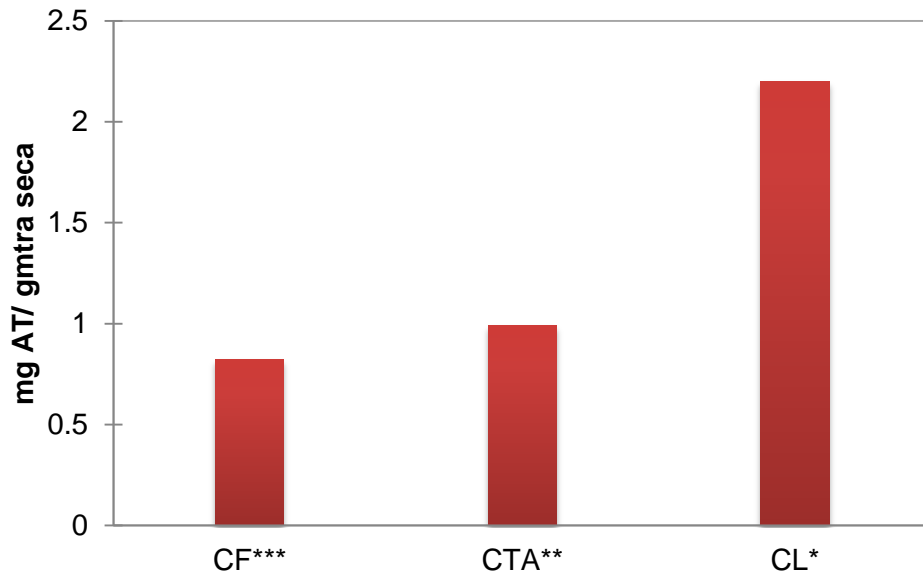
En la Gráfica 3 observamos que la cantidad de antocianinas en el camote morado liofilizado (4.23mg AT/g muestra), son significativamente más elevados que en el tratamiento térmico (1.37 mg AT/g muestra) y que en el tratamiento ácido (2.18mg AT/g de muestra), y más del doble que el camote sin tratamiento (1.76mg AT/g muestra). Los tres tratamientos (secado por liofilización, tratamiento ácido y térmico) muestran estadísticamente diferencia significativa con nivel de confianza del 95%.

El tratamiento de secado por liofilización es el que presenta la mayor concentración de antocianinas totales, debido a que estas quedan intactas, es decir, la manipulación de la muestra (camote morado) es mínima ya que únicamente es cortado en rebanadas, congelado y liofilizado.

A pesar de que el tratamiento ácido es el que menor actividad específica enzimática reporta (ver Tabla 4), hay poco menos del doble de antocianinas totales que en el camote liofilizado. Este bajo rendimiento de antocianinas se debe a que el camote morado al ser sumergido en la solución ácida, se extrae parte del color perdiendo de manera significativa a las antocianinas.

Para el tratamiento térmico se reporta una pérdida significativa de antocianinas con respecto al camote sin tratamiento. Esto ocurre porque el camote morado dentro de su estructura contiene un alto contenido de almidón, que al ser sometido a temperaturas superiores a 50°C comienza a gelatinizarse, aumentando así la viscosidad. Los gránulos de almidón se hidratan, se hinchan y se unen unos con otros; evitando la difusión de las antocianinas hacia el disolvente.

En investigaciones previas se ha reportado el contenido de antocianinas totales en base seca del camote morado fresco (CF), camote morado liofilizado (CL) y camote morado con tratamiento ácido (CTA) en condiciones similares a las estudiadas en este trabajo, en la Gráfica 4 se presentan estos datos.



Gráfica 4. Antocianinas totales (mg/g mtra.) de los diferentes tratamientos del camote morado. Tomado de *Oki, et al., (2002) **Quispe, et al. (2006) ***Bridgers et al. (2010).

Los resultados de la literatura mostrados en la Gráfica 4 señalan que la tendencia es $CL > CTA > CF$ en la concentración de antocianinas totales, siendo similar a la reportada en esta investigación, expresando mayor contenido de antocianinas totales en el camote liofilizado, seguido por el camote con tratamiento ácido.

Los valores de antocianinas totales reportados en la literatura son inferiores a los obtenidos en este trabajo, esto puede deberse a varios factores: que se trate de una variedad diferente, región de cultivo, prácticas agrícolas, manejo postcosecha, grado de maduración, etc.

En base a los resultados obtenidos en esta etapa, el tratamiento elegido para la extracción de antocianinas de camote morado es el secado por liofilización, con este tratamiento se obtuvieron las concentraciones más altas del colorante, además se inactiva de manera significativa la polifenoloxidasas presente en el camote.

7.2 Etapa 2. Variables de extracción

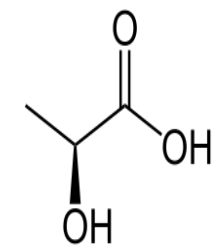
Ya que se determinó que el secado por liofilización es el tratamiento previo con el cual se obtienen los mayores rendimientos de colorante; en esta segunda etapa, se busca establecer la combinación de variables de extracción que permita obtener la mayor concentración de antocianinas totales del camote morado. Se estudiaron: el tipo de ácido, el efecto del disolvente, la proporción del disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la extracción asistida por enzimas.

Tipo de ácido

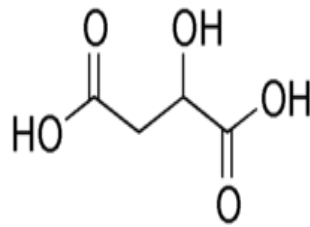
La primera variable que se estudió fue el tipo de ácido, ya que las antocianinas son estables a pHs bajos, los ácidos orgánicos que se analizaron en esta investigación fueron: láctico, tartárico y málico al 1%, mostrando los siguientes valores de pH en una solución metanol-agua (80:20):

Tabla 5. pH de los ácidos al 1% utilizados, y propiedades fisicoquímicas.

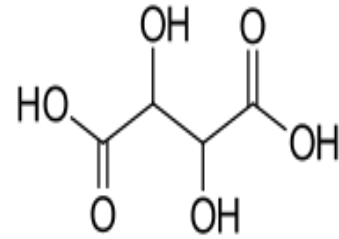
Ácido	pH	pka	Estado Físico	Solubilidad
Láctico	2.82 ± 0.01	3.86	Líquido	En agua y alcoholes
Tartárico	2.79 ± 0.008	3.03, 4.36	Sólido	En agua
Málico	2.55 ± 0.015	3.4, 5.1	Sólido	En agua y alcoholes



Ácido
láctico



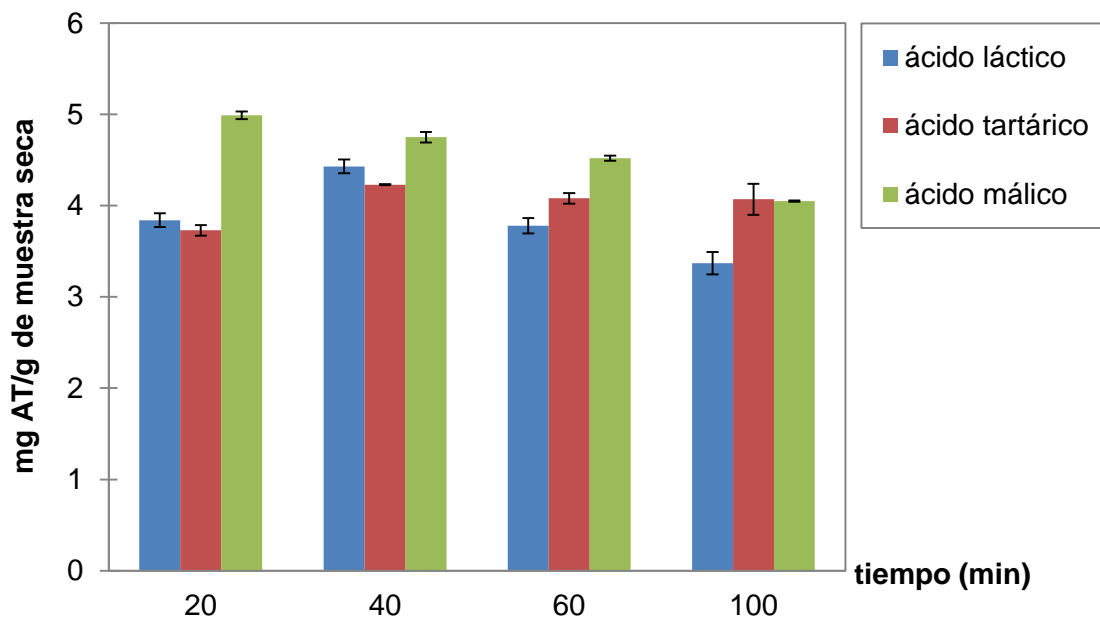
Ácido málico



Ácido
tartárico

Figura 20. Estructura de los ácidos utilizados.

En la siguiente Gráfica se muestran las concentraciones de antocianinas totales del camote morado, modificando los 3 ácidos mencionados al 1%, a diferentes intervalos de tiempo de sonicación (20, 40, 60 y 100 minutos) en una solución de metanol: agua (80:20):



Gráfica 5. mg AT/g de camote liofilizado, con diferentes ácidos e intervalos de tiempo.

En la Gráfica 5 se muestra que el ácido láctico tiene su máxima extracción a los 40 minutos de sonicación, tiempos más prolongados se observa una disminución de antocianinas.

A diferencia del ácido tartárico que presenta una tendencia creciente en donde conforme aumenta el tiempo de extracción, aumenta la concentración de antocianinas.

El ácido que reporta la mayor concentración de antocianinas totales al menor tiempo es el ácido málico. Alcanzando su máxima extracción a los 20 minutos.



Gráfica 6. mg AT/g de camote base seca, con diferentes ácidos. (Quispe, *et al.* 2006).

En la Gráfica 6 se presentan los resultados obtenidos por Quispe *et al.* 2006, quienes probaron tres ácidos: sulfúrico, fosfórico y cítrico. El ácido sulfúrico únicamente lo emplean como patrón ya que no es un ácido permitido en alimentos, reportando una mayor extracción con el ácido cítrico, ellos atribuyen esto, a que el cítrico es un ácido tricarboxílico, lo que origina un mayor aporte de

iones hidrogeniones al medio ocasionando una mayor estabilidad de las antocianinas al encontrarse en su forma estable (sal flavilio). (Quispe, *et al.* 2006). Este mismo fenómeno se relaciona a que el ácido málico haya extraído la mayor cantidad de antocianinas con respecto a los ácido estudiados ya que es un ácido que tiene en su estructura 2 ácidos carboxílicos (Figura 20), mientras que ácido láctico únicamente tiene un ácido carboxílico en su estructura, lo que origina que el ácido málico tenga un mayor aporte de iones hidrógeno al medio.

Por otro lado, el ácido tartárico también tiene en su estructura dos ácidos carboxílicos, pero como se ha reportado que las antocianinas del camote morado (Harada *et al.*, 2004) se encuentran aciladas, estas muestras mayor afinidad a moléculas menos polares en este caso entre el ácido málico y el ácido tartárico, el menos polar es el primero.

Otra explicación a que el ácido málico muestre los rendimientos más elevados de antocianinas totales al menor tiempo es que como se reporta en la Tabla 5, es el ácido en el medio de extracción utilizado (metanol-agua 80:20) que muestra un pH más bajo (pH=2.55), haciendo más estables a las antocianinas del camote morado.

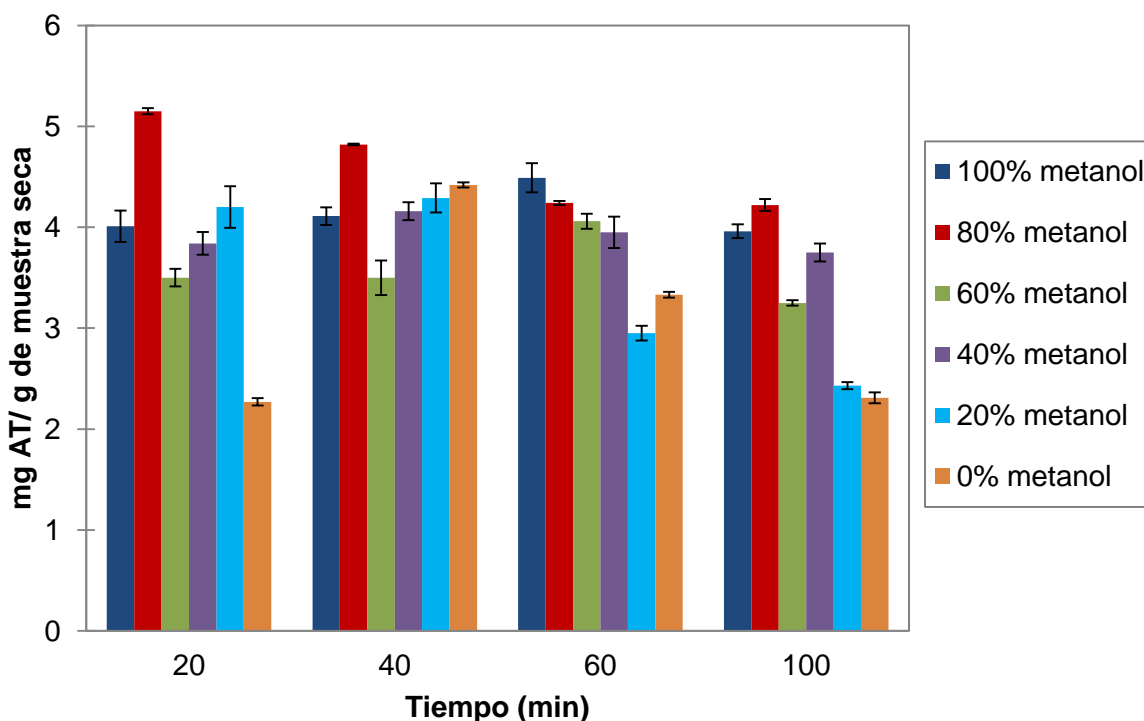
El ácido málico es el que muestra una mayor concentración de antocianinas con el menor tiempo de sonicación, por lo que es el ácido que se utilizó en las siguientes determinaciones.

El análisis de varianza muestra diferencia significativa con un nivel del 95% entre los ácidos (láctico, tartárico y málico), por lo que se hizo un análisis de rangos, revelando una diferencia del ácido málico con los otros dos ácidos (láctico y tartárico), entre el ácido láctico y el tartárico, no existe diferencia significativa, a los diferentes tiempos estudiados (20, 40, 60, 100 minutos).

Efecto del disolvente y proporción de disolvente

Una vez que se definió que al ácido málico como el reactivo que proporciona el mejor rendimiento de antocianinas, se estudió el efecto del disolvente; considerando que las antocianinas son solubles en compuestos polares los disolventes probados fueron: etanol, acetona y agua a diferentes proporciones (100, 80, 60, 40, 20 y 0%) y diferentes intervalos de tiempo (20, 40, 60, 100 minutos) de sonicación.

Se utilizó el metanol como disolvente control ya que se ha reportado que es el disolvente más utilizado para extraer antocianinas (Galicia, et al., 2008). Mostrando las siguientes concentraciones de antocianinas:



Gráfica 7. Antocianinas totales (mg AT/g) de camote morado liofilizado, a diferentes concentraciones de metanol-agua e intervalos de tiempo de sonicación.

En la Gráfica 7 se muestra que la mayor extracción de antocianinas totales del camote morado liofilizado se alcanza con una proporción de metanol al 80% con 20 minutos de sonicación, disminuyendo los valores de concentración de antocianinas cuando se prolonga el tiempo de sonicación.

Mientras que metanol al 100 y 60% presentan la misma tendencia al lograr la máxima extracción a los 60 minutos. Sin embargo metanol al 40, 20 y 0% su máxima extracción de antocianinas es a los 40 minutos, tiempos superiores señalan una disminución en la pérdida de los compuestos de interés.

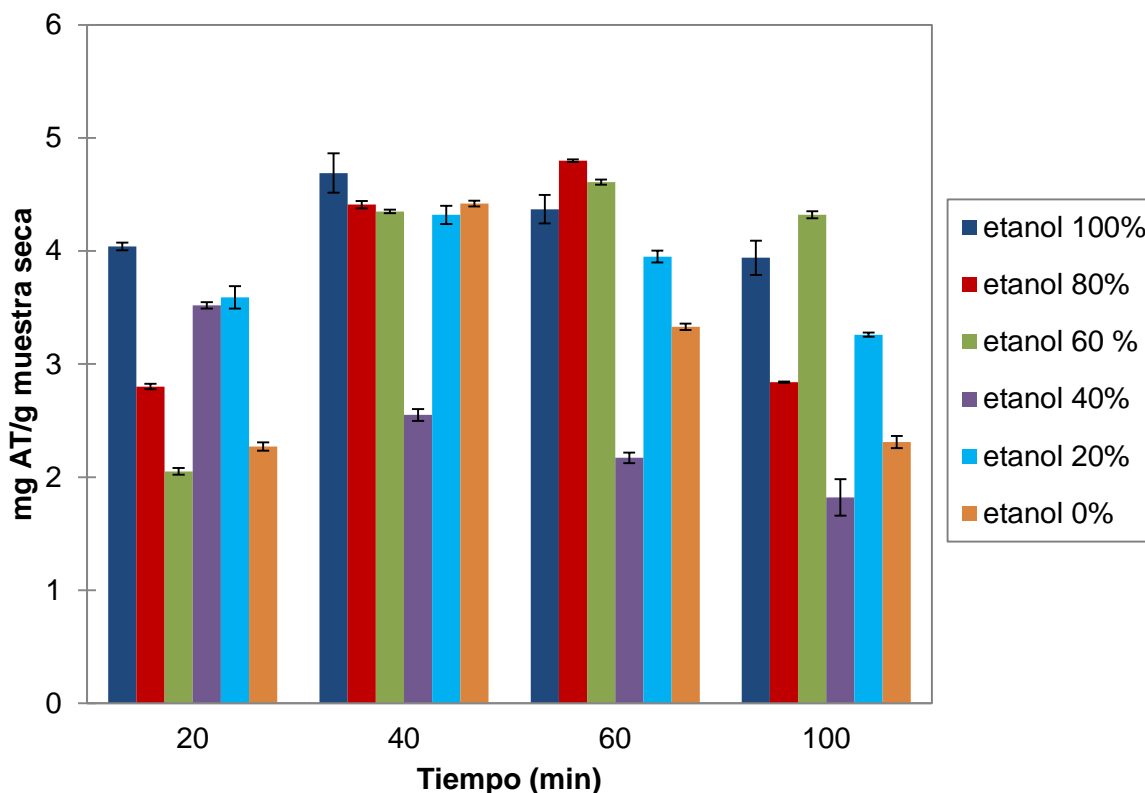
Existe diferencia estadística significativa a un nivel de confianza del 95% entre las diferentes concentraciones de metanol para extraer antocianinas del camote morado.

Con la diferencia de rangos se determina que las proporciones que muestran diferencia son: metanol al 100% y 80% con respecto a las demás proporciones de metanol: agua (60, 40, 20 y 0%).

Aunque no muestran diferencia significativa el 80% de metanol con el 100%, las tendencias con respecto al tiempo de sonicación son diferentes ya que en el caso particular del 100% de metanol, la máxima extracción de antocianinas la alcanza a los 60 minutos.

Por lo que el la proporción más adecuada para extraer antocianinas del camote morado es empleando metanol es al 80%.

El siguiente disolvente analizado, fue el etanol a diferentes proporciones (100, 80, 60, 40, 20 y 0%) a distintos intervalos de tiempo con 1% de ácido málico:



Gráfica 8. Antocianinas totales (mg AT/g) de camote morado liofilizado, a diferentes concentraciones de etanol -agua e intervalos de tiempo de sonicación.

En la Gráfica 8 se observa que la mayor extracción de antocianinas totales con etanol-agua del camote morado es alcanzada con una proporción de etanol- agua al 80% con 60 minutos de sonicación. Esta misma inclinación la presenta etanol al 60%.

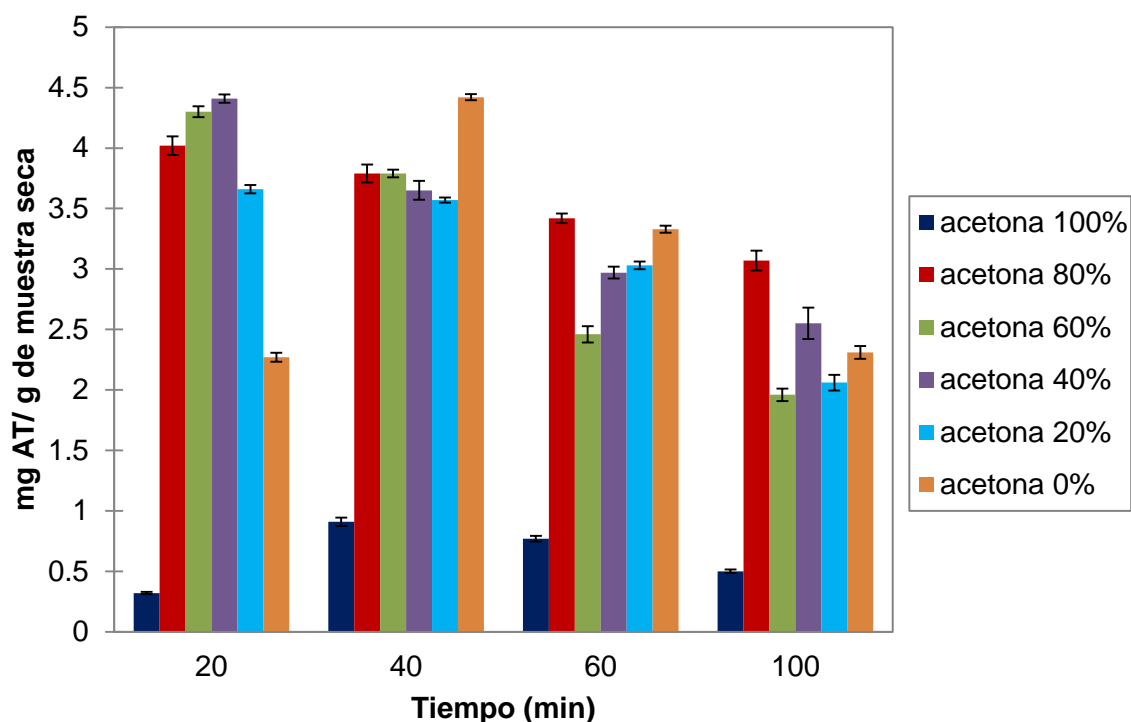
Sin embargo la tendencia de extracción con etanol al 100%, 20% y 0% es que la máxima extracción de antocianinas se presenta a los 40 minutos de sonicación, disminuyendo su concentración a tiempos más largos.

Existe diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95% entre las proporciones de etanol. Por lo que se realizó la prueba de rangos para saber

entre que concentraciones existían diferencias, mostrando que entre 100%, 80%, 60%, 20% y 0% de etanol no hay diferencias; existiendo únicamente diferencia con el etanol al 40%

Eligiéndose al etanol al 80% como la proporción que mayores rendimientos de antocianinas totales del camote morado con 1% de ácido málico reporta.

Otro disolvente estudiado es la acetona, esta se usó para extraer antocianinas, mezclada con agua diferentes proporciones (100, 80, 60, 40, 20 y 0%) y tiempos de sonicación (20, 40, 60 y 100 minutos):



Gráfica 9. Antocianinas totales (mg AT/g) de camote morado liofilizado, a diferentes concentraciones de acetona - agua e intervalos de tiempo de sonicación.

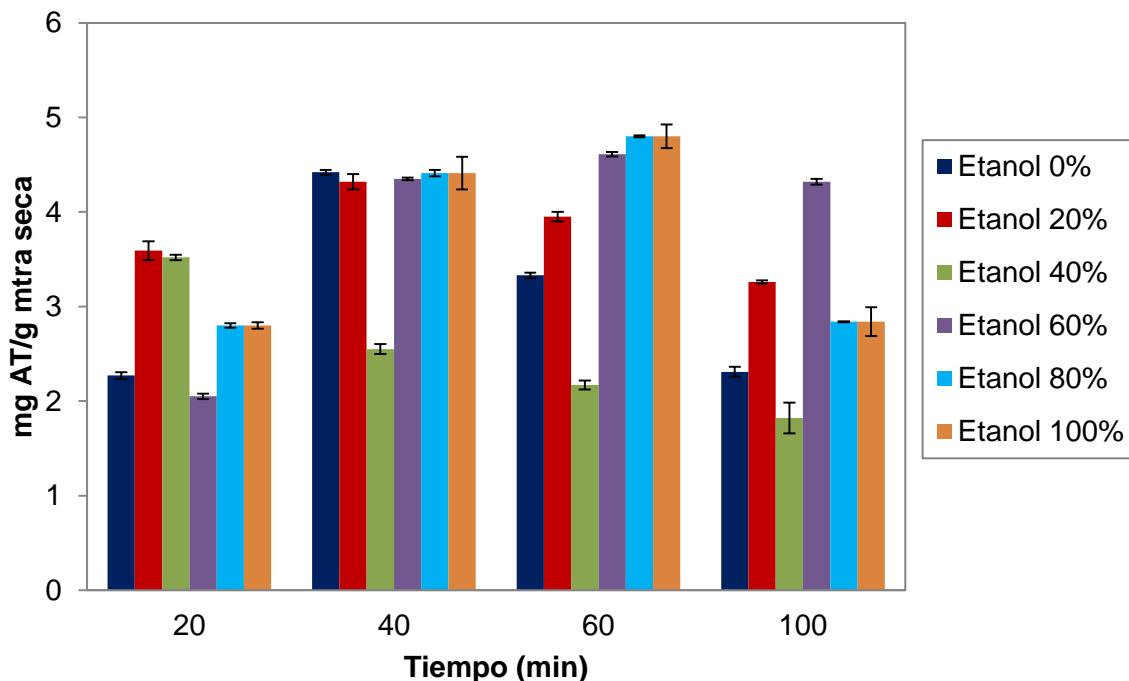
En la Gráfico 9 se observa que la máxima extracción de antocianinas se obtuvo con acetona al 40% a los 20 minutos de extracción, con esta mezcla de disolventes se observa que conforme aumenta el tiempo de extracción

(sonicación) hay una pérdida significativa de antocianinas. Mostrando la misma tendencia con acetona al 80, 60 y 20%. Acetona al 100 y 0% obtienen su máxima extracción a los 40 minutos

Existe diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95% entre de las proporciones de acetona. Reportándose en la prueba de rangos que 80,60, 40, 20 y 0% de acetona no hay diferencia, únicamente existe diferencia significativa con acetona al 100%.

Los resultados descritos anteriormente permitieron elegir a la acetona al 40% como la proporción que mejores rendimientos de antocianinas alcanza, ya que su máxima extracción la obtiene a los 20 minutos de extracción.

Por último se analizaron diferentes proporciones de una mezcla de agua-etanol (100, 80, 60, 40, 20 y 0%) a diferentes tiempos de sonicación (20, 40, 60 y 100 minutos) con 1% de ácido málico, mostrando los siguientes resultados:



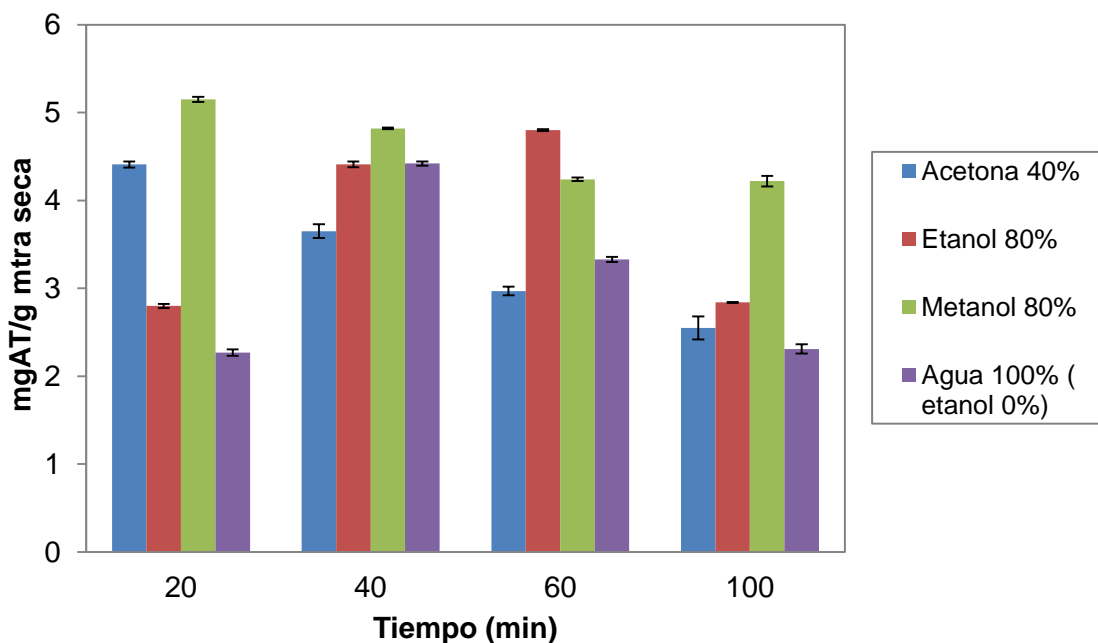
Gráfica 10. Antocianinas totales (mg AT/g) de camote morado liofilizado, a diferentes concentraciones de etanol e intervalos de tiempo de sonicación.

En esta Gráfica (10) se reporta la máxima extracción de antocianinas del camote morado con etanol al 0% es decir 100% agua, es con 40 minutos de sonicación a tiempo superiores marca un significativo decremento de la concentración de antocianinas.

Existe diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95%. Mostrando en la prueba de rangos que no existe diferencia estadística significativa con 20, 80 y 100% de etanol, solo hay diferencia de esta últimas proporciones con 0, 40, 60% de etanol.

Eligiéndose la concentración de 100% agua (0% etanol) como la concentración que extrajo más eficientemente a las antocianinas del camote morado al menor tiempo de extracción.

Para hacer la comparación entre los diferentes disolventes utilizados para la extracción de antocianinas totales, se eligieron las proporciones de cada mezcla de disolvente que presentaron mayor concentración de antocianinas que fueron: metanol al 80%, etanol al 80%, acetona al 40% y agua al 100%:



Gráfica 11. Antocianinas totales (mg AT/g) de camote morado liofilizado, con las mejores concentraciones de los disolventes analizados e intervalos de tiempo de sonicación.

Se observa en la Gráfica 11, que el metanol al 80% presenta los mayores rendimientos de antocianinas del camote morado con 20 minutos de extracción, sin embargo, como ya se mencionó anteriormente es un disolvente muy tóxico para ser empleado en alimentos.

El disolvente que le sigue en la cantidad de antocianinas totales que extrae es el etanol al 80%, pero este disolvente logra su máxima extracción a los 60 minutos.

Consecutivamente le sigue la acetona al 40% alcanzando su máxima extracción a los 20 minutos, con la misma tendencia de tiempos de extracción que el metanol, en donde se observa que ambos disolventes conforme aumentan los tiempos de extracción, disminuye la concentración de antocianinas totales.

El agua al 100% reporta su máximo valor de concentración de antocianinas a los 40 minutos, con valores muy similares a la acetona a 40% con un tiempo de sonicación de 20 minutos.

Entre estos disolventes, no existe diferencia estadística significativa con un intervalo de confianza del 95% para la extracción de antocianinas del camote morado.

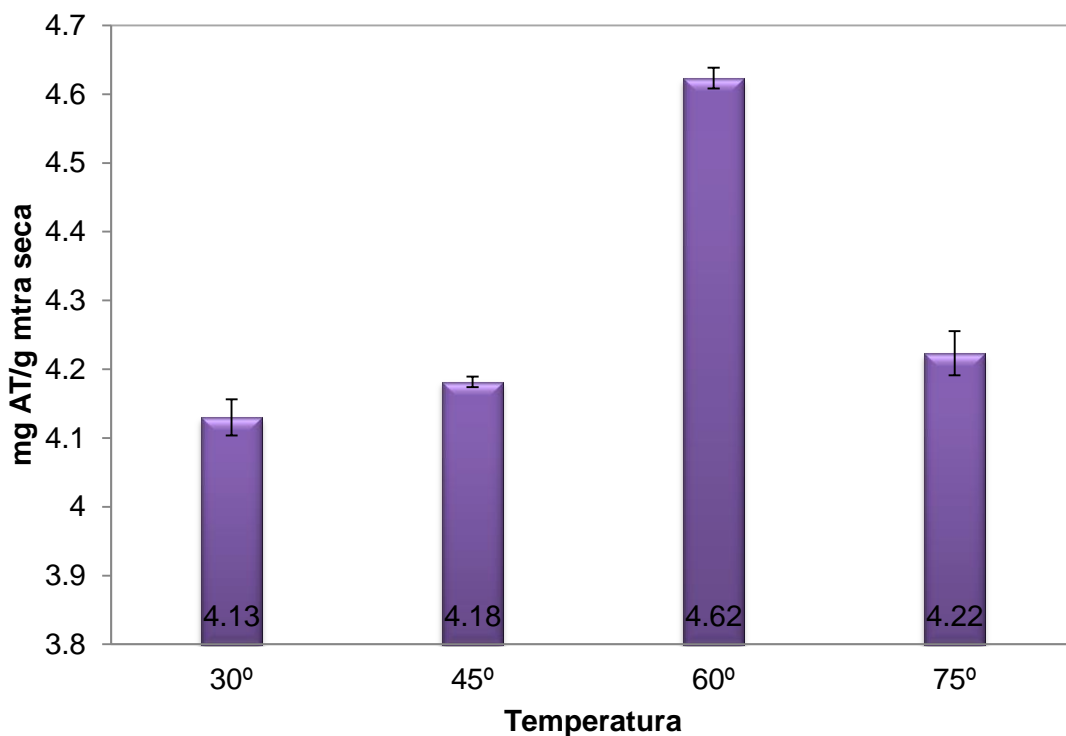
De los disolventes analizados permitidos en alimentos (etanol, acetona y agua) se elige a la acetona al 40% como el disolvente y la concentración de disolvente que más eficientemente extrajo las antocianinas ya que fue el que las extrajo al menor tiempo de sonicación.

La acetona al 40% es el disolvente que más rápidamente extrae las antocianinas del camote morado, debido a que la extracción se ve favorecida con disolvente con carácter polar bajo, ya que las antocianinas presentes en el camote morado se encuentran aciladas con ácidos cafeico, ferúlico, *p*-hidroxibenzoico (Terahara y Matzui. 2008) disminuyendo la polaridad de la molécula.

Efecto de la temperatura

Se sabe que las antocianinas del camote morado son termoestables, por lo que se evaluó el efecto de la temperatura a la cual se realiza la extracción.

Una vez definido el ácido, el disolvente, la proporción de disolvente y el tiempo de sonicación que más eficazmente extrajo a las antocianinas del camote morado, se probaron diferentes intervalos de temperatura (30, 45, 60, 75°C).



Gráfica12. Antocianinas totales (mg AT/g) de camote morado liofilizado, a diferentes intervalos de temperatura.

En la Gráfica 12 se observa que conforme aumenta la temperatura, la concentración de antocianinas aumenta hasta llegar a los 60° C.

El que aumente esta concentración de antocianinas del camote morado, se debe a que el incremento de la temperatura produce una disminución de la viscosidad, favoreciendo la difusión de la masa dentro de la matriz vegetal, es decir ayudando a la difusión de las antocianinas a la solución.

A temperaturas superiores a los 60°C, con las condiciones de extracción anteriormente seleccionadas en esta investigación, se produce una pérdida en los rendimientos, ya que las antocianinas del camote morado, comienzan a degradarse. Por lo que la temperatura óptima de extracción es a 60°C.

Existe diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95 % entre los 4 intervalos de temperatura. En el análisis de rangos se observó que la diferencia existe entre la temperatura de 60°C con la de 75, 45 y 30°C.

Esta no fue la temperatura óptima reportada en investigaciones previas (Bridgers, *et al.*, 2010) Gráfica 13, ya que ellos dicen que la mayor extracción de antocianinas del camote morado es a los 80°C, sin embargo, las condiciones de extracción son utilizando 7% de ácido acético, con metanol y etanol al 70%, usando una relación masa volumen del 17%, agitando a 80 rpm durante una hora, por lo que probablemente la elevada concentración de ácido protege más a las antocianinas del camote morado, soportando temperaturas de extracción 20° C más elevadas.

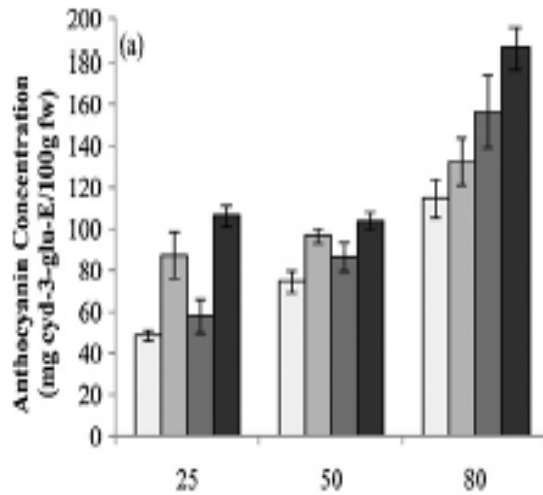
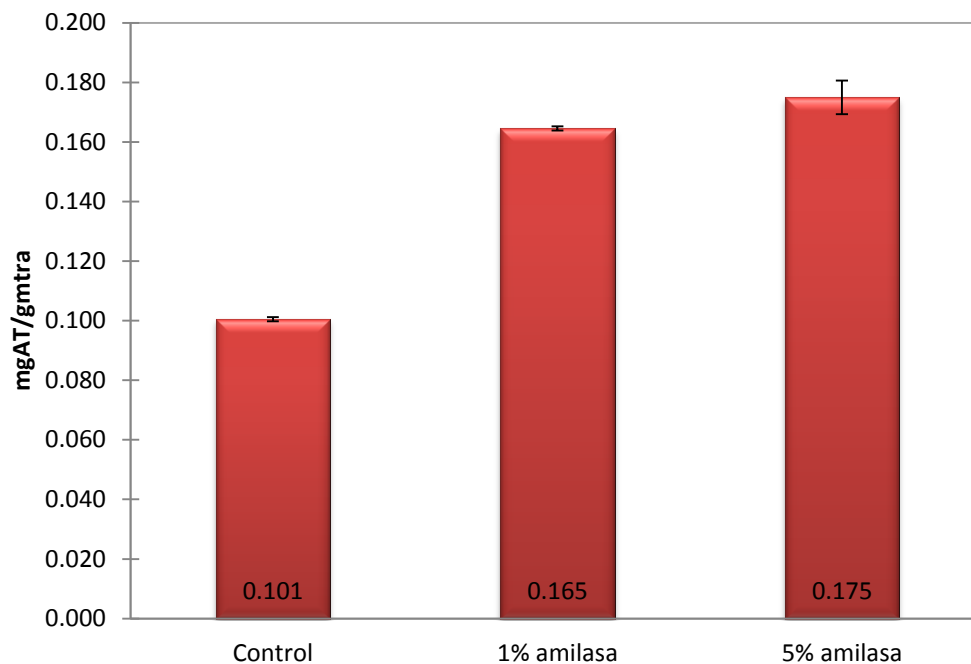


Gráfico 13. Antocianinas totales (mg AT/g) de camote morado liofilizado, a diferentes intervalos de temperatura. Tomado de Bridgers, *et al.* 2010.

Enzimas

Después de las extracciones, el residuo sólido presentaba una coloración rosada, por lo que se realizó una extracción asistida por amilasas, ya que el camote esta compuesto por un 70% de almidón en base seca, y así extraer una mayor cantidad de antocianinas.

Se utilizó una concentración de enzima del 1% y 5%, y un control (sin enzima) que el residuo sólido sin enzima. Mostrando los siguientes resultados:



Gráfica 14. Antocianinas totales (mg AT/g) de residuo sólido de camote morado liofilizado, con diferentes concentraciones de enzima.

Se muestra diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95% entre las dos concentraciones de enzima y el blanco.

La Gráfica 14 muestra que con 1% de amilasa en el residuo sólido aumenta un 63.4% de concentración de antocianinas totales y con un 5% de amilasa aumenta un 73.3% de concentración de antocianinas totales, con respecto al control que no tiene amilasa.

Constituyendo el 3.9% y 4.2% más, respectivamente, sobre la concentración de antocianinas extraídas de la parte acuosa, es decir sobre la extracción total (parte acuosa más residuo sólido de la parte acuosa).

Este incremento de la concentración antocianinas en el residuo sólido, se debe a que la amilasa al hidrolizar el almidón, permite que las antocianinas que pudieran estar atrapadas dentro de esta estructura, queden liberadas. Por lo que el

adicionales el 5% de amilasa al residuo sólido de la extracción del camote morado incrementa representativamente la concentración de antocianinas totales.

Variables seleccionadas de extracción:

En esta segunda etapa se seleccionaron las siguientes variables de extracción:

- Ácido málico al 1%
- Un relación acetona-agua (40-60)
- 20 minutos de sonicación
- 60°C de temperatura de extracción
- Adición del 5% de amilasa al residuo sólido

7.3 Etapa 3. Identificación parcial de las antocianinas

Debido a que la extracción de antocianinas del camote morado se vio favorecida por soluciones de carácter polar bajo (ácido y disolvente) y temperaturas elevadas, se concluyó que dichas antocianinas se encuentran aciladas siendo más termoestables; por lo que para corroborar esta aseveración se realizó una identificación parcial.

La identificación parcial del perfil de antocianinas del camote morado se realizó utilizando la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Donde el extracto de camote morado concentrado extraído con 1% de ácido málico, con acetona-agua (40-60), 20 minutos de sonicación a 60°C, fue llevado a un pH de 1.8 para mejorar la resolución del espectro, obteniendo el siguiente resultado:

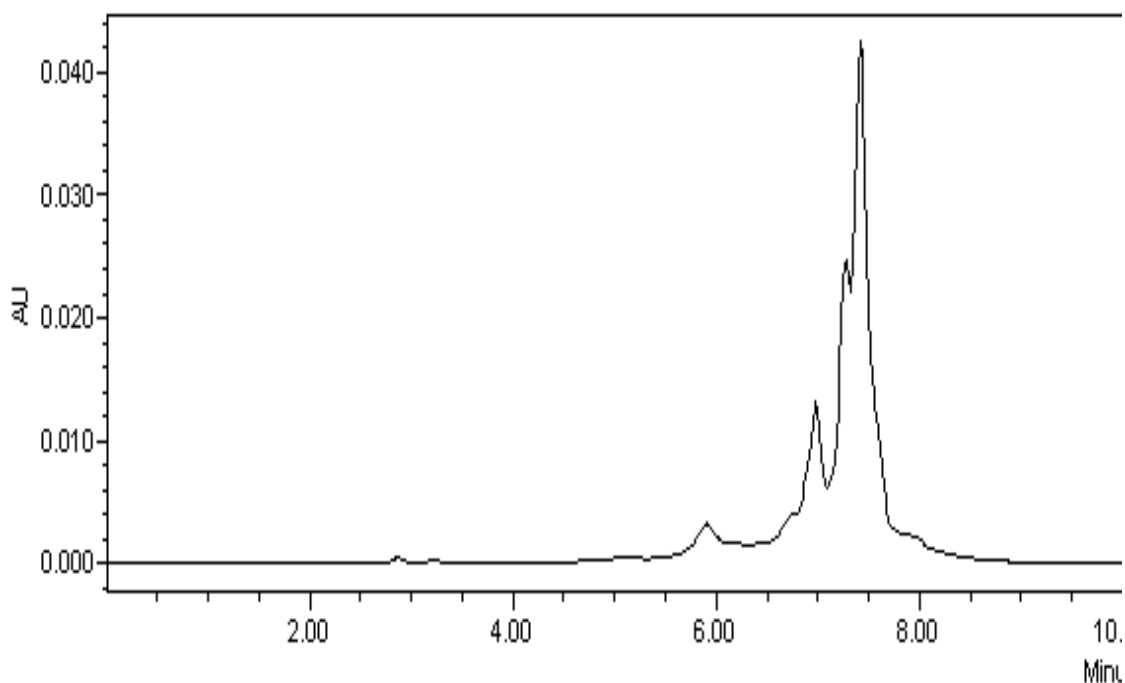


Figura 21. Cromatograma del perfil de antocianinas del extracto de camote morado.

Como se muestra en la Figura 21 el cromatograma no tiene las señales bien definidas, ya que solo se alcanzan a identificar 3 picos unidos entre sí, imposibilitando la identificación correcta de las señales correspondientes a cada antocianina presente en el extracto de camote morado.

Por lo que fue necesario realizar una purificación previa a la identificación cromatográfica, utilizando una columna de fase reversa con Amberlita, modificando el gradiente de elución (metanol-agua) y la concentración de ácido, concentrando las fracciones recolectadas y llevándolas a un pH de 1.8, obteniendo el siguiente cromatograma:

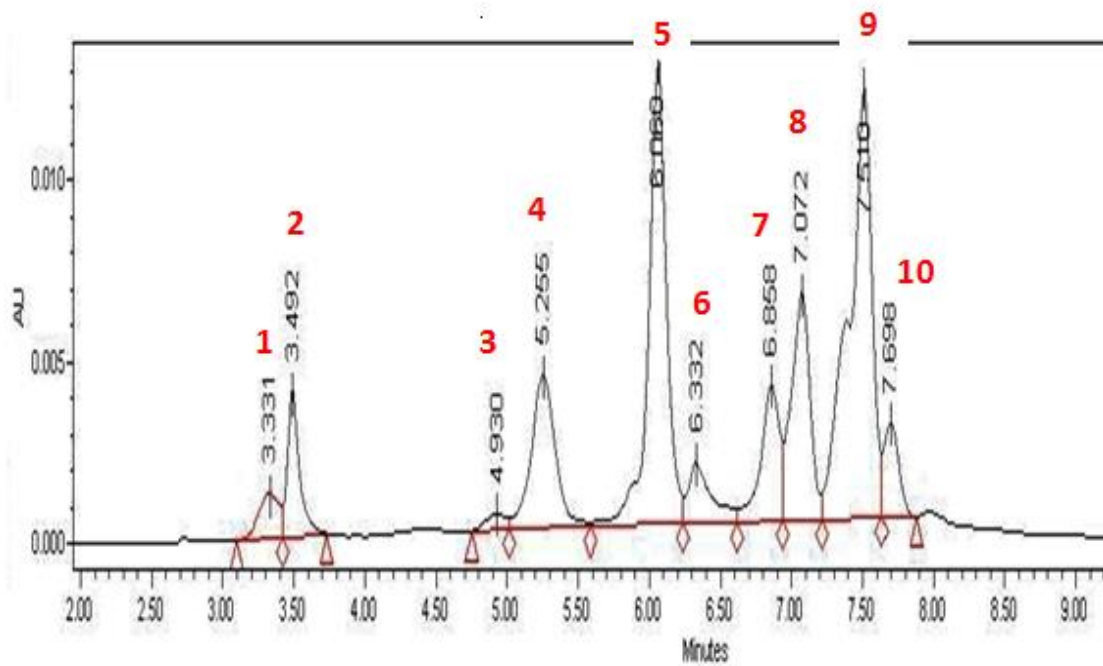


Figura 22. Cromatograma del perfil de antocianinas del extracto de camote morado después de ser purificado.

En la Figura 22 se observa que con la purificación previa se logra una mayor resolución de los picos, identificándose 10 señales en HPLC.

La identificación de las señales de las antocianinas del camote morado fue realizada comparándose con la investigación de Jie L., *et al.*, 2012, quienes presentan un perfil similar de antocianinas del camote morado.

Las 10 señales identificadas en HPLC del extracto de camote morado corresponden a las siguientes antocianinas:

Tabla 6. Antocianinas identificadas del camote morado.

Pico	Antocianina
1	Cianidina 3-soforosido-5-glucosido
2	Peonidina 3-soforosido-5-glucosido
3	Cianidina 3- <i>p</i> -hidroxibenzoilsoforosido -5-glucosido
4	Peonidina 3- <i>p</i> -hidroxibenzoilsoforosido-5-glucosido
5	Cianidina 3-(6''-feruloil soforosido)-5- glucosido
6	Peonidina 3-(6''-feruloil soforosido)-5- glucosido
7	Cianidina-3-cafeoil- <i>p</i> -hidroxibenzoil soforosido-5-glucósido
8	Cianidina-3-(6''-cafeoil-6'''-feruloil soforosido)-5-glucosido
9	Peonidina-3-cafeoil soforosido-5-glucosido
10	Peonidina-3-cafeoil- <i>p</i> -hidroxibenzoil soforosido -5-glucosido

En la Tabla 6 se señalan las antocianinas correspondientes a cada pico del perfil de antocianinas del camote morado (Figura 22), en donde se observa que de las 10 señales identificadas, 8 de ellas corresponden a antocianinas mono-aciladas y di-aciladas con ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, *p*-hidroxibenzoico) coincidiendo con lo reportado también por Jie, et., al. 2012.

Esto explica por qué las antocianinas del camote morado resisten temperaturas superiores a la temperatura ambiente, ya que se sabe que las antocianinas al estar aciladas soportan condiciones de temperatura y pH extremas.

7.4 Etapa 4. Aplicación a alimentos

Una vez que se determinó que las antocianinas del camote morado son termoestables se elaboró un lote de 2000 mL de extracto con las variables previamente seleccionadas, para ser aplicado a alimentos con diferentes temperaturas de proceso (caramelo, manteca de cacao, malvavisco).

Tabla 7. Concentración de antocianinas en el extracto para aplicar a alimentos.

Cantidad de extracto	mg AT/g de camote	mg AT/g de extracto concentrado
2000 mL	4.42± 0.020	7.21± 0.034



Figura 23. Extracto de camote morado

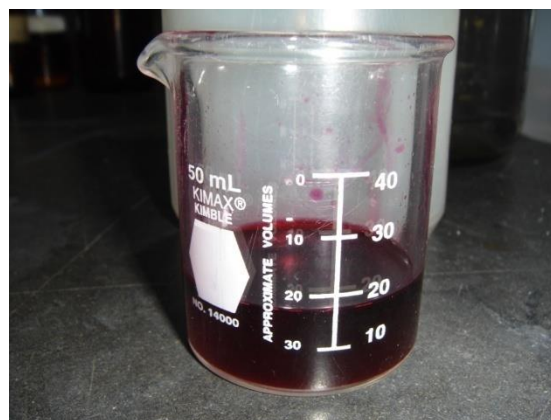


Figura 24. Extracto de camote morado concentrado

Caramelo

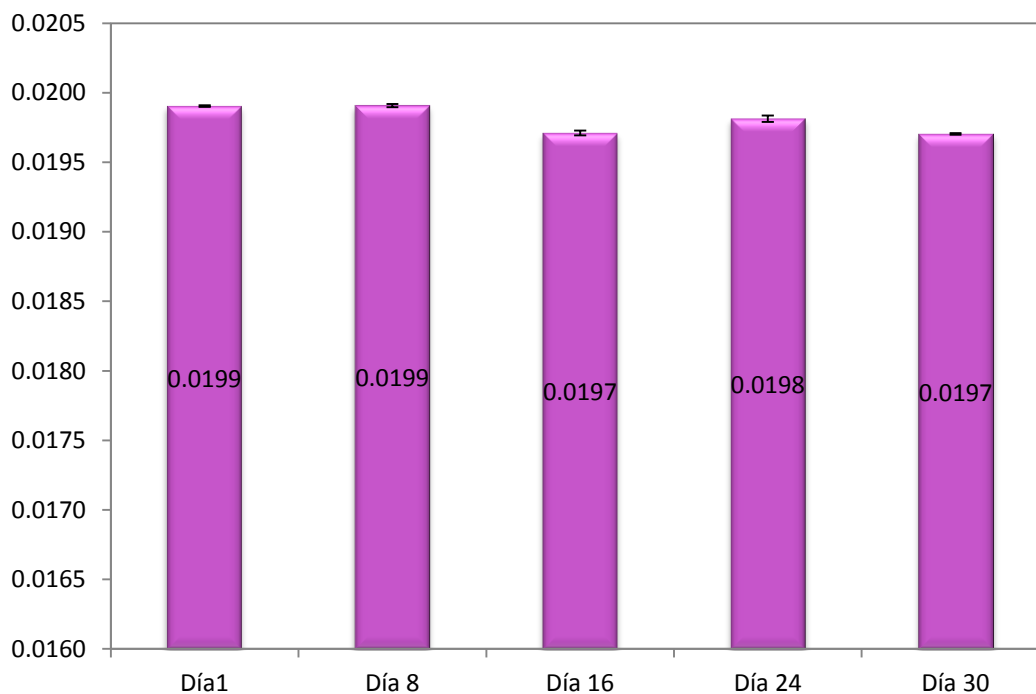
Al primer alimento que se le aplicó el colorante fue al caramelo, ya que para elaborar este confite se emplean de las temperaturas más elevadas de proceso que existe en alimentos.

Se aplicaron 0.13g (0.93mg AT) de extracto de camote morado (biocolorante) a 250g de caramelo a una temperatura de 160°C, aproximadamente. Visualmente no se observa una disminución en la coloración adquirida por el caramelo una vez aplicado el biocolorante (Figura 25), obteniendo una concentración final de 0.0199 mg AT/g de caramelo.



Figura 25. Caramelo con biocolorante de camote morado.

Para determinar si el caramelo presentaba una pérdida gradual de las antocianinas con respecto al tiempo, se realizaron mediciones semanalmente, almacenando el caramelo a temperatura ambiente (23°C). Los resultados de estas mediciones se presentan en la Gráfica 14.



Gráfica 14. mg AT/g de caramelo a través del tiempo.

Al realizar el análisis estadístico correspondiente (ANOVA), no se encontró diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% entre las seis mediciones realizadas a lo largo de 30 días, almacenando el caramelo bajo condiciones de laboratorio.

Manteca de cacao

El biocolorante de camote morado, también fue aplicado a 200g de manteca de cacao, ya que dicho confite tiene una matriz compleja al estar compuesta principalmente por triglicéridos. La manteca de cacao fue fundida completamente a una temperatura de baño de agua de aproximadamente de 55-60°C, aplicándose en ese momento 0.13g (0.93 mg AT) de biocolorante de camote morado. Obteniendo una concentración final de antocianinas totales de 0.017mg AT/ g de manteca de cacao.



Figura 26. Manteca de cacao con biocolorante del camote morado.

Malvavisco

Por último el colorante natural se aplicó al malvavisco, siendo de los confites analizados el que se procesa a una temperatura más baja. Se colocaron 0.13g (0.93 mg AT) de biocolorante de camote morado a 200g de malvavisco, obteniendo una concentración final de antocianinas totales de 0.20 mg AT/ g de malvavisco. El biocolorante se agregó, un vez que todos los ingredientes estaban mezclados y ya que la base estaba aireada, se estima que la temperatura a la que se aplicó el biocolorante fue de aproximadamente 35°C.



Figura 27. Malvavisco con biocolorante del camote morado.

En base a los resultados experimentales obtenidos, se observa que ninguno de los alimentos a los que se aplicó el biocolorante de camote morado presenta pérdidas significativas del color.

Y aunque a los tres confites se les agregaron la misma cantidad de biocolorante, la concentración de antocianinas presentes en el producto final no fue la misma; el análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa en la manteca de cacao con respecto a los otros dos confites (caramelo y malvavisco), teniendo una cantidad inferior de antocianinas finales.

El que la manteca de cacao sea el alimento que menos antocianinas presentó, se debe a que la medición fue obstaculizada por la cantidad de triglicéridos que contiene, y a pesar de que fue sometido a varias extracciones para eliminar dichos triglicéridos, no fue posible separarla en su totalidad. Descartando la posibilidad de que la pérdida se deba a una degradación de las antocianinas, ya que el caramelo fue elaborado a una temperatura tres veces superior a la de la manteca de cacao.

Otro punto relevante a considerar, es que una vez que el biocolorante es aplicado a la temperatura de proceso del alimento este no se degrada con el tiempo como se observó en el caso del caramelo.

8. CONCLUSIONES

El pre tratamiento para el camote morado que presentó la mayor concentración de antocianinas fue el secado por liofilización, deteniendo el pardeamiento enzimático, con una inactivación de la polifenoloxidasasa del 74.4%.

De las variables de extracción analizadas en esta investigación, se seleccionaron:

- El ácido málico al 1%, ya que se obtuvo la concentración más elevada de antocianinas con el menor tiempo de sonicación.
- De los disolventes permitidos en alimentos, la mezcla acetona-agua (40:60) se observó que extrajo las antocianinas con una mayor eficiencia.
- En estas condiciones (ácido, disolvente y proporción de disolvente) se alcanzó el punto máximo de extracción a los 20 minutos de sonicación.
- La temperatura óptima de extracción de antocianinas fue a 60°C, reportándose pérdidas de colorante a temperaturas superiores.
- El aplicar 5% de amilasa al residuo sólido de la extracción acuosa del camote morado se incrementó un 4.2% el contenido de antocianinas totales.

Obteniéndose una concentración de colorante de 4.42 ± 0.02 mg AT/g camote liofilizado.

En base a los tiempos de retención se identificaron parcialmente en el camote morado 10 antocianinas en el camote morado, de las cuales 8 de ellas son aciladas (Cianidina 3-*p*-hidroxibenzoil soforosido -5-glucosido, peonidina 3-*p*-hidroxibenzoil soforosido-5-glucosido, cianidina 3-(6''-feruloil soforosido)-5-glucósido, peonidina 3-(6''-feruloil soforosido)-5- glucósido, cianidina-3-cafeoil-*p*-hidroxibenzoil soforosido-5- glucósido, cianidina-3-(6''-cafeoil-6''-feruloilsoforosido)-5-glucosido, peonidina-3-cafeoil soforosido-5-glucosido, peonidina-3-cafeoil-*p*-hidroxibenzoil soforosido -5 glucosido); esto hace que el colorante de origen natural sea altamente estable, soportando temperaturas elevadas.

Una vez que se determinó el efecto de las variables de extracción y se obtuvieron las condiciones bajo las cuales se obtiene la mayor concentración de antocianinas (1% de ácido málico, con una relación acetona- agua (40-60), 20 minutos de sonicación a 60°C, y 5% de amilasa); el colorante se aplicó satisfactoriamente en la preparación de diversos alimentos como: caramelos, manteca de cacao y malvaviscos, sin mostrar una degradación de color, esto confirma que el colorante es altamente estable, brindándole un gran potencial para ser aplicado a alimentos cuyo proceso de elaboración involucra elevadas temperaturas, sustituyendo así a los colorantes artificiales.

9. REFERENCIAS

- Actividad acuosa y su relación con la estabilidad de los alimentos. (En línea). Disponible en:
<http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r45967.PDF>
último acceso: 22-01-2013.
- Agrícola. Utilización de la yuca y el camote en la alimentación humana. (En línea). Disponible en: <http://bagricola.blogspot.mx/2012/01/utilizacion-de-la-yuca-y-camote-en-la.html>. Último acceso: 12-10-2012.
- Albán, Figueroa. 2011. Proceso de obtención de harina de camote.
- Arizio C., Manifiesto M., Martí H. 2008. Análisis de caracteres relacionados con el color de la raíz engrosada en un cruzamiento de dos clones de *Ipomoea batatas* L. (Lam.). Segregación de caracteres relacionados con el color de la raíz engrosada. Horticultura Argentina. 28 (65), 5-13.
- Badui S. 2006. Pigmentos. En: I. Guerrero, E. López, R. Armenta. Eds. Química de los alimentos. México. Editorial Pearson. 420-424.
- Bioquímica de los alimentos. Tirosinasa. (En línea). Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/enzimas/tirosinasa.html>. Último acceso el 19-11-2012.
- Bolivar A. Cevallos C., Cisneros L. 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. Food Chemistry. Vol. 86, 69–77.
- Bridgers N, Chinn M., Truong V. 2010. Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweet potatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. Industrial Crops and Products. 32, 613–620.
- Cázares J., Centurión D., Espinosa J., Mijangos M., Poot J. 2002. Rescate e identificación de raíces y tubérculos tropicales su explotados del Estado de Tabasco, México. Etnobiología. 2, 59-73.
- CIP. Centro internacional de la papa. 2010. Datos y cifras sobre el camote.

- Chacon A., Reyes Y. 2009. Efecto del empaque sobre la textura y el color del camote (*Ipomoea batatas* L.) durante proceso de “curado”. *Agronomía Mesoamericana*. 20, 1, 47-57.
- Chew, K. K., Ng, S. Y., Thoo, Y. Y., Khoo, M. Z., Wan A., W. M., Ho, C. W. 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. *International Food Research Journal*. Vol.18, 571-578.
- Copyright © 2012 Cancer.Vg .Las hojas de la Batata Morada. (En línea). Disponible en: <http://cancer.vg/es/plantas-medicinales/cancer-batata-camote>. último acceso el 20-05-2012.
- Corrales M., S. Toepfl, Butz P., Knorr D., Tauscher B. 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonic, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Vol. 9, 85-91.
- Cuevas E., Hillebrand S., Butschbach D., Baldermann S., Watanabe N., Winterhalter P. 2010. Preparative Isolation of Anthocyanins from Japanese Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Varieties by High-Speed-Countercurrent Chromatography. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. Vol.58, 9899–9904.
- De Pascual S., Moreno D., García C., 2010. Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 1679-1703.
- De Pascual S., Sánchez M. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*. 7, 281–299.
- Diversidad Natural. Los Campeones del Camote. (En Línea). Disponible en: <http://diversidadnatural.blogspot.mx/2010/05/las-2-000-variedades-de-camotes-en-el.html>. Último acceso: 14-10-2012.
- Drago M., López M., Sainz T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Vol. 33, 004, 58-68.

- Fan G, Han Y, Zhenxin Gu, Feirong Gu. 2007. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, People's Republic of China. 1412-1416.
- Fan G., Han Y., Gu Z, Chen D.2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology. LWT - Food Science and Technology. Vol. 41, 155-160.
- Fennema. 2008. Colorantes. En: S. Schwartz, J. H. von Elbe y M. Giusti. Eds. Química de los alimentos. Zaragoza. Editorial Acribia, 599-610, 618-630.
- Fichas técnicas. Camote (*Ipomoea batatas*). (En línea). Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/CAMOTE.HTM. Último acceso el 04-09-2012.
- Figueroa R., Tamayo J., González S., Moreno G., Vargas L. 2011. Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cascara de pitahaya (*Hylocereus undatus*). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. Vol. 12, 1. 44-50.
- Galicia L., Salinas Y., Espinoza B., Sánchez C. 2008. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscussabdariffa* L.) nacional e importada. Revista Chapingo. Serie Horticultura.Vol.14, 121-129.
- García C., Giraldo G., Hurtado H., Mendivil C. 2006. Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano *Gros Michel* en diferentes estados de maduración. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín. Colombia. Vol. 13,13-19.
- Garzón A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Acta Biológica Colombiana. Vol. 13, 27 – 36.
- Gasull E., Becerra D. 2006. Caracterización de Polifenoloxidasa Extraída de Pera (cv. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious). Información Tecnológica. Vol. 17, 6-2006, 69-74.

- Gispert M., Álvarez A. 1998. Del Jardín de América al mundo. México. Editorial Miguel Ángel Porrúa. 49-52.
- Goda Y., Shimizu T., Kato Y., Nakamura M., Maitani T., Yamada T., Terahara N., Yamaguchi M. 1997. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. *Phytochemistry*. Vol. 44, 1, 183-186.
- Gómez R., Martínez G., Aguilar C. 2012. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues. *3 Biotech*, 2,297–300.
- González O., Hernández M., Silva J., Espinosa A., Ros C. 2005. biotecnológicas aplicadas al cultivo del boniato *Ipomoea batatas* (L.) lam. y su relación con la conservación de la biodiversidad. Cuadernos de biodiversidad. 9-13.
- Guerrero C. 2009. Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (*cavendish valery*) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido. Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 15-25.
- Harada K., Kano M., Takayanagi T., Yamakawa O. Ishikawa F. 2004. Absorption of acylated Anthocyanin's in rats and humans after ingesting an extract of *Ipomoea batatas* purple sweet potato tuber. *Biosci Biotechnol Biochem*. Vol. 68, 7, 1500-1507.
- Huaman Z. 1992. Botánica sistemática y morfología de la planta de batata o camote. *Boletín de Información Técnica*. 25, 1-23.
- Ishiguro K., Yahara S., Yoshimoto M. 2007. Changes in Polyphenolic Content and Radical-Scavenging Activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during Storage at Optimal and Low Temperatures. *Journal Agricultural Food Chemistry* Vol. 55, 10773–10778.
- Jiao Y., Jiang Y., Zhai W., Yang Z. 2012. Studies on antioxidant capacity of anthocyanin extract from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *African Journal of Biotechnology*. Vol. 11, 27, 7046-7054.

- Jie L., Xiao-ding L., Yun Z., Zheng-dong Z, Zhi-ya Q., Meng L., Shao-hua Z., Shuo L., Meng W., Lu Q. 2012. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. *Food Chemistry*, 1-26.
- Jung J., Lee S., Kozukue N., Levin C., Friedman M. 2011. Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 24, 29–37.
- Kim H. , Kim J., Cho S., Chung m., Lee Y., Chu S., Che J., Kim S., Kim S., Cho Y., Kim J., Park H., Lee D. 2012. Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. *Food Chemistry*. Vol. 130, 966-972.
- La Buena Vida Gourmet de Maren. Camote, Batata. (En línea). Disponible en: <http://labuenavidagourmetdemaren.blogspot.mx/2010/09/camote-batata.html> . Último acceso: 12-10-2012.
- Lardizabal R. 2007. Manual de producción el cultivo del camote. MCA-Honduras / EDA. Entrenamiento y Desarrollo de Agricultores. 1-26.
- Laroze L., Soto C., Zúñiga M. 2010. Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 13, 6, 1-6.
- Leyva E. 2009. Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Para obtener el título de Ingeniero en alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. 9-11.
- Liazid A., Guerrero R., Cantos E., Palma M., Barroso C. 2011. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*. Vol. 124, 1238–1243.
- Linares E., Bye R., Rosa D., Pereda R. 2008. El camote. *Biodiversitas*. 81. 11-15.
- López A., García M., Quintero R. 2004. Colorantes. En: García F., Tafoya A., Eds. *Biología Alimentaria*. Mexico. Editorial Limusa. 510-511.

- Lugo J., Jaramillo M. 2001. Identificación y cuantificación de los carotenoides presentes en camote amarillo (*Ipomoea batatas*) durante el almacenamiento. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica.
- Macías C., Cobeña G., Álvarez H., Castro L., Cárdenas F. 2011. Caracterización agronómica de germoplasma de camote (*Ipomoea batatas* L.) en Manabí. *Espam Ciencia*. 2, 2, 37-43.
- Muñoz O., Schwartz M., Loyola E. 2003. Antocianos, colorantes naturales de aplicación industrial. *Revista Fitoterapia*. Vol. 3, 2, 147-152.
- Oki T., Masuda M., Furuta S., Nishiba Y., Terahara N., Suda I. 2002. Involvement of Anthocyanins and other Phenolic Compounds in Radical-Scavenging Activity of Purple-Fleshed Sweet Potato Cultivars. *Journal of Food Science*. Vol. 67, 5, 1752-1756.
- Piñeiro Z.; Puertas B.; Cantos E., Puértolas E.; Álvarez I.; Raso J. 2012. Aplicación de pulsos eléctricos para la mejora de la calidad de los vinos cabernet sauvignon. Comparación con la criomaceración. *Revista "Enólogos"*. Año XIV – No. 76, 44-50.
- Quispe M., Betalleluz I., Chirinos R. 2006. Estudio de la extracción de antocianinas en camote de pulpa morada (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Anales científicos UNALM*. 140-156.
- Quispe M., Betalleluz I., Chirinos R. 2006. Estudio de la estabilidad de las antocianinas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) *Anales científicos UNALM*. 157-173.
- Raíces- Raíz Tuberosa. (En línea). Disponible en: <http://biologia.laguia2000.com/botanica/raices-raiz-tuberosa>. último acceso: 17-01-2013.
- Rawson A., Patras A., Tiwari B., Noci F., Koutchma T., Brunton N. 2011. Effect of thermal and non-thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*. Vol. 44, 1875–1887.

- Sánchez J., De Miguel C., Ramírez M., Delgado J., Franco M., Martín D., 2012. Efecto de las altas presiones hidrostáticas respecto a la pasteurización térmica en los aspectos microbiológicos, sensoriales y estabilidad oxidativa de un paté de aceituna. *Grasas y Aceites*. Vol. 63, 1, 100-108.
- Scott G., Rosegrant M., Ringler C. 2000. Raíces y Tubérculos para el Siglo 21. Tendencias, proyecciones y opciones de política. Centro Internacional de la Papa. Apartado 1558. 1-46.
- Song J., Li D., Liu C., Zhang Y. 2011. Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12, 282–287.
- Takayuki S., Kananzawa K., Shahidi F., Chi-tang H. 2008. Functional Food and Health. American Chemical Society, Washinton, Dc. 90-101.
- Terahara N., Matsui T. 2008. Structures and Funcionalities of Acylated Anthocyanins. American Chemical Society. Capter 9, 90-101.
- Tian Q., Konczak I., Schwartz S. 2005. Probing Anthocyanin Profiles in Purple Sweet Potato Cell Line (*Ipomoea batatas* L. Cv. Ayamurasaki) by High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 53, 6503-6509.
- Tiwari B., O'Donnell C., Cullen P. 2009. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*. 93, 166–171.
- Toledo T., Nagem T., Rocha M., Marciano L., Magalhães N., Stringheta P., Queiroga E., Kling de G., Da Silva H. 2004. Propiedades biológicas de los tintes naturales. *Biological properties of natural dyes*. *Ars Pharmaceutica*. 45, 1, 5-20.
- Truong V., Nigel D., Thompson R., MCFeeterS R., Dean L., Pecota K, Yencho C. 2010. Characterization of Anthocyanins and Anthocyanidins in Purple-Fleshed Sweet potatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 58, 404–410.

- Utomo J., Che Man Y., Rahman R., Said Saad M. 2008. The effect of shape, blanching methods and flour on characteristics of restructured sweet potato stick. *International Journal of Food Science and Technology*. 43, 1896–1900.
- Valenzuela H y Ortíz R. 2007. Estabilidad de la glucosa oxidasa en sistemas amorfos formados por los disacáridos sacarosa, maltosa y trehalosa. *Quimica Nova*, Vol. 30, 7, 1633-1637.
- Wang W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*. 203, 1–60.
- Woong Kim H., Bong Kim J., Muk Cho S., Nam Chung M., Min Lee Y., Mi Chu S., Hwan Che J., Na Kim S., Young Kim S. Sook Cho Y., Hyun Kim J., Ju Park H., Jin Lee D. 2011. Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. *Food Chemistry*. 130, 966-971.
- Yang Z., Zhai W. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays L.*) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11, 470–476.