



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS OXIDASAS PRESENTES EN LA
PLANTA *Ipomoea batatas* L. Lam VARIEDAD MORADA Y SU
EFECTO SOBRE EL PERFIL DE SUS METABOLITOS
SECUNDARIOS**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA
M. en C. ANDREA TORRES ALCALÁ**

**TUTOR PRINCIPAL
DOCTOR ARTURO NAVARRO OCAÑA
FACULTAD DE QUÍMICA**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS OXIDASAS PRESENTES EN LA
PLANTA *Ipomoea batatas* L. Lam VARIEDAD MORADA Y SU
EFECTO SOBRE EL PERFIL DE SUS METABOLITOS
SECUNDARIOS**

T E S I S

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A
M. en C. ANDREA TORRES ALCALÁ

TUTOR PRINCIPAL
DOCTOR ARTURO NAVARRO OCAÑA
FACULTAD DE QUÍMICA



Posgrado
Ciencias
Químicas

CIUDAD UNIVERSITARIA CD.MX.

MARZO 2021

Miembros del Jurado

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza	FES-Cuautitlán, UNAM
Vocal	Dra. María Andrea Trejo Márquez	FES-Cuautitlán, UNAM
Secretario	Dr. Arturo Eduardo Cano Flores	FES-Zaragoza, UNAM

Lugar donde se realizó la tesis:

Departamento Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, U.N.A.M., Edificio E,
Laboratorio 321.

Derivado de la presente investigación, se publicaron los siguientes trabajos:

- Torres, A., Basurto, F., & Navarro-Ocana, A. (2019). Quantitative Analysis of the Biologically Active Compounds Present in Leaves of Mexican Sweet Potato Accessions: Phenols, Flavonoids, Anthocyanins, 3,4,5-Tri-Caffeoylquinic Acid and 4-Feruloyl-5-Caffeoylquinic Acid. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(4), 531–537. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00774-2> (ANEXO 5)
- Torres, A., Noriega, L. G., Delgadillo-Puga, C., Tovar, A. R., & Navarro-Ocaña, A. (2021). Caffeoylquinic Acid Derivatives of Purple Sweet Potato as Modulators of Mitochondrial Function in Mouse Primary Hepatocytes. *Molecules*, 26(2), 319. <https://doi.org/10.3390/molecules26020319> (ANEXO 5)
- Torres, A., Aguilar-Osorio, G., Camacho, M., Basurto, F., & Navarro-Ocana, A. (2021). Characterization of Polyphenol Oxidase from Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) and its Affinity Towards Acylated Anthocyanins and Caffeoylquinic Acid Derivatives. *Food Chemistry*. (ACEPTADO)

Derivado de la presente investigación, se participaron en las siguientes reuniones:

- Jornada de la investigación FQ 2016. 11-14 de octubre del 2016, CDMX, México. Con el trabajo: “**Compuestos bioactivos en camotli (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) variedad morada**”
- IWA 2017–9th International Workshop on Anthocyanins. 22-24 Feb. 2017, Auckland, New Zealand. Con el trabajo: “**Characterization of the main anthocyanins mexican purple sweet potato plant (*Ipomoea batatas* (L.) Lam)**”.
- ICP+TC 2018-XXIX International Conference on Polyphenols and 9th Tannin Conference. 16–20 July 2018, Madison, WI, USA Con el trabajo: “**Mexican sweet potato plants as a source of tricaffeoylquinic acid**”.
- The 2nd Food Chemistry Conference 2019. 17-19 September 2019, Seville, Spain. Con el trabajo “**Characterization of the caffeoylquinic acid derivatives and the acylated anthocyanins of *Ipomoea batatas* L. Lam purple variety (purple sweet potato): flower, leaves, stem and root**”



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Química.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (**No. 308249**).

Financiamiento del proyecto **PAPIIT-IT202318**.

Dr. Arturo Navarro Ocaña por toda su asesoría desde que me integre a su grupo de trabajo y transmitirme su entusiasmo por la química de los alimentos originarios de México.

Dr. Guillermo Aguilar Osorio y M. en C. Michelle Camacho, por compartirme sus conocimientos en el tema de enzimas e integrarme a su grupo de trabajo.

M. en C. Francisco Basurto por su aportación en la colecta y obtención de las accesiones de la planta de camote trabajadas en el presente estudio.

Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (**USAI**), Facultad de Química, UNAM

Miembros del comité tutor: Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Dr. Fausto Rivero Cruz, por sus aportaciones para mejorar el proyecto.

Miembros del comité tutor ampliado: Dra. Amelia Farrés y Dra. Andrea Trejo, por todas las observaciones realizadas.

Miembros del jurado: Dr. Rogelio Pereda, Dr. Ricardo Reyes, Dra. Luz Zambrano, Dra. Andrea Trejo y Dr. Arturo Cano por sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	7
4.1 PLANTA DE CAMOTE.....	7
4.2 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN, PRODUCCIÓN E IMPORTANCIA.....	9
4.2.1 Origen y distribución.....	9
4.2.2 Producción e importancia.....	10
4.3 USOS DE LA PLANTA.....	13
4.4 DATOS NUTRICIONALES.....	16
4.5 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	20
4.5.1 Carotenoides.....	20
4.5.2 Fenoles.....	23
4.5.2.1 Ácidos fenólicos.....	24
4.5.2.1 Flavonoides.....	29
4.5.2.3 Antocianinas.....	31
4.5.3 Otros compuestos bioactivos (cumarinas, alcaloides, triterpenos y glicolípidos.....)	35
4.6 OXIDASAS EN LOS CAMOTES.....	37
4.6.1 Polifenoloxidasas.....	38
4.6.2 Peroxidasas.....	42
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
6. HIPÓTESIS.....	44
7. OBJETIVO GENERAL.....	45
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
9. PROTOCOLO GENERAL.....	46
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
10.1 MATERIAL.....	47
10.2 MÉTODOS.....	48
10.2.1 Material vegetal y preparación de muestras.....	48
10.2.2 Análisis de compuestos fenólicos.....	49
10.2.3 Caracterización y cuantificación de los derivados-ACQ y de las antocianinas.....	51



10.2.4	<i>5-CQ, 4,3- y 4,5-diCQ como moduladores de la función mitocondrial</i>	55
10.2.5	<i>Purificación y caracterización de las PFO y POD</i>	57
10.2.6	<i>Evaluación del efecto de la PFO y POD sobre los derivados -ACQ y las antocianinas</i>	62
11.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
11.1	SELECCIÓN DE LA PLANTA DE CAMOTE	64
11.1.1	<i>Contenido de fenoles totales</i>	64
11.1.2	<i>Contenido de flavonoides totales</i>	66
11.1.3	<i>Contenido de antocianinas totales</i>	67
11.1.4	<i>Identificación por HPLC de los derivados-ACQ</i>	68
11.1.5	<i>Cuantificación de 3,4,5 -triCQ y 4,5-FCQ</i>	69
11.2	DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	72
11.2.1	<i>Fenoles totales en los órganos de la planta de camote morado</i>	73
11.2.2	<i>Antocianinas totales</i>	75
11.3	OBTENCIÓN DE LOS DERIVADOS-ACQ Y DE ANTOCIANINAS	77
11.3.1	<i>Derivados-ACQ</i>	77
11.3.1.1	<i>Identificación y caracterización de los derivados-ACQ</i>	77
11.3.1.2	<i>Obtención de los derivados-ACQ</i>	78
10.3.1.3	<i>Cuantificación de los derivados-ACQ en cada órgano</i>	79
11.3.2	<i>Antocianinas</i>	80
11.3.2.1	<i>Identificación de las antocianinas</i>	80
11.3.2.3	<i>Cuantificación de las antocianinas</i>	83
11.4	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	85
	<i>Los ácidos: 5-CQ, 4,3- y 4,5-diCQ como moduladores de la función mitocondrial en los hepatocitos primarios de ratón</i>	85
11.5	OXIDASAS EN LOS CAMOTES MORADOS	92
11.5.1	<i>Identificación de la PFO y de la POD</i>	93
11.5.2	<i>Extracción y caracterización de la PFO</i>	97
11.5.2.1	<i>Evaluación del efecto del PFO sobre los principales fenoles de camote morado</i>	100
11.5.2.2	<i>Efecto de la PFO sobre el perfil de los derivados-ACQ y antocianinas aciladas</i>	102
11.5.3	<i>Extracción y caracterización de la POD</i>	107
11.5.3.1	<i>Evaluación del efecto del POD sobre los principales fenoles de camote morado</i>	109
12.	CONCLUSIÓN	113
	REFERENCIAS	115
	ANEXOS	128
	ANEXO 1	128



ANEXO 2.....	145
ANEXO 3.....	147
ANEXO 4.....	149
ANEXO 5.....	150



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de la planta de camote	5
Figura 2 Desarrollo de una planta de camote..	7
Figura 3 Órganos de la planta de camote	8
Figura 4 Centros de domesticación del camote	9
Figura 5 Datos de producción mundial de camote	11
Figura 6 Mapa de distribución de camote en el Pacífico.....	12
Figura 7 Estados productores de camote en México.....	13
Figura 8 Usos de la planta de camote.....	14
Figura 9 Alimentos procesados a base de camote.....	15
Figura 10 Regulación del azúcar en sangre por el camote morado y naranja	18
Figura 11 Metabolismo de los carotenoides y retinoides en vertebrados.....	21
Figura 12 Ejemplares de camote amarillo y naranja	22
Figura 13 Estructura de los carotenoides de camote.....	23
Figura 14 Estructura de los ácidos hidroxicinamoilquínicos identificados en camote.....	27
Figura 15 Estructuras de los flavonoides identificados en camote.....	30
Figura 16 Interacciones de apilamiento en antocianinas y sus complejos $\pi-\pi$	32
Figura 17 Estructura de las antocianinas de camote morado.....	34
Figura 18 Otro grupo de compuestos identificados en la planta de camote.....	37
Figura 19 Reacción general de polifenoles catalizados por la tirosinasa y catecol-oxidasa	39
Figura 20 Estructura cristalina de la catecol-oxidasa de camote,	40
Figura 21 Ciclo catalítico de la catecol-oxidasa.....	41
Figura 22 Ciclo catalítico de la peroxidasa	43
Figura 23 Contenido de fenoles totales en hojas de 200 accesiones	65
Figura 24 Contenido de flavonoides totales en hojas de 200 accesiones	66
Figura 25 Contenido de antocianinas totales en hojas de 200 accesiones.....	67
Figura 26 Análisis HPLC comparable de 21 accesiones de la planta de camote	68
Figura 27 Ubicación geográfica y color de pulpa correspondiente de las accesiones de camote en México	69
Figura 28 Órganos de la planta de camote.....	72
Figura 29 Concentración de fenoles totales de acuerdo con el órgano	73
Figura 30 Concentración de antocianinas totales de acuerdo con el órgano	75
Figura 31 Cromatograma de un extracto enriquecido en derivados -ACQ	79
Figura 32 Cromatograma de un extracto enriquecido en antocianinas	83
Figura 33 Evaluación de la respiración mitocondrial del ácido 5-CQ.....	86
Figura 34 Evaluación de la respiración mitocondrial del ácido 3,4-diCQ.....	87
Figura 35 Evaluación de la respiración mitocondrial del ácido 4,5-diCQ.....	88
Figura 36 Tasa de consumo de oxígeno (OCR) independientes.....	89
Figura 37 Reacciones de oxidación colorimétricas de cada órgano de la planta de camote	95
Figura 38 Gel de poliacrilamida 12 % de los extractos enzimáticos de ca	96
Figura 39 Valores de actividad enzimática y concentración de proteína de cada colecta....	97



Figura 40 Actividad específica del PFO de camote morado por efecto del pH y la temperatura.....	98
Figura 41 Porcentaje del efecto sobre la actividad específica con respecto al control de la PFO de inhibidores y estimuladores químicos.....	100
Figura 42 Actividad específica de la PFO para 8 estructuras fenólicas.	101
Figura 43 Cromatograma de oxidación enzimática de la mezcla de derivados-ACQ utilizando PFO.....	103
Figura 44 Mecanismo de oxidación de los derivados de ACQ	105
Figura 45 Cromatograma de la oxidación enzimática de la mezcla de antocianinas usando PFO de camote morado	107
Figura 46 Actividad específica del POD de camote morado por efecto del pH.....	108
Figura 47 Actividad específica del POD de camote morado por efecto de la temperatura	109
Figura 48 Actividad específica del POD utilizando diferentes sustratos	110
Figura 49 Cromatograma de la oxidación enzimática de la mezcla de derivados-ACQ utilizando POD de camote morado	111



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Efecto de los derivados del ácido cafeoilquínico.....	28
Cuadro 2 Concentraciones de los ácidos 3,4,5-triCQ y 4,5-FCQ	71
Cuadro 3 Caracterización e identificación de los derivados-ACQ.....	78
Cuadro 4 Cuantificación de los derivados-ACQ	80
Cuadro 5 Caracterización e identificación de las antocianinas.	81
Cuadro 6 Cuantificación de las antocianinas.....	84
Cuadro 7 Actividad enzimática de la PFO y POD	96
Cuadro 8 Parámetros cinéticos determinados para la PFO y 8 sustratos.....	102
Cuadro 9 Porcentaje de degradación de derivados-ACQ y de antocianinas	104



1. RESUMEN

El camote (*Ipomoea batatas* L. Lam) es uno de los cultivos más importantes de mundo; destaca por su alta productividad por unidad de área y de tiempo. Su principal uso es como raíz comestible, ya que su contenido energético es alto y la calidad de sus nutrientes es apreciado en varias partes de mundo. Es rico mayoritariamente en almidones, característica valorada en la industria de los alimentos para fabricar una gran diversidad de productos procesados.

Recientemente, se le ha comenzado a dar uso a las partes aéreas de la planta, ya que se ha descubierto que son una fuente importante de proteínas, minerales y metabolitos secundarios como fenoles y luteína; con valores comparables a otros vegetales de hojas verdes. No obstante, en México a pesar de que es centro de origen y domesticación del camote, la importancia agrícola y comercial es baja; así como el consumo y las investigaciones en torno a este cultivo son limitadas.

En México, a diferencia de otras partes del mundo, no hay variedades registradas ni estudios respecto al contenido de metabolitos secundarios de la planta de camote de acuerdo con la zona de cultivo. En esta investigación, se demostró a partir de una colección de 200 accesiones de plantas de camote de las principales regiones productoras del país (suministradas por el SINAREFI), que son una excelente fuente de metabolitos secundarios. Principalmente de derivados del ácido cafeoilquínico (ACQ); compuestos de gran importancia por sus propiedades biológicas asociadas a la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, con concentraciones superiores a otras variedades de camote reconocidas en el mundo. Asimismo, se detectaron concentraciones elevadas en toda la planta de camote, de gran diversidad de derivados-ACQ como los ácidos: cafeico, 5-cafeoilquínico, 3,4-; 3,5- y 4,5- di-cafeoilquínico, feruloil-quínico, 3,4- y 4,5- feruloil-cafeoilquínico y 3,4,5-tri-cafeoilquínico. Al mismo tiempo, se demostró el potencial de los derivados-ACQ para mejorar la función mitocondrial hepática, cuya alteración es una característica común que conduce a la esteatosis hepática durante la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico.

En conjunto, las variedades mexicanas de pulpa morada exhibieron un perfil de antocianinas complejo y poco común en la naturaleza. Ya que las 16 antocianinas identificadas fueron mono- y di-aciladas; característica que hace a dichos compuestos altamente estables y excelentes candidatos para ser utilizados como colorantes en la industria de los alimentos.



Sin embargo, se detectó la presencia de oxidasas (polifenoloxidasa (PFO) y peroxidasa (POD)) en los diferentes órganos de la planta de camote morado. Estas enzimas están involucradas en la catálisis de reacciones de oxidación de fenoles. Por lo que es este estudio, se evaluó el efecto que tiene las oxidasas sobre cada uno de los compuestos mayoritarios y de relevancia biológica.

De acuerdo con un análisis general por HPLC, se concluyó que ambas oxidasas, catalizan reacciones de oxidación utilizando como sustratos principales a los compuestos aromáticos conteniendo 1,2-dihidroxi-benceno (sustituyente *orto*-difenólico o catecol). Y tomando en cuenta, que la mayor parte del total de los fenoles en la planta de camote fueron derivados de ácido cafeico (67 %) así como las antocianinas mayoritarias estaban aciladas con ácido cafeico, fue evidente la degradación rápida de los compuestos mayoritarios por las oxidasas; comprobando un problema relevante en el valor agregado que le podrían dar estos compuestos a la planta de camote.

También, se realizó un estudio comparativo de afinidad enzimática con la PFO hacia diferentes compuestos fenólicos presentes en la planta de camote morado y se determinó el efecto inhibitorio de diferentes iones sobre la actividad enzimática. Las condiciones óptimas de actividad enzimática fueron pH 7 con un intervalo de temperatura de 20-30 °C en el que se oxidaron los sustratos fenólicos con un rendimiento del 72.5-99.8 %. Los iones Zn^{2+} redujeron notablemente la actividad de la PFO, mientras que los iones Cu^{2+} mejoraron el rendimiento de la enzima. La mayor preferencia de la PFO por el sustrato fue para los ácidos 3,4,5-tri-cafeoilquínico y 3,5-di-cafeoilquínico, seguido del ácido 5-cafeoilquínico y cafeico, los ácidos 3,4 y 4,5-di-cafeoilquínico, y la peonidina -3-cafeoil *p*-hidroxibenzoil-soforosido-5-glucósido. Los valores de K_m más altos se encontraron para el ácido 4,5-feruloil-cafeoilquínico y el catecol.

Con la información mostrada en el presente estudio, se evidencia la preselección de una accesión de camote morado por su alto contenido en fenoles, flavonoides y antocianinas, así como su alta concentración en compuestos que en la naturaleza se encuentran en concentraciones limitadas como lo son los ácidos 3,4,5-tri-cafeoilquínico y el 4,5-feruloil-cafeoilquínico. Asimismo, se expone la degradación por oxidación enzimática de los principales metabolitos secundarios en camotes morados; por otra parte, se demostró que la PFO cataliza la degradación oxidativa de compuestos fenólicos biológicamente importantes con rendimientos de hasta 99.8 %, lo que destaca la necesidad de buscar metodologías para la conservación de estos metabolitos y evitar las pérdidas que ocasiona la oxidación enzimática, y de esta manera, hacer eficiente su aprovechamiento en la industria de los alimentos y farmacéutica.



2. ABSTRACT

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) is one of the most important crops in the world; it stands out for its high productivity rates achieved per area and time. The edible root is high in energetic content and provides the quality nutrients for which sweet potato has been appreciated in various parts of the world. Since the tuber mostly contains starches, it is especially valued in the food industry for the production of great diversity of processed foods.

Recent studies of the aerial parts of sweet potato have found that they are an important source of proteins, minerals, and secondary metabolites, such as phenols and lutein, with levels comparable to that of other leafy vegetables. These results expanded the usage of sweet potato plant towards its structures other than root. However, despite the Mexican origins and domestication history, sweet potato has little importance both agriculturally and commercially in the country. In consequence, consumption and investigation of this crop in Mexico is limited.

Currently, neither registration of sweet potato varieties nor studies on the metabolic content in sweet potato plants according to the cultivation zone are carried out in Mexico. This stays in a stark contrast to other parts of the world. In the present study it was demonstrated that a collection of 200 sweet potato accessions that represented the main production regions in the country (provided by SINAREFI) contained high levels of secondary metabolites. Majority of these compounds comprise caffeoylquinic acid derivatives (CQA) which biological properties have been associated with the prevention of diseases caused by oxidative stress. Their concentrations were found to be higher than those described for other sweet potato varieties. Elevated levels of CQA derivatives were observed in all plant parts that were tested. A great diversity of these phenolic compounds was confirmed and included: acids caffeic, 5-caffeoylquinic, 3,4-; 3,5- y 4,5- di-caffeoylquinic, feruloyl-caffeoylquinic, 3,4- y 4,5-feruloyl-caffeoylquinic, and 3,4,5-tri-caffeoylquinic acids. Additionally, this study demonstrated the potential of CQA derivatives to improve mitochondrial function in hepatocytes. Such alternations are typical characteristics that lead to hepatic steatosis during obesity, diabetes, and metabolic syndrome.

In general, among the purple-colored pulp varieties of sweet potato it was observed the complex pattern of anthocyanins that are rarely present in nature. The 16 anthocyanins were identified as highly stable mono- or di- acylated structures that make them excellent candidates as food colorants.

Nevertheless, the concomitant presence of oxidases, namely polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD), was detected in different plant organs of purple sweet potato. These enzymes are involved in the catalytic oxidation of phenolic compounds. For that reason, it was evaluated the effect of oxidases on major phenolic structures and biological relevance.



As revealed by the HPLC analysis, both oxidases catalyzed oxidation reactions using as primary substrates aromatic compounds containing 1,2-dihydroxybenzene (*o*-diphenolic or catechol substituent). Since 67% of total phenols present in the sweet potato plant corresponded to the caffeic acid derivatives, and major anthocyanins were found to be acylated to caffeic acid, it was obvious to observe the accelerated degradation of major phenolic compounds by these enzymes. The results confirm the relevance of the problem associated with the presence of phenolic compounds in sweet potato that clearly add to the nutritional value of this crop.

Moreover, the comparative study of enzymatic affinity using PPO towards different phenolic compounds present in the purple sweet potato plant was carried out and the inhibitory effect of different ions on enzyme activity was determined. The optimum conditions of the enzyme performance were pH 7 and a temperature range of 20-30 °C at which phenolic compounds were oxidized at 72.5-99.8% yield. It was found that Zn²⁺ ions significantly reduced the PPO activity while Cu²⁺ ions improved catalytic efficiency. The highest substrate preference of PPO was shown for 3,4,5-tri-caffeoylquinic and 3,5-di-caffeoylquinic acid, followed by 5-caffeoylquinic and caffeic acid, 3,4- and 4,5- di-caffeoylquinic acids, peonidin-3-caffeoyl *p*-hydroxy benzoyl-sophoroside-5-glucoside. The highest K_m values were found for 4,5-feruloyl-caffeoylquinic acid and catechol.

Overall, the present study allowed preselection of the purple sweet potato accession that showed the highest content of phenols, flavonoids and anthocyanins, together with the high concentrations of compounds which in nature are found at limited amounts, i.e. 3,4,5-tri-caffeoylquinic and 4,5-feruloyl-caffeoylquinic acids. Furthermore, enzymatic oxidation of major secondary metabolites in purple sweet potato was evaluated. It was found that PPO catalyzed degradation of biologically relevant phenolic compounds at yields as high as 99.8 %. The obtained results highlight the need to develop methodology that protects these metabolites against natural activity of oxidases, and, in this way, the food and pharmaceutical industries could make efficient use of purple sweet potato.



3. INTRODUCCIÓN

Según la tradición indígena, fueron cinco especies que se crearon para la alimentación humana. La primera *Ipomoea* según los mitos mesoamericanos, fue creada junto con el maíz, gracias al Dios Centéotl que se hundió en la tierra para crear vegetales que alimentaran al pueblo y, es así, como surgieron: el algodón (*Gossypium hirsutum*), el huauzontle (*Chenopodium nuttalliae*), la chía (*Salvia hispánica*), el camote (*Ipomoea batatas*) y el maíz



Figura 1 Esquema de la planta de camote. Por Esteban Torres

(*Zea mays*) (Díaz, 2009).

El camote, es una herbácea perenne de la familia Convolvulaceae, cultivada por sus raíces de almacenamiento comestibles. La planta del camote (Figura 1) es una enredadera ramificada y rastrera con hojas lobuladas en forma de corazón dispuestas en espiral y flores blancas o moradas. La planta tiene raíces agrandadas llamadas tubérculos o raíces tuberosa que actúan como un almacén de energía. Las

raíces tuberosas pueden ser de forma variable y pueden ser de color morado, amarillo, marrón, blanco o rojizo. Las enredaderas de camote pueden alcanzar 4 m de largo y, generalmente, se cultiva como anual para ser cosechada después de una temporada de crecimiento. Los camotes también pueden denominarse: batata, ñame o kumara y son originarias del continente americano.

El camote es uno de los cultivos seleccionados por la Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio (NASA) de los EE. UU., para ser cultivado en un sistema de soporte vital ecológico controlado como fuente primaria de alimento (Islam, 2014).



El cultivo de camote destaca por sus pocos requerimientos nutritivos, su alta productividad por unidad de área y de tiempo, además de la resistencia de la planta al estrés. Su principal aprovechamiento en México es el de la raíz como alimento básico. Sin embargo, en otras partes de mundo se aprovechan los subproductos del cultivo como: el jugo de camote, los residuos aéreos y la piel, éstos contiene importantes cantidades de proteínas, fibra dietética, pectina, antocianinas, ácidos clorogénicos, y otros componentes funcionales con destacadas propiedades en la regulación del funcionamiento del cuerpo humano (T. Mu, Sun, Zhang, & Cheng Wang, 2017). Por lo que es importante el estudio y la promoción del consumo del cultivo del camote; conservando cada una de sus propiedades saludables contenidas dentro de su estructura.



4. MARCO TEÓRICO

4.1 PLANTA DE CAMOTE

El camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), es una planta dicotiledónea de la familia Convolvulacea, que incluye a numerosas especies de malezas y de plantas cultivadas como ornamentales. Es una planta perenne de propagación vegetativa y se cultiva como planta anual. Dado que no tiene definido un estado de madurez, se puede cosechar siguiendo el crecimiento de las raíces. En la Figura 2 se ilustran los estados de crecimiento de las raíces de camote a partir de una raíz adventicia; en la Figura 2 d), se observa que después de 30 días de crecimiento, hay 3 tallas de raíz: (A) las raíces de talla precipitada o de desarrollo temprano, (B) las raíces de talla retardada y (C) las raíces de adventicias (Clark, Ferrin, Smith, & Holmes, 2013). En México los agricultores, a esta diversidad de tallas de raíces, las denomina de mayor a menor tamaño como de primera a cuarta, respectivamente.

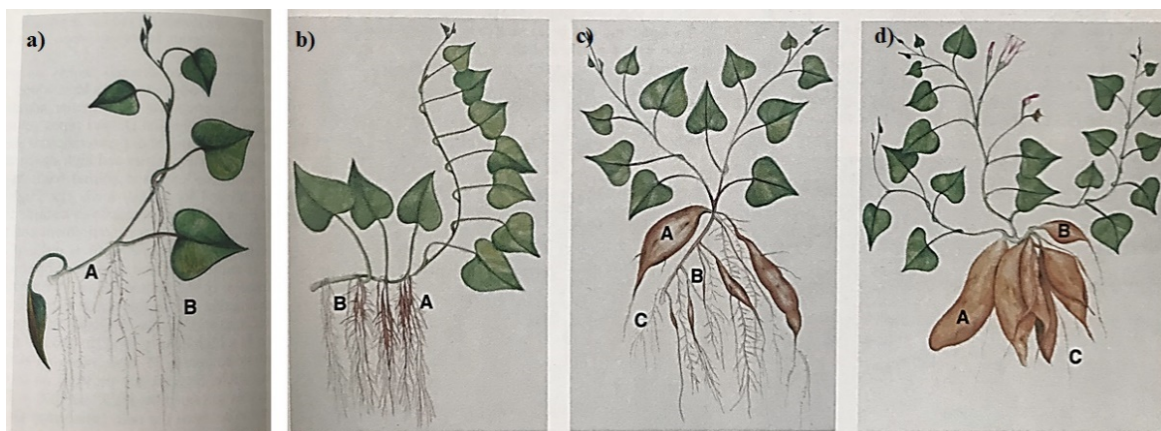


Figura 2 Desarrollo de una planta de camote. a) Desarrollo de raíces adventicias (primeros 15 días), cada raíz adventicia da lugar a raíces laterales o ramificadas. b) Desarrollo de raíces adventicias después de 30 días: (A) inicio de raíces de desarrollo temprano (B) lignificación de raíz adventicia. c) Progreso de desarrollo de las raíces tuberosas: (A) raíz de almacenamiento en etapa de desarrollo avanzada, (B) lignificación de raíz adventicia, (C) inicio de nueva raíz adventicia. d) Sistema completo de la planta de camote: (A) raíces de almacenamiento formadas durante los primeros 30 días, (B) raíces de formación tardía, (C) raíz adventicia lignificada.



La raíz tuberosa es fusiforme o alargada; el color de la piel y pulpa varía entre rojo, morado, pardusco, pardo amarillento, naranja, amarillo y blanco. Los tallos postrados o ascendentes, verdes o violáceos, glabros o pilosos, muy ramificados, enraizados en los nudos y con savia lechosa. Las hojas son alternas, ovado-orbiculares, enteras o palmeadas de 3-7 lóbulos o partidas, subcordadas o cordadas, de 4 a 15 cm de largo, 3 a 11 cm de ancho, en pecíolos de 3 a 15 cm de largo. Las inflorescencias son axilares; con pedúnculo de 3–18 cm de largo, 1 o varias flores; pedicelos de 3 a 12 mm de largo; brácteas lanceoladas y deciduas. Sépalos sublinguales, los internos algo más largos, oblongos a elípticos-oblongos, de 7 a 12 mm de largo por 3 a 5 mm de ancho, agudos y mucronados, subcoriáceos. Corola violeta o lila, blanca en la parte superior, campanulada, 3-4.7 cm de largo, 5 estambres, adunados al perianto, libres y alternados con los lóbulos de la corola. El fruto una cápsula globosa, no carnosa, novoide o deprimida (Lim, 2016). Las imágenes de los órganos se muestran en la Figura 3.



Figura 3 Órganos de la planta de camote: flores, tallos, raíces tuberosas de diferente color de pulpa y cáscara, y hojas en sus diferentes formas y colores.



4.2 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN, PRODUCCIÓN E IMPORTANCIA

4.2.1 Origen y distribución

El camote fue domesticado hace 5000 años en la América tropical. Su origen a la fecha no es claro. Sin embargo, Austin en 1988, basado en el análisis de características morfológicas de camote y especies *Ipomoea*, postula que el camote es originario de la región entre la península de Yucatán, México y el río Orinoco en Venezuela (Loebenstein, 2009). Por otro lado, trabajos basados en variación morfológica indican que hay mayor diversidad en el área comprendida en Colombia, Ecuador y norte de Perú. Otros estudios, utilizando marcadores moleculares, proporcionan evidencia de que Centroamérica es el principal centro de diversidad y probablemente el centro de origen, considerando la riqueza de los parientes silvestres del camote. Mientras que, la evaluación de la diversidad genética mediante el uso de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) sugiere que la

introducción prehistórica en Oceanía podría realizarse a partir de la batata mesoamericana mediante la dispersión natural (Srisuwan, Sihachakr, & Siljak-Yakovlev, 2006). Un estudio molecular más reciente, analizó 329 variedades locales recolectadas desde México hasta Perú mediante marcadores de microsatélites nucleares y de cloroplasto.

Ambos tipos de marcadores respaldaron la existencia de dos centros de domesticación



Figura 4 Centros de domesticación del camote (Roullier et al., 2011).



correspondientes a las accesiones de la región Sur: Perú-Ecuador y las accesiones de la región norte: Caribe y América Central (Roullier, Rossel, Tay, Mckey, & Lebot, 2011) (Figura 4).

La batata se introdujo en Europa occidental desde las Indias Occidentales, después del primer viaje de Colón en 1492. Fray Bernardino de Sahagún las describió:

“Hay otras raíces buenas de comer, que se hacen como nabos debajo de la tierra, a los cuales llaman camotli, estas son batatas en esta tierra, cómelas cocidas, crudas y asadas”.

En el siglo XVI, los exploradores portugueses transfirieron la batata a África, India, el sudeste de Asia y las Indias Orientales, mientras que la transferencia directa de la planta fue realizada por galeones comerciales españoles desde México a Filipinas (D. Zhang, Cervantes, Huaman, Carey, & Ghislain, 2000).

A Oceanía (Oceanía corresponde aquí a toda la región insular entre Asia y las Américas, incluidas Polinesia, Micronesia y Melanesia) de acuerdo con la hipótesis tripartita de la introducción del camote, las tres líneas introdujeron diferentes grupos de genes en diferentes áreas (Roullier, Kambouo, Paofa, McKey, & Lebot, 2013).

4.2.2 Producción e importancia

Los 10 cultivos más importantes económicamente en el mundo tienen su centro de diversidad en México y están incluidos en el Inventario Nacional Mexicano como lo son: maíz, papa y algodón. Los parientes silvestres de estos cultivos se identificaron como prioridades globales y se incluyen en el acervo genético” Harlan y de Wet”, junto con variedades silvestre de: chile, papaya, calabaza, girasol, yuca, aguacate, frijol y cacao (Contreras-Toledo et al., 2018).



El camote es el séptimo cultivo alimenticio de importancia mundial, se cultiva ampliamente en regiones tropicales, subtropicales y templadas cálidas. Dentro de los países asiáticos, China es el principal productor con 53 millones de toneladas en 2018, lo que representa el 81.3% de la producción mundial (FAO, 2020) (Figura 5); sin embargo, solo el 40% de la producción se destinan para el consumo humano y usos industriales, y el resto se destina para la alimentación animal.

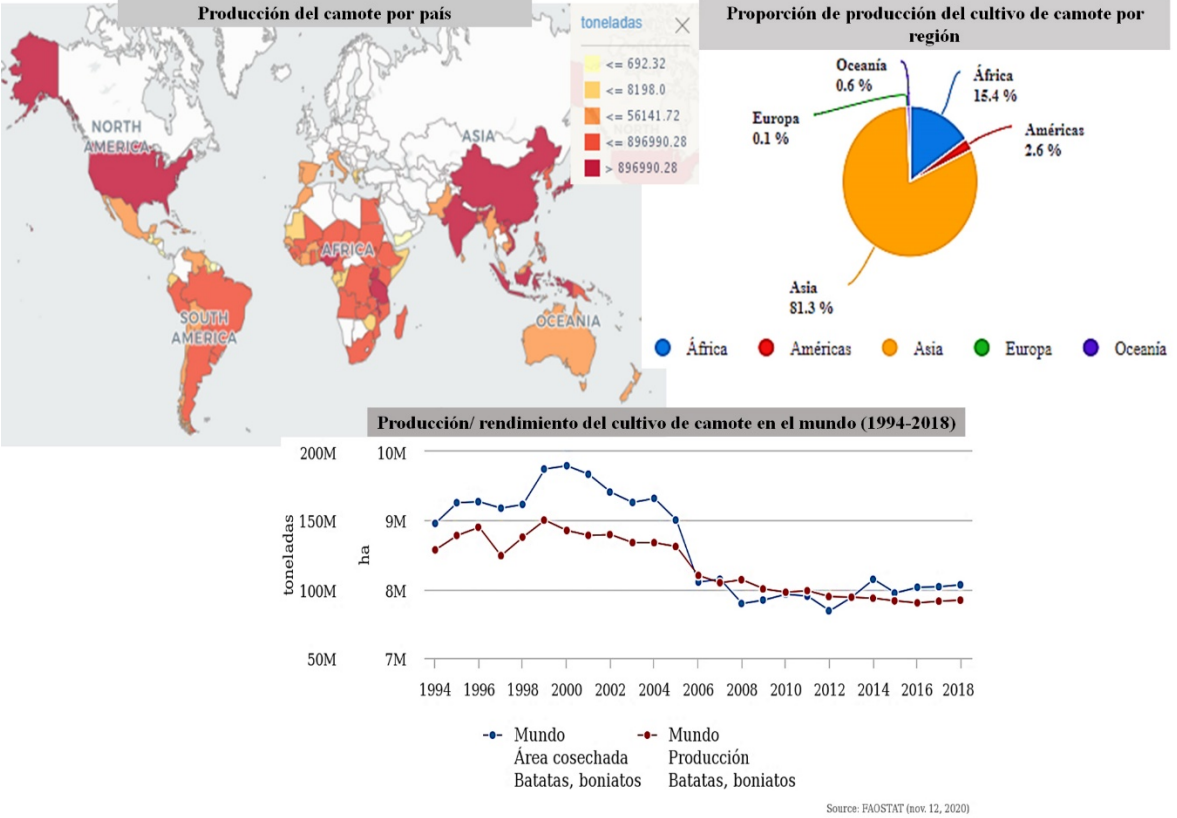


Figura 5 Datos de producción mundial de camote, FAO 2020.

La producción *per cápita* más grande en el mundo es en las Islas Solomon, seguida de Burundi (Padmaja, 2009). En las islas del Pacífico, el camote es el alimento básico más importante en términos de calorías totales producidas localmente. Los habitantes rurales de Papua Nueva Guinea consumen alrededor de 670 kg/persona/año y el camote constituye casi dos tercios del alimento básico tanto en peso (64%) como en energía alimentaria (63%). En



Fiji, Nueva Caledonia y Vanuatu, el camote es un cultivo alimentario complementario, pero con importancia creciente en la seguridad alimentaria, nutricional y de los medios de vida. El camote también es un cultivo cultural y alimentario muy trascendental en Nueva Zelanda, Isla de Pascua y Hawaii. Para Polinesia, Islas Bajas y Atolones de Micronesia, el camote es cada vez más popular debido a su resiliencia climática y ecológica. En estas regiones, el camote juega un papel crucial en la reducción de riesgos y seguridad alimentaria, por lo que diferentes agencias internacionales de las Islas del Pacífico han recolectado germoplasma de las variedades de camote del mundo (EE. UU., América del Sur, Asia, Europa, África y el Caribe) más resilientes y útiles (Iese et al., 2018) para su conservación y propagación (Figura 6). Cabe destacar que el camote es usado y aprovechado en grandes cantidades en países como Japón y Estados Unidos.

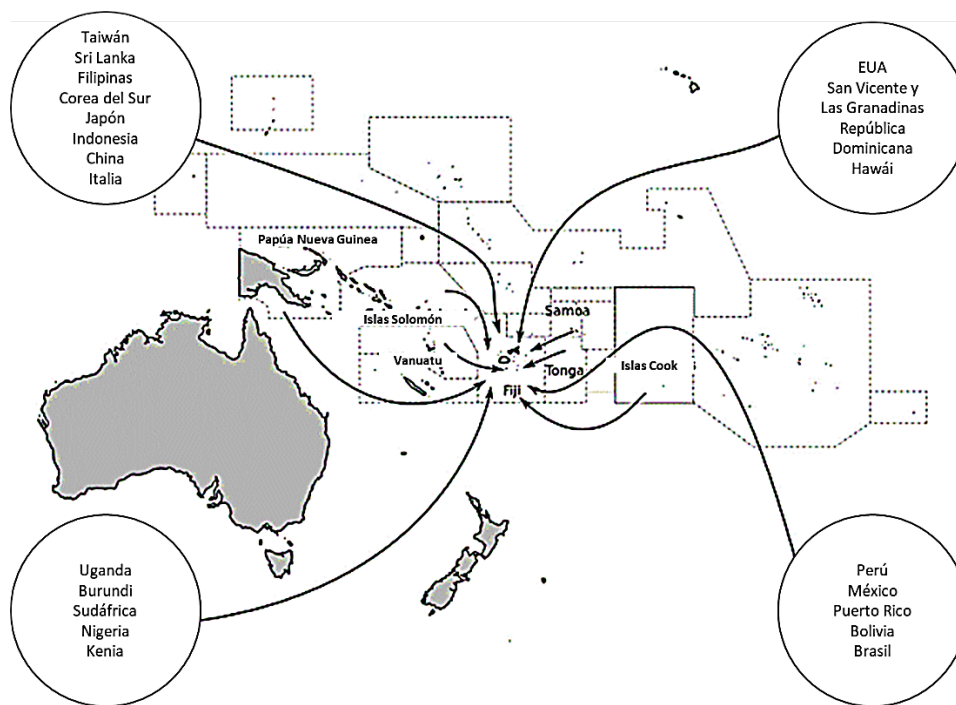


Figura 6 Mapa de distribución de camote en el Pacífico (Iese et al., 2018).

La producción de camote en México es baja, se siembran cerca de 3000 hectáreas y se cosechan alrededor de 50 000 toneladas al año. Su producción se distribuye principalmente



en la zona centro sur de la costa del Golfo, en la Península de Yucatán, Chiapas y Oaxaca, la región del Bajío y en algunos puntos de la vertiente del Pacífico, en los estados de Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Sinaloa; también, se cultiva en algunos municipios de Chihuahua y Tamaulipas. De acuerdo con datos de la SAGARPA (2010), se registra a la región del Bajío (Guanajuato y Michoacán) como los principales productores, con su producción destinada al mercado nacional (Figura 7) (Basurto et al., 2015).

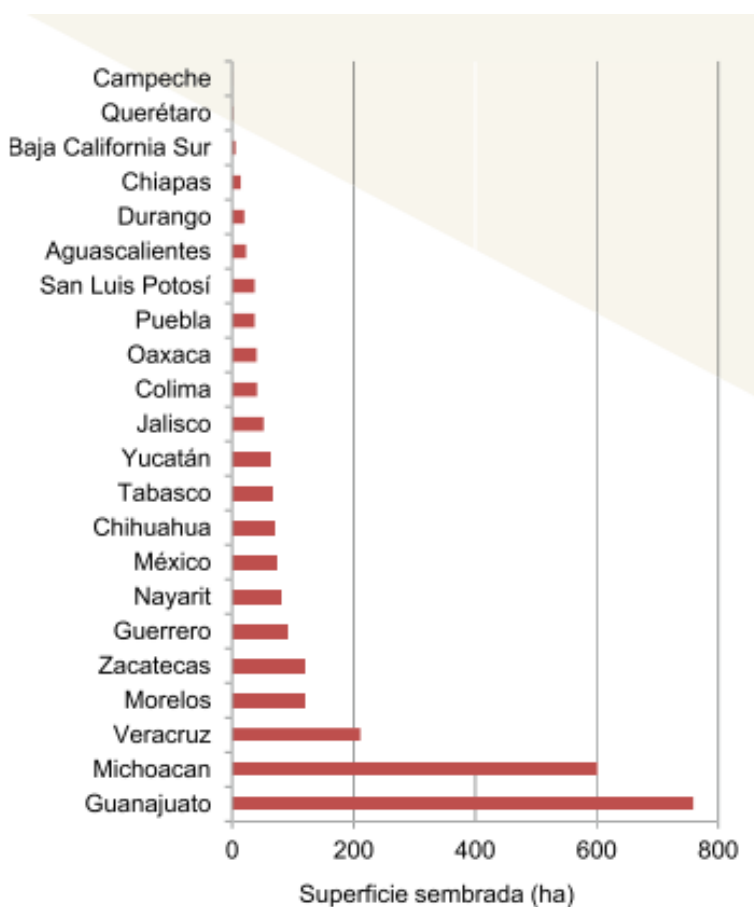


Figura 7 Estados productores de camote en México. (Basurto et al., 2015).

4.3 USOS DE LA PLANTA

Las raíces de la planta de camote tienen de 20-30% de almidón y son una de las principales fuentes de almidón comercial: como alimento básico, materia prima para la producción de



alcohol y alimentación animal (Srisuwan et al., 2006). En la Figura 8 se muestra un esquema general que resume los usos de la planta de camote (raíces y partes aéreas).

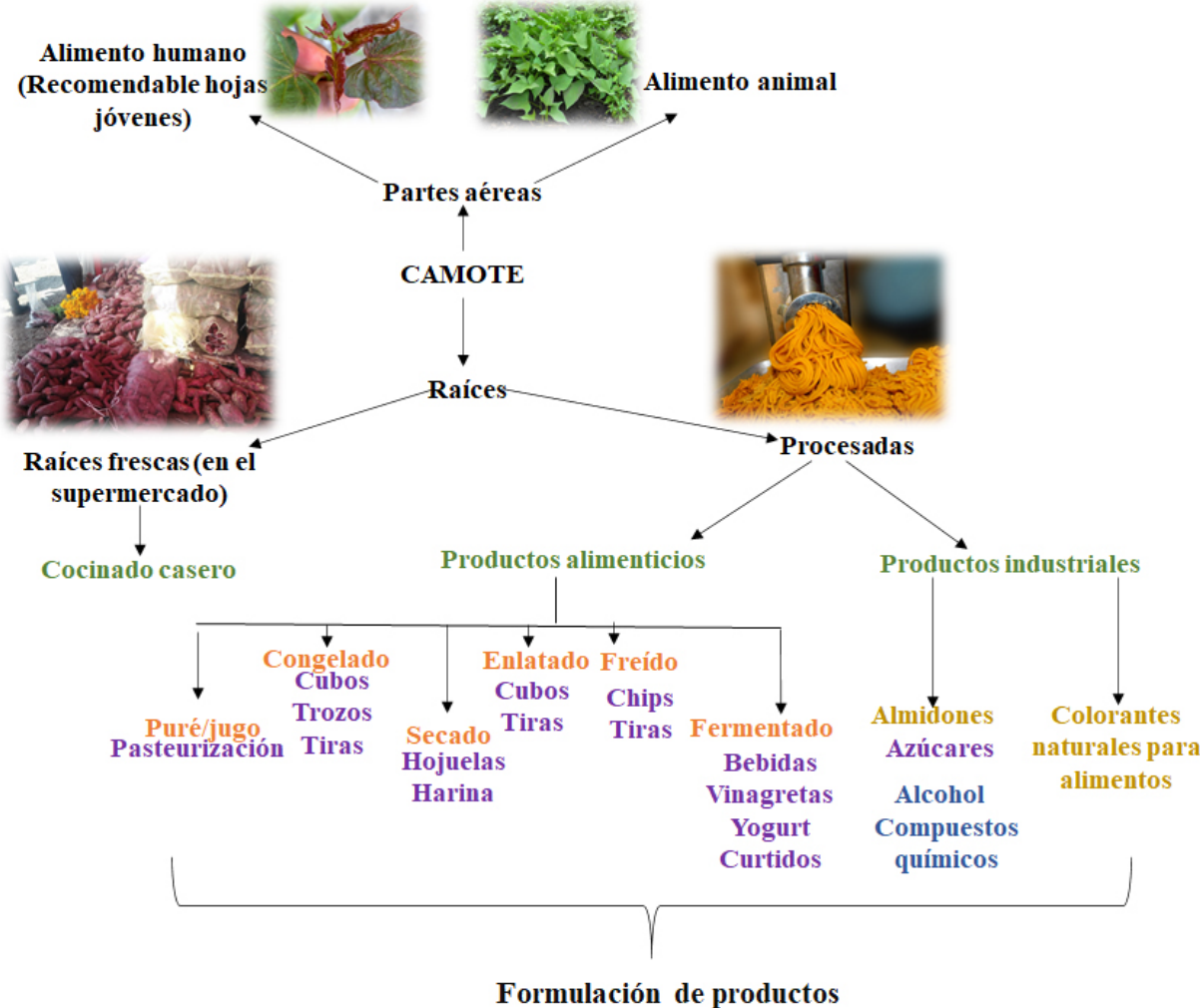


Figura 8 Usos de la planta de camote. (Truong, Avula, Pecota, & Yencho, 2018).

La manera de utilizarlos frecuentemente es después de hornear, hervir o freír las raíces. Se pueden procesar su almidón en harina o puré para productos alimenticios secundarios. Otras maneras de utilizarlas y conservarlas son deshidratando para elaborar “chips”, harinas u hojuelas; congelados y empacados al alto vacío. De manera frita es la forma más popular de



consumo en Japón, USA, China, Perú y Países Bajos (Padmaja, 2009). En la Figura 9 se muestran algunos ejemplos de alimentos procesados a base de camote.



Figura 9 Alimentos procesados a base de camote.

En México, se consume principalmente la raíz tuberosa y es base en la preparación de golosinas o como parte de platillos tradicionales en diversas celebraciones como: las panochas de coco y camote del Jueves Santo; los camotes durante la Conmemoración del Grito de Dolores el 15 y 16 de septiembre, en las fiestas de San Juan Bautista de San Juan del Río, Querétaro el 24 de junio (Díaz, 2009), en las festividades de día de muertos el 1 y 2 de noviembre, entre otras.

A pesar de que pueden ser consumidas por los humanos y con un alto valor nutricional, las hojas (verdes o moradas) y tallos son subvalorados, tienen pocos usos e importancia comercial. Las hojas y tallos se pueden cosechar varias veces al año, pero entre el 95% y el 98% se descartan durante el período de cosecha, mientras que el 2-5% restante se utiliza



como alimento para animales (Xu et al., 2010), lo que genera un enorme desperdicio de recurso. Estudios anteriores demuestran que el contenido total de polifenoles es del 3 al 12% en peso seco, esto es de dos a tres veces mayor que el de algunas verduras de uso común (por ejemplo, espinaca, col rizada) (Xi, Mu, & Sun, 2015). En países africanos y asiáticos, las hojas de la planta de camote se consideran una verdura de hojas, que funciona como una rica fuente de proteínas, aminoácidos esenciales, antioxidantes, vitaminas, minerales y fibra dietética (Johnson & Pace, 2010). Además, en comparación con otros vegetales de hojas verdes, las hojas de la planta de camote son más tolerantes a enfermedades, plagas y condiciones de alta humedad. Dichas hojas constituyen una fuente alternativa de vegetales de hojas verdes durante la temporada baja y, potencialmente podrían aliviar la escasez de alimentos debido a desastres naturales, por ejemplo, tsunamis, inundaciones o tifones (Sun, Mu, Xi, Zhang, & Chen, 2014).

4.4 DATOS NUTRICIONALES

La raíz y las hojas de camote son una fuente rica y variable de nutrientes esenciales para los humanos, destacando por la calidad en el contenido de almidones, proteínas, fibra dietética, lípidos, vitaminas, minerales y polifenoles. Además, dependiendo del tipo y la variedad pueden tener diferentes concentraciones de carotenoides, ácidos fenólicos y de antocianinas con características muy particulares.

La raíz tuberosa es rica en carbohidratos, minerales y tiene un alto contenido de humedad. En base seca, contiene de 80-90% de carbohidratos, de los cuales 60-70% es almidón. Sin embargo, la proporción de almidón y otros carbohidratos como azúcares, es relativa y varía con el cultivo, la madurez y el almacenamiento (Akoetey, Britain, & Morawicki, 2017).



La composición, morfología de los gránulos y estructura molecular del almidón son características importantes que influyen en sus propiedades funcionales (T.-H. Mu, Zhang, Sun, & Pérez, 2019) y aunque por definición el camote se considera dulce, hay una amplia gama de dulzura percibida, dependiendo de los azúcares y conversión de almidón durante la cocción. Los valores de azúcar reportados son entre 30-35% en peso seco; conteniendo: sacarosa, glucosa y fructosa, el principal cambio en la composición del azúcar con la cocción es la producción de maltosa a partir de almidón hidrolizado, gran parte del almidón se convierte en dextrinas y maltosa mediante la acción de α - y β -amilasas, algunos estudios han encontrado que el camote hervido tiene un índice glicémico (IG) bajo de 46 ± 5 (Allen, Corbitt, Maloney, Butt, & Truong, 2012) (teniendo en cuenta que las curvas de respuesta de glucosa en sangre para alimentos con IG bajo es de 55, intermedio de 56-69 y alto de 70). El camote al tener el IG bajo, libera glucosa muy lentamente en el torrente sanguíneo y por tanto, IG bajo beneficia el páncreas al no trabajar demasiado y mantener la saciedad por más tiempo (Dutta, 2015). Adicionalmente, otros investigadores han demostrado que los camotes pueden ayudar a regular el azúcar en sangre debido a su capacidad para elevar los niveles sanguíneos de adiponectina, para ayudar a regular cómo metaboliza el cuerpo insulina, ya sea aumentando la secreción de insulina de las células β pancreáticas o liberándola de la insulina unida, disminuyendo así la glucosa postprandial en animales (Figura 10) (Dutta, 2015) (Sudhakar et al., 2021).



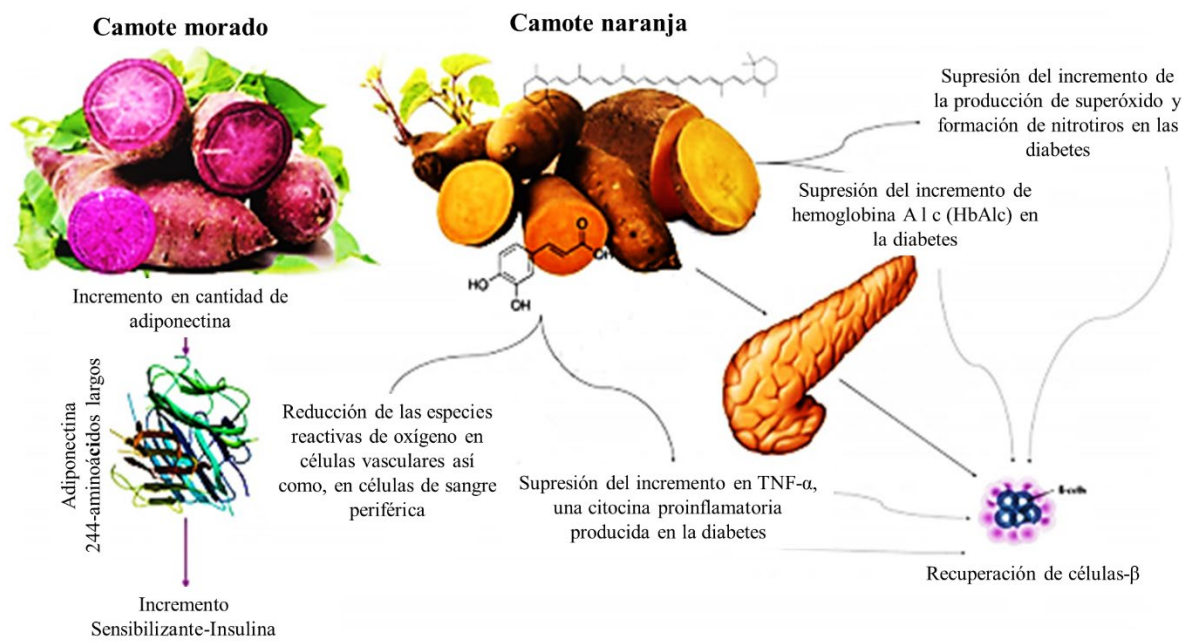


Figura 10 Regulación del azúcar en sangre por el camote morado y naranja (Sudhakar et al., 2021).

El contenido de fibra dietética es del 20-30 %; cantidad equivalente a otros vegetales como los ejotes y el perejil, pero es más alto que en los albaricoques (Huang, Tanudjaja, & Lum, 1999).

Por otro lado, el contenido de proteína es del 1.73-9.14 %. De ésta, el 60-80 % es esporamina. La esporamina está compuesta de 18 diferentes aminoácidos, de los cuales 8 son aminoácidos esenciales, es decir aproximadamente el 39% del contenido proteico en camote son aminoácidos esenciales (T. Mu, Sun, Zhang, & Wang, 2017b); por lo que le confiere una calidad proteica equivalente o superior a otros vegetales.

Mientras que el contenido lipídico es bajo (0.14-0.21 %); sin embargo, el tipo de lípidos presentes es importante, ya que de ellos depende la calidad de conservación y desarrollo de sabor desagradable durante el almacenamiento de productos procesados como las hojuelas y chips. Alrededor del 42% de los lípidos totales son lípidos neutros, seguidos por un 27% de



triglicéridos, siendo el ácido linoleico el principal ácido graso. Además, se sabe, que el contenido de lípidos de la cáscara es más alto que el de la pulpa (fracción lipídica contiene 44.7% de ácido linoleico y 29.3% de ácido palmítico (Padmaja, 2009).

Las raíces de camote son ricas en carotenoides y contienen cantidades importantes de tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido pantoténico (B5) y vitamina E (Hu et al., 2016). Dentro de los carotenoides, el β -caroteno es el pigmento más abundante (provitamina A) en el camote y las variedades pulpa anaranjada pueden contener hasta 16 mg/100 g (base fresca).

La composición mineral en camote es de: P, Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Cr, Ni y Zn y elementos tóxicos: Cd y Pb, en tres variedades de pulpa (blanca, roja y naranja). Comparando las concentraciones de minerales con otras hortalizas se ha demostrado que los camotes tienen mayor concentración en: Mg, Na y P que la zanahoria y el repollo; K, Mg y Na que la berenjena; Cu y Mn que la zanahoria y contenidos similares de Fe que la col (dos Santos et al., 2019).

El contenido de nutrientes de las hojas de camote difiere de acuerdo con la variedad, fechas de cosecha, cultivo y métodos de cocción. En peso seco, las hojas de camote contienen proteína (25-37 %), carbohidratos (42-61 %), lípidos (2-5 %), fibra dietética total de 23-38 %, ácido ascórbico (60-200 mg/100 g) y caroteno (60-120 mg/100 g). Son también ricas en calcio (230-1,958 mg/100 g), hierro (2-22 mg/100 g), potasio (479-5230 mg/100 g) y magnesio (220-910 mg/100 g) (Truong et al., 2018). La concentración de minerales esenciales de las hojas de camote como Fe, Ca y Mg, incluidos los oligoelementos esenciales (Cr, Co, Ni, Cu y Zn) son similares a los de los vegetales de hojas verdes comunes. En algunas especies de hojas la proporción de K, Na, así mismo, de Se y Mg es más alto que en otras



verduras de hoja verde: como la espinaca y la espinaca de agua (Taira, Taira, Ohmine, & Nagata, 2013).

Contienen un alto nivel de compuestos fenólicos (1.4-17.1 mg /100 g de peso seco) y antocianina. Las hojas de camote frescas son muy ricas en luteína (38-51 mg/100 g), niveles que son más altos que en las verduras que se conocen como fuente de luteína, como la col rizada (38 mg /100 g) y espinaca (12 mg/100 g) (Truong et al., 2018). Por lo que algunos investigadores señalan, que las hojas de camote son superiores en términos de funcionalidad asociada a la salud en comparación con los pecíolos, tallos, raíz tuberosa y con muchas otras verduras de hojas comerciales (Tang et al., 2021).

4.5 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los camotes, dependiendo del color de la pulpa, contienen una gran diversidad de metabolitos secundarios tales como carotenoides, ácidos fenólicos y antocianinas con innumerables efectos favorables sobre la salud humana.

4.5.1 Carotenoides

Los carotenoides son sintetizados de novo por las plantas, donde desempeñan papeles fisiológicos fundamentales como pigmentos fotosintéticos y precursores para moléculas de señalización. La absorción intestinal de carotenoides y lípidos están mediados por un receptor eliminador intestinal clase B tipo I (SR-BI). Dos reacciones principales que involucran los carotenoides dietéticos se encuentran en los tejidos de los vertebrados descritos en la Figura 11.

También, los carotenoides son componentes esenciales de una dieta saludable y funcionan como antioxidantes y precursores de vitamina A. Cabe destacar que la deficiencia de



vitamina A es un problema de salud pública en los países en vía de desarrollo (Giuliano, 2017).

El camote es uno de los cultivos con mayor concentración de β -caroteno y por tanto una alternativa de alimentación para dichos países. Varios estudios en África han encontrado que los camotes contienen entre 100-1600 microgramos de equivalentes de actividad de retinol (RAE) de vitamina A en cada 3.5 onzas; lo suficiente para cubrir el 35% de todas las necesidades de vitamina A y en muchos casos, contienen suficiente RAE para cubrir más del 90% de las necesidades de vitamina A (Mohanraj & Sivasankar, 2014).

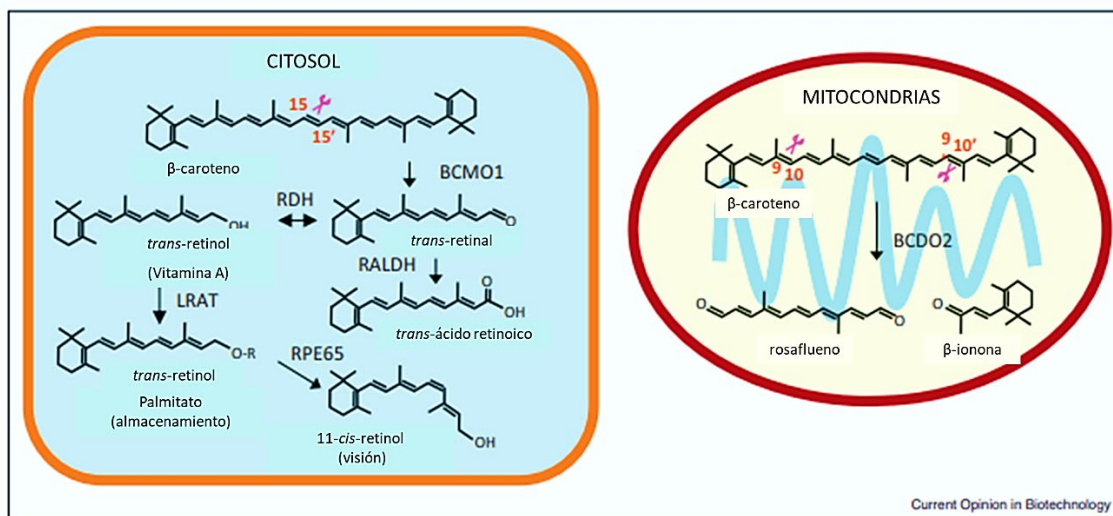


Figura 11 Metabolismo de los carotenoides y retinoides en vertebrados. BCMO1: β -caroteno 15,15'-monooxigenasa; BCDO2: β -caroteno-9',10'-dioxigenasa; RDH: retinol deshidrogenasa; RALDH: deshidrogenasa retiniana; LRAT: lecitina retinol aciltransferasa; RPE65: proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario de la retina (Giuliano, 2017).

Los principales carotenos y derivados epóxidos identificados en los camotes incluyen: β -caroteno (86.35 %), fitoeno (2.55 %), fitoflueno (1.95 %), ζ caroteno (1.77 %), α -caroteno (0.9 %), α -caroteno 5', 6'-epóxido (1.05 %), luteocromo (0.21 %), mutacromo (0.84 %), γ -



caroteno (0.77 %), cis - γ -caroteno (0.13 %), aurocromo (0.05 %), β -caroteno 5,6,5', 6'-diepóxido (0.05 %) y ocho desconocidos (Lim, 2016).



Figura 12 Ejemplares de camote amarillo y naranja (Mitra, 2012).

Otros investigadores señalan que el contenido total de carotenoides, así como el perfil de estos, varía de acuerdo con el color de la pulpa

(Figura 12); en cultivares de pulpa amarilla oscila entre 1.3-3.9 mg /100 g de peso seco, y en cultivares de pulpa naranja de 13.5-39.9 mg/100 g de peso seco. El perfil de carotenoides es el siguiente: β -caroteno 5,8;5',8'-diepóxido (32-51 %) y β -criptoxantina 5,8-epóxido (11-30 %) en variedades de pulpa amarilla, mientras que el β -caroteno (80-92%) es dominante en cultivares de pulpa anaranjada. Adicionalmente, se han identificado nuevos carotenoides con un 5,6-dihidro-5,6-dihidroxi- β -terminal denominado ipomoeaxantinas A, B, C1 y C2 (Ishiguro, Yoshinaga, Kai, Maoka, & Yoshimoto, 2010) (Figura 13 (Ishiguro, 2019)).

Por otro lado, las hojas de la planta de camote son una excelente fuente de luteína con concentraciones de 34-68 mg/100 mg según la variedad. Esto coloca a las hojas de camote en segundo lugar en contenido de luteína después de las flores de margarita, y en el número uno entre las verduras comestibles. La luteína, un carotenoide antioxidante (3,3'-dihidroxi-D-caroteno), se ha identificado puede retrasar la aparición de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) (Lim, 2016) (Anjali Krishna, Pragalyaashree, & Balamurugan, 2018).



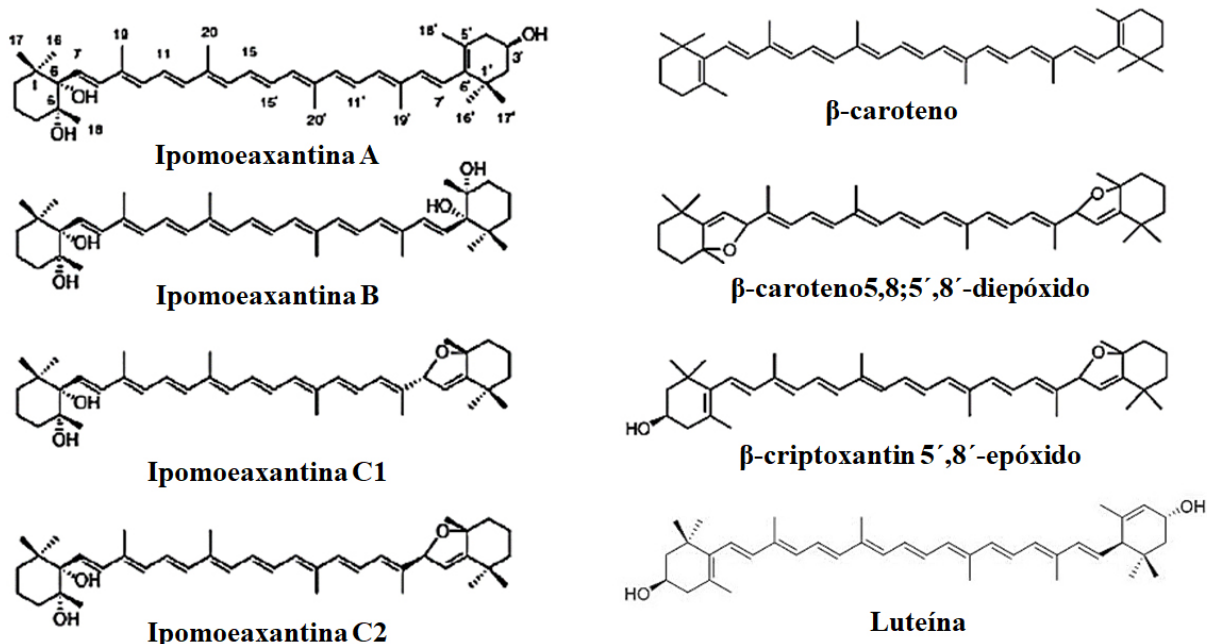


Figura 13 Estructura de los carotenoides de camote. A) Ipomoeaxantinas A, B, C1 y C2. B) β - caroteno, β - caroteno-5,8;5',8'-diepoxido y β -criptoxantina-5,8-epoxido (Ishiguro, 2019).

4.5.2 Fenoles

A escala mundial, los productos básicos más importantes respecto al contenido de polifenoles y que se consumen en grandes cantidades son: el té verde, el té negro, el vino tinto, el café y el cacao. Por lo general, las frutas, especialmente las verduras, quedan en un segundo lugar debido a que su contenido es mucho menor (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009); sin embargo, la planta de camote contienen concentraciones equiparables o superiores a dichos alimentos.

Toda la planta de camote, en todos sus colores, contiene cantidades importantes de fenoles, y las concentraciones de estos pueden variar de acuerdo con el órgano, variedad, cultivo, madurez y época de año. El centro de la raíz suele tener concentraciones de fenoles más bajas que la corteza circundante o la piel. Respecto al color de la pulpa, se ha demostrado que los camotes morados contienen valores más altos de fenoles totales, de dos a tres veces más, que



las variedades de color, amarillo, naranja o blanco (A. Wang et al., 2018). Las raíces y hojas pequeñas y/o jóvenes presentan niveles más altos. En general, las hojas contienen niveles considerablemente más altos que las raíces, aproximadamente dos órdenes de magnitud más que los encontrados en una raíz promedio (Jung, Lee, Kozukue, Levin, & Friedman, 2011). Estudios previos han descrito que, en 1389 genotipos de camote recolectados de todo el mundo, existe una amplia variación, en relación con sus constituyentes polifenólicos totales e individuales.

El contenido total de polifenoles de la hoja de camote oscila entre 1.42-17.1 g/100 g de peso seco (Islam et al., 2002); y la distribución de fenoles en la hojas es del 70% de derivados del ácido cafeoilquínico y hasta el 20% de flavonoides (T. Mu, Sun, Zhang, & Wang, 2017a).

Los fenoles se dividen en dos grupos: flavonoides y de naturaleza diferente a este grupo (Thakur et al., 2020). Los flavonoides se componen de: flavonoles como catequinas y proantocianidinas, flavonas, iso-flavonas y antocianinas. Mientras que dentro de los segundos se encuentran los ácidos fenólicos como: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos y derivados (fenilpropanoides).

4.5.2.1 Ácidos fenólicos

Es bien conocido que, dentro del grupo de fenoles, la planta de camote está constituida principalmente por ácidos hidroxicinamoilquínicos, también denominados derivados de ácido cafeoilquínico (derivados-ACQ) (las estructuras se muestran en la Figura 14); de los cuales son mayoritarios los ácidos: clorogénicos, varios cafeoilquínicos, di-cafeoilquínico, y tri-cafeoilquínico.



Los derivados de ACQ son una gran familia de ésteres formados entre el ácido quínico y de uno a cuatro residuos de ciertos ácidos *trans*-cinámicos, comúnmente: cafeico, *p*-cumárico y ferúlico, también se encuentran ácidos sinápico y dimetoxicinámico y en algunas especies de plantas varios ácidos alifáticos pueden reemplazar a uno o más de los residuos de ácido *trans*-cinámico (Zheng & Clifford, 2008a). Teniendo en cuenta la identidad, número y posición de los residuos acilo en este grupo de compuestos se pueden distinguir:

- Monoésteres de ácido cafeico, *p*-cumarico y ferúlico: ácidos cafeoilquínicos (CQ).
- Ácidos *p*-cumaroilquínicos (pCoQ) y ácidos feruloilquínicos (FQ), respectivamente.
- Diésteres, triésteres y el tetraéster simple del ácido cafeico: diCQ, triCQs y tetraCQ.
- Diésteres mixtos de ácido cafeico y ferúlico o ácido cafeico y sinápico: ácidos cafeoilferuloilquínicos (CFQ) y ácidos cafeoilsinapoilquínicos (CSiQ).
- Ésteres mixtos que implican diversas permutaciones de uno o tres residuos de ácido cafeico con uno o dos residuos de ácido alifático dibásico, como: glutárico, oxálico, succínico.

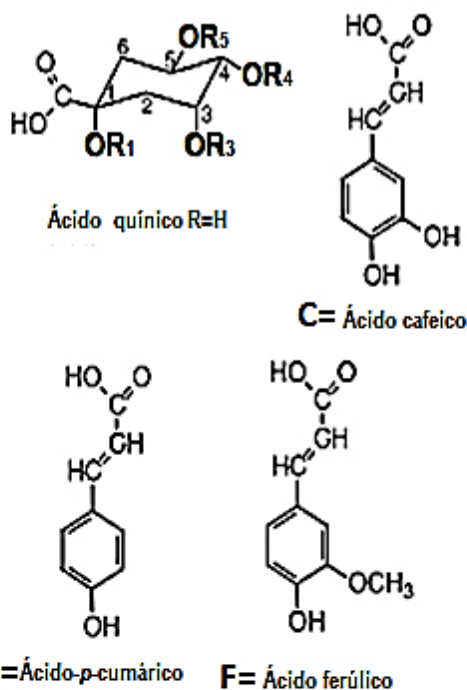
Los derivados de ACQ presentan propiedades fisicoquímicas muy diferenciadas que dependen de la identidad, número y posición de los residuos acilo esterificados con el ácido quínico, así como de los grupos funcionales presentes en la fracción aromática de los residuos acilo. Los ácidos mono-CQs y en particular lo diCQs, son más solubles en los alcoholes inferiores o mezclas de alcohol y agua. Son insolubles en disolventes lipofílicos como C₆H₆, CHCl₃ y (C₂H₅)₂O. Los diCQ, además de los alcoholes inferiores, se disuelven en C₄H₈O₂, C₆H₁₂O₂ y C₃H₆O. Teniendo en cuenta la posición del residuo de acilo en el ácido quínico del ácido mono-CQ, la solubilidad en agua disminuye en la secuencia: 1->3- >4- >5-. Aunque, el orden de elución observado con frecuencia de los mono-CQ en cromatografía



líquida en fase reversa es el siguiente: 1-, 3-, 5- y finalmente 4-. Para los diCQ ($C_{25}H_{24}O_{12}$), el orden se puede presentar de la siguiente manera: 1,3- >1,4- >3,4- >1,5- >3,5- >4,5- (Wianowska & Gil, 2019).

La distribución de los derivados de ACQ no se encuentra de manera uniforme en las plantas, y en el caso del camote, algunos autores señalan que la distribución es la siguiente de mayor a menor: hoja > tallo > flor con concentraciones de 39.34 -154.05 mg/g peso seco (Jeng, Lai, Liao, Lin, & Sung, 2015a). En las hojas de camote la proporción de ácidos hidroxicinamoilquínicos es la siguiente: 3,5-diCQ > 4,5-di-CQ > 3-CQ > 3,4-diCQ > 3,4,5-triCQ > ácido cafeico (Islam et al., 2002).





Ácido	Número	R1	R3	R4	R5
3-O-cafeoilquínico	1	H	C	H	H
5-O-cafeoilquínico	2	H	H	H	C
4-O-cafeoilquínico	3	H	H	C	H
3-O-feruloilquínico	4	H	F	H	H
5-O-feruloilquínico	5	H	H	H	F
4-O-feruloilquínico	6	H	H	F	H
3,4-di-O-cafeoilquínico	7	H	C	C	H
3,5-di-O-cafeoilquínico	8	H	C	H	C
4,5-di-O-cafeoilquínico	9	H	H	C	C
3-O-feruloil,4-O-cafeoilquínico	10	H	F	C	H
3-O-cafeoil,4-O-feruloilquínico	11	H	C	F	H
3-O-feruloil,5-O-cafeoilquínico	12	H	F	H	C
3-O-cafeoil,5-O-feruloilquínico	13	H	C	H	F
4-O-feruloil,5-O-cafeoilquínico	14	H	H	F	C
4-O-cafeoil,5-O-feruloilquínico	15	H	H	C	F

Figura 14 Estructura de los ácidos hidroxicinamoilquínicos identificados en camote (Zheng & Clifford, 2008a).

Los derivados de ACQ tienen varias propiedades biológicas, tales como actividades hepatoprotectoras y coleréticas, propiedades antioxidantes, antivirales, antibacterianas, anticancerígenas y antiinflamatorias, modulación de la expresión génica de enzimas



antioxidantes, reducción del riesgo de la enfermedad cardiovascular mediante la supresión de la expresión de P-selectina en las plaquetas y la reducción del riesgo relativo de diabetes tipo 2 y enfermedad de Alzheimer (Wianowska & Gil, 2019). Y se han realizado diversos estudios de las propiedades funcionales de los derivados de ACQ aislados de la planta de camote como:

1) Antimutagenicidad: los derivados del ácido cafeoilquínico inhiben de manera efectiva la mutación inversa inducida por Trp-P-1 en *Salmonella typhimurium*. (Cuadro 1) (Yoshimoto et al., 2002)

Cuadro 1 Efecto de los derivados del ácido cafeoilquínico de las hojas de camote sobre la mutagenicidad de Trp-P-1 contra Salmonella typhimurium.

Muestra	Dosis (mM)	His+ revertida (/placa)	Inhibición (%)
5-CQ	0.14	369 ± 5	29
	0.29	335 ± 23	35
	0.57	307 ± 15	41
3,4-diCQ	0.14	317 ± 6	39
	0.29	267 ± 6	48
	0.57	211 ± 13	59
3,5-diCQ	0.14	391 ± 19	25
	0.29	283 ± 13	45
	0.57	213 ± 20	59
4,5-diCQ	0.14	350 ± 14	32
	0.29	241 ± 27	54
	0.57	200 ± 9	61
3,4,5-triCQ	0.14	281 ± 27	46
	0.29	137 ± 22	74
	0.57	85 ± 6	84

2) Aceleración en las actividades sobre la producción de ATP: se mostrado que el ácido 3,4,5-triCQ presenta la mayor actividad aceleradora en la producción de ATP con respecto a los diCQ. Se sugirió que los grupos cafeóilo unidos al ácido quínico son importantes para la actividad y cuantos más grupos cafeóilo están unidos al ácido quínico, exhiben mayor actividad de aceleración en la producción de ATP (Miyamae, Kurisu, Han, Isoda, & Shigemori, 2011).



3) Actividad antiviral: los ácidos 3,4,5-triCQ y 4,5-diCQ han mostrado actividad como inhibidores selectivos de la infección por VIH y VIS de linfocitos T4 en cultivo. Con un mayor índice de selectividad el 3,4,5-TriCQ. Este compuesto también exhibió una inhibición altamente selectiva de replicación del virus del herpes simple tipo 1, con datos comparables a la del ganciclovir (Mahmood et al., 1993).

4) Actividad inhibidora de la aldosa reductasa: estudios muestran que la mayor actividad la presenta el 3,4,5-triCQ seguida por el 3,4-di-CQ = 3,5-di-CQ > 4,5-di- CQ > 5-CQ. Estos resultados indican que el ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquínico es el componente más bioactivo (Kurata, Yahara, Yamakawa, & Yoshimoto, 2011).

Todas estas actividades sugieren que el número de grupos cafeoil unidos al ácido quínico desempeñan un papel importante en la funcionalidad biológica, es decir, a mayor número de ácidos cafeoil, la actividad biológica es más eficiente.

4.5.2.1 Flavonoides

Los flavonoides tienen una estructura C6-C3-C6 y constan de quince átomos de carbono con anillos aromáticos A y B unidos por un anillo C heterocíclico. Según el patrón de sustitución del anillo C, se clasifican en seis grupos: flavonas, flavanonas, flavanoles, flavonoles, isoflavonas y antocianidinas. Se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y se someten a diversas modificaciones químicas como la hidroxilación, glicosilación y metilación para formar sus respectivos derivados (Kumar, 2017).

Los flavonoles están ampliamente distribuidos en órganos enteros de verduras, frutas y cereales, y son especialmente abundante los vegetales de hojas verdes. Por lo general, están presentes como glucósidos basados en agliconas como: kaempferol, quercetina, miricetina, isorhamnetina y ramnetina. La quercetina-3-o-glucósido como: rutina, isoquercitrina y



quercitrina, son los principales flavonoides en plantas comestibles. Se encuentran relativamente grandes cantidades en el arándano, la manzana, la col rizada, la lechuga, el rojo pimienta y las hojas de camote (Terahara, 2015).

En el caso de la planta del camote; las hojas de camote contienen más flavonoides totales (más del doble) que las raíces. Siendo la quercetina, el flavonoide más abundante en toda la planta y comprende del 55% al 79% del total de flavonoides, seguida de la apigenina (solo en hojas), luteolina, miricetina y kaempferol (Figura 15) (Ojong et al., 2008). Otras investigaciones revelan la presencia de hasta 29 flavonoides en cultivares de diferentes variedades de color de camote. Los perfiles de flavonoides indican que los mayoritarios son: la quercetina y el crisoeriol (derivado de la luteonina) y los valores son más altos en los camotes de color naranja y morado que en los blancos (A. Wang et al., 2018).

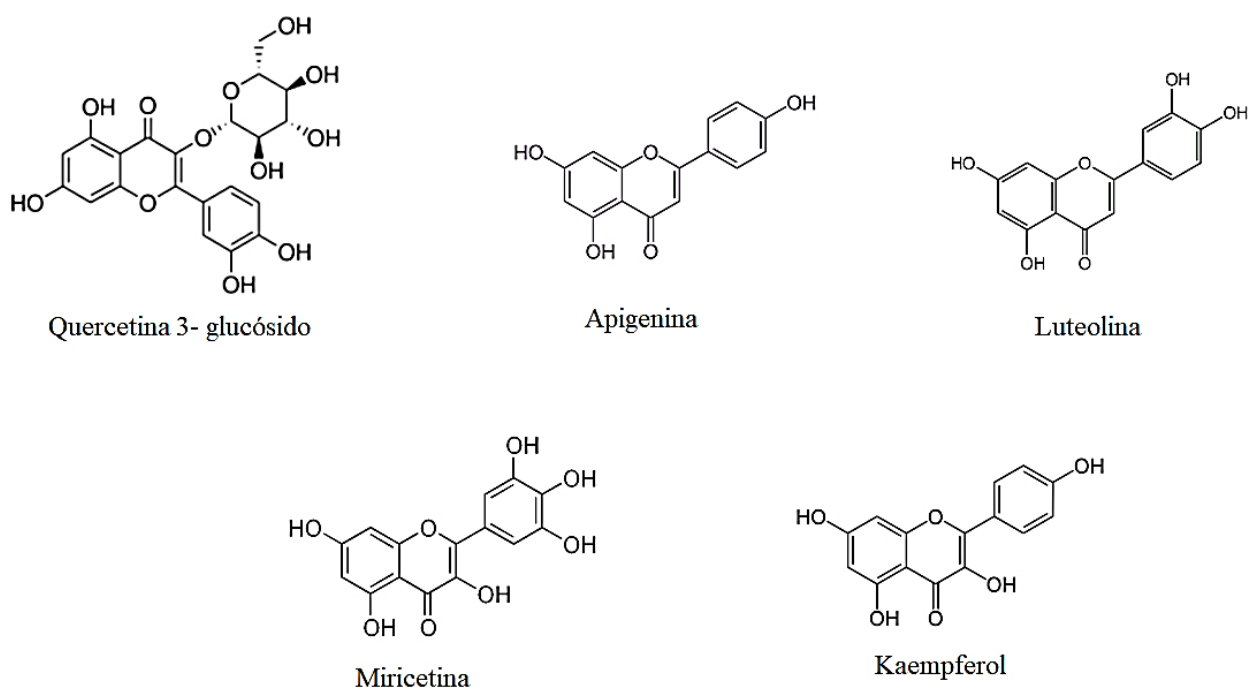


Figura 15 Estructuras de los flavonoides identificados en camote.



Se ha demostrado, que los extractos de hojas de camote tienen un fuerte efecto como eliminador de DPPH. Su actividad de barrido en radicales superóxido, es más fuerte que el de la rutina, y la actividad en la eliminación del radical hidroxilo es más alto que el de la rutina y la vitamina C. Además, los extractos de flavonoides muestran una fuerte actividad antioxidante en el sistema modelo de ácido linoleico (Ding et al., 2010).

4.5.2.3 Antocianinas

Las antocianinas son el grupo de pigmentos más importante, después de la clorofila, que son visibles. Químicamente, las antocianinas son flavonoides (flavanos) y, en consecuencia, se basan en un esqueleto C₁₅ con un anillo cromano que lleva un segundo anillo aromático B en la posición 2 (C6-C3-C6) y con uno o más moléculas de azúcar unidas en diferentes posiciones hidroxiladas de la estructura básica. Las antocianinas son glucósidos sustituidos de sales de fenil-2-benzopirilio (antocianidinas). La estructura básica de antocianina C6-C3-C6 es la fuente de infinidad de colores producidos por su combinación química con glucósidos y/o grupos acilo, así como por su interacción con otras moléculas y/o condiciones del medio (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

La estabilidad de las antocianinas en una matriz alimentaria depende de varios factores, como: su estructura química, temperatura, pH, intensidad de luz, disponibilidad de oxígeno y contenido sólido. Respecto a su estructura química, la estabilidad de las antocianinas está influenciada por los sustitutos en el anillo B y la presencia de grupos hidroxilo (-OH) o metoxilo (-OCH₃) y a su vez por la co-pigmentación. (Sui, Zhang, Jiang, & Zhou, 2018) (Giusti & Wrolstad, 2003)



La co-pigmentación es un fenómeno durante el cual los pigmentos y otros compuestos orgánicos incoloros o iones metálicos forman asociaciones moleculares o complejas (los copigmento más eficientes que se han identificado son los flavonoides y los ácidos fenólicos). La estabilización a los cambios de pH, tratamiento térmico y exposición a la luz, de las antocianinas podría mejorarse mediante co-pigmentaciones intramoleculares e intermoleculares, autoasociación y complejos metálicos (Figura 16).

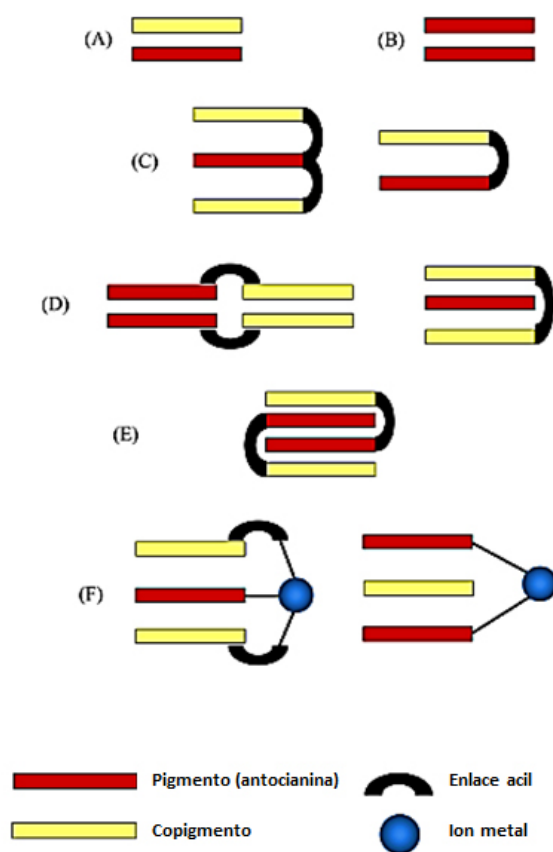


Figura 16 Interacciones de apilamiento en antocianinas y sus complejos $\pi-\pi$. (A) copigmentación intermolecular, (B) autoasociación, (C) copigmentación intramolecular en antocianinas aciladas, (D) autoasociación de antocianinas aciladas, (E) intercalación en copigmentación intermolecular, y (F) copigmentación en complejos de metal-antocianina (Trouillas et al., 2016)

La planta de camote tiene cantidades importantes de antocianinas en todos sus órganos, pero hay una mayor concentración en las raíces de la pulpa morada (Yuzhi Jiao, 2012), con concentraciones alrededor de 802-1747 mg/kg de peso fresco. A la fecha se han reportado



31 antocianinas, formadas principalmente de derivados de 3,5-diglucósidos de la cianidina y peonidina, acilados con ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido ferúlico o ácido cafeico; en cantidades y perfiles diversos de acuerdo con la variedad y órgano de la planta de camote (algunas estructuras se muestran en la Figura 17); por ejemplo, se sabe que las antocianinas de la raíz están compuesta por una mayor proporción de peonidina, mientras que en las hojas hay una mayor proporción de cianidina (Vishnu et al., 2019a). Estos pigmentos acilados constituyen más del 98% del contenido total de antocianinas(Li et al., 2013), mostrando una alta estabilidad del pH, térmica, actividad antioxidante y antimutagenicidad (H. W. Kim et al., 2012a).

Algunos estudios indican que el contenido de antocianinas en camotes morados nativos es baja; por lo que en las últimas décadas han modificado variedades para aumentar la producción de antocianinas en los raíces, entre ellas, los cultivares más importantes son las variedades 'Yamagawamurasaki' y 'Ayamurasaki' que se cultivan en Japón (Cuevas, Silke, & Peter, 2011). Con ellos, se ha logrado que el alto contenido de antocianinas combinado con la alta estabilidad del color proporcionar una alternativa más saludable a los colorantes sintéticos como el rojo FD&C 40 (Montilla et al., 2010) .



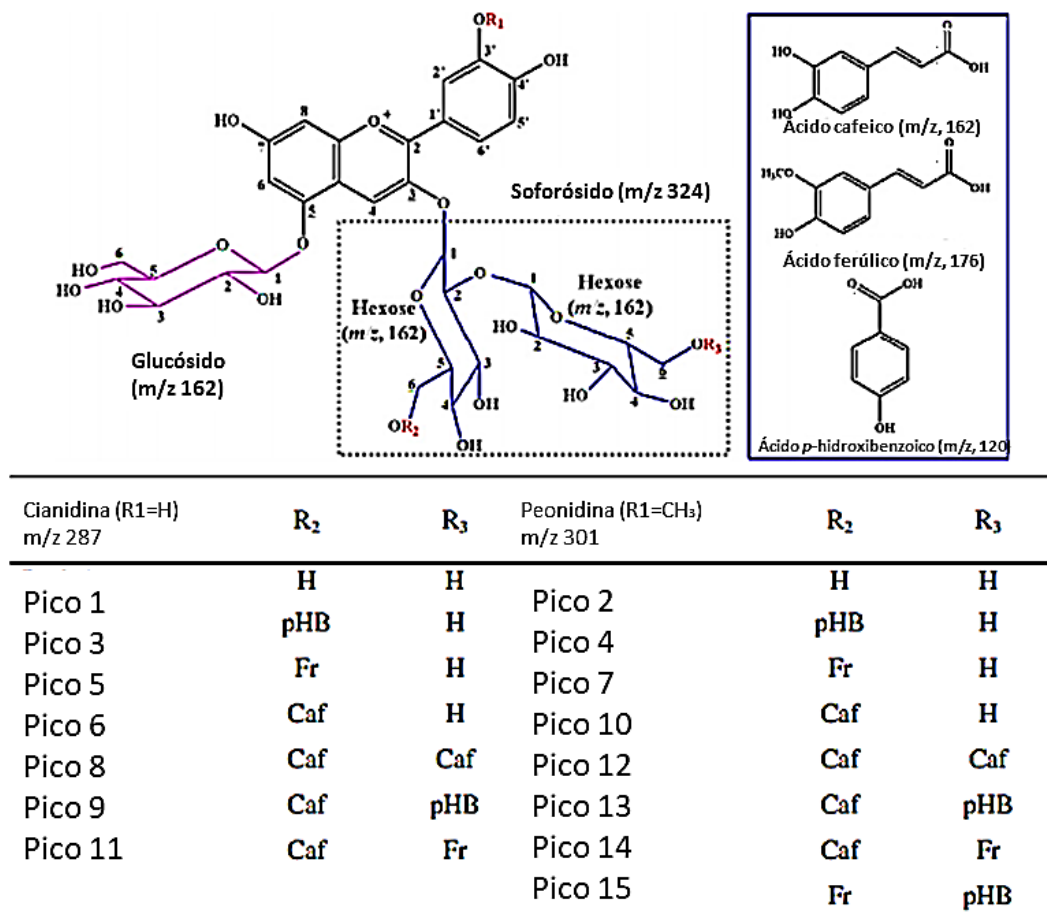


Figura 17 Estructura de las antocianinas de camote morado (H. W. Kim et al., 2012a).

Las antocianinas de camote morado poseen diversos beneficios saludables que incluyen propiedades antioxidantes, propiedades antineoplásicas, así como propiedades anticancerígenas (Yuzhi Jiao, 2012) y hepatoprotectoras (L. Wang et al., 2017). Por ejemplo, se han demostrado múltiples funciones fisiológicas en extractos de antocianinas de camote morado de la variedad "Ayamurasaki" como son las actividades de captación de radicales libres, antimutagénica, inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina e inhibidora de la α -glucosidasa *in vitro*. Además, también han mostrado un efecto mejorador sobre la lesión hepática inducida por el tetracloruro de carbono y la disminución de los niveles de glucosa en sangre posprandial en ratas (Suda et al., 2003).



Otros estudios han demostrado que las antocianinas de raíces moradas y hojas exhiben propiedades antiproliferativas potenciales para las células cancerosas MCF-7, HCT-116 y HeLa y la estructura de las antocianinas tiene un papel crítico en ellas; ya que las antocianinas de las hojas muestra una actividad mayor contra las células de cáncer de cuello uterino y de colon, mientras que las antocianinas de las raíces tienen un efecto ligeramente mayor contra las células de cáncer de mama (Vishnu et al., 2019b).

Para dilucidar la contribución de estas actividades a funciones fisiológicas es necesario estimar la capacidad de absorción, por lo que ya se ha evaluado la bioavilidad de las antocianinas en humanos y ratas; administrados con una bebida preparada a partir de un extracto de la raíz morada Y dos componentes principales de antocianina (la cianidina y peonidina aciladas con ácido cafeico) se detectaron en el plasma y la orina de ratas y seres humanos. La concentración plasmática de antocianinas en humanos alcanzó un máximo de 90 minutos después de la ingestión, y la recuperación de antocianinas en la orina se estimó en 0.01–0.03 % (Harada, Kano, Takayanagi, Yamakawa, & Ishikawa, 2004).

4.5.3 Otros compuestos bioactivos (cumarinas, alcaloides, triterpenos y glicolípidos)

En la planta de camote también se han encontrado otros compuestos como: las cumarinas, alcaloides, triterpenos y glicolípido con propiedades biológicas importantes (Figura 18).

Dentro del grupo de cumarinas identificadas en la planta de camote se encuentran la umbiliferona, escopoletina y aesculetina (Mohanraj & Sivasankar, 2014). Se ha detectado que las hojas las acumulan después de la aplicación de algún estrés biótico y/o abióticos (Peterson, Harrison, Jackson, & Snook, 2003). Estas cumarinas, tienen propiedades anticoagulantes e inhiben la replicación del VIH. La escopoletina también posee efecto



hepatoprotector (Kang, Sung, Park, & Kim, 1998), antioxidante, espasmolítico, y actividades inhibitoras de la acetilcolinesterasa, así como la proliferación inhibida al inducir la apoptosis de células de adenocarcinoma de próstata independientes de andrógeno (PC3) humanas (Liu, Zhang, Fu, Chen, & Qian, 2001).

Los alcaloides identificados en la planta de camote son la calistegina B1, B2 y B3. Las calisteginas B1 y B2 han presentado potente actividad inhibitora de la β -glucosidasa lisosómica de rata, mientras que la calistegina B3 presenta actividad inhibitoria moderada hacia α - y β -manosidasas de rata (Meira, Silva, David, & David, 2012).

Los triterpenos que se han aislado de la planta de camote son: acetato de boehmerol (Son, Severson, Arrendale, & Kays, 1990); friedelina, con buena actividad contra *S. aureus*, en comparación con ampicilina y amoxicilina, y buena actividad antifúngica contra *Pseudallescheria boydii*, y acetato de β -amirina, que ha mostrado propiedades anti nociceptivas pronunciadas en la prueba de contorsiones y formalina prueba en ratones (Mohanraj & Sivasankar, 2014). Recientemente se aisló un nuevo triterpenol llamado batatasenol de la piel de camote, en las que fue casi el único triterpenol presente (Giner, 2019).

Y finalmente, otros compuestos que se han aislado las raíces de la planta de camote son 5 resin glucósidos solubles en éter (jalapinas): simoninas I-V (Escalante-Sánchez, Rosas-Ramírez, Linares, Bye, & Pereda-Miranda, 2008) (Rosas-Ramírez & Pereda-Miranda, 2015). La simonina I fue el primer ejemplo de resin glucósido con ácido aromático (ácido transcinámico) como componente de ácido orgánico (Noda, Yoda, Kawasaki, & Miyahara, 1992); algunos autores señalan que los glicolípidos pueden estar relacionados con efectos anti-depresivos, relajantes (Mirón-López et al., 2007) y con acción purgante (Pereda-



Miranda & Bah, 2003). Por otro lado, de las partes aéreas de la planta, se han aislado cuatro glucósidos de resina, denominados ipomotaósidos A, B, C y D. El ipomotaósido A, ha demostrado tener efecto anti-inflamatorio equivalente a la aspirina (Yoshikawa et al., 2010).

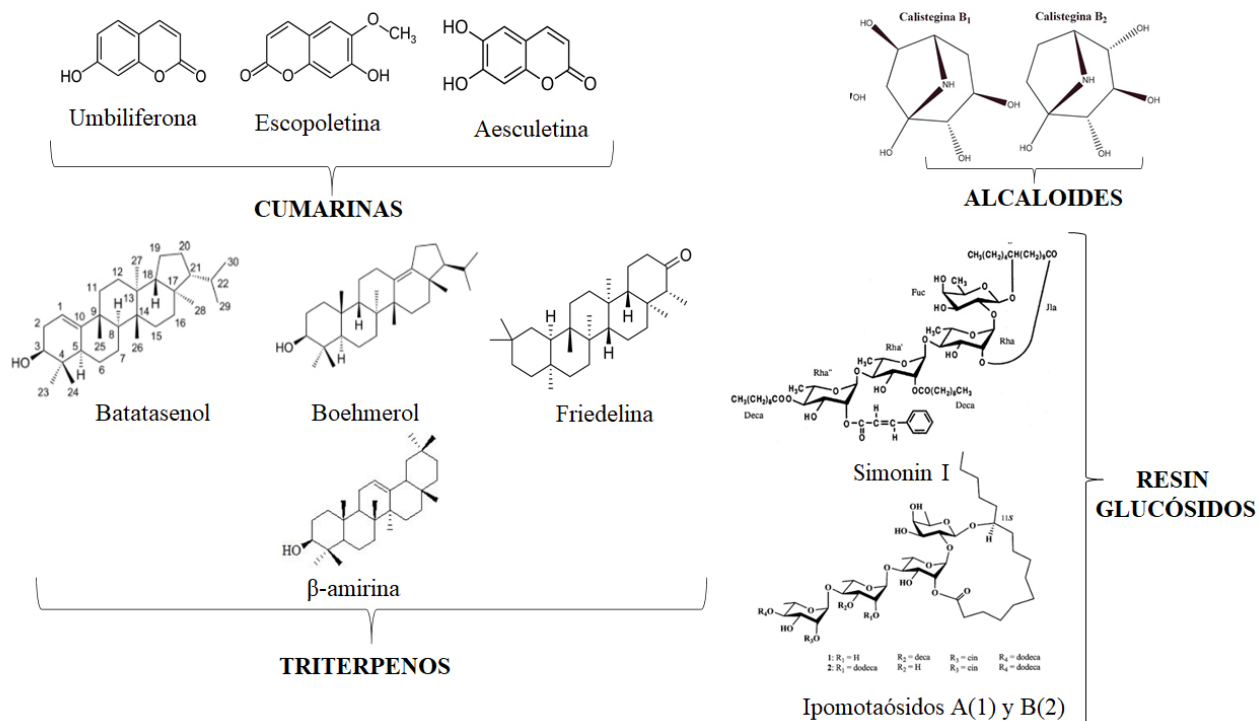


Figura 18 Otro grupo de compuestos identificados en la planta de camote.

4.6 OXIDASAS EN LOS CAMOTES

La planta de camote en cada uno de sus órganos contiene oxidasa, tales como: superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasa (PFO). Siendo las que presentan una actividad más significativa: POD y PFO en todos los tipos de raíces de almacenamiento (Y.-H. Kim et al., 2015). Se sabe que uno de los papeles de las oxidasa en las plantas son generar reacciones de polimerización como mecanismo de defensa contra patógenos, ataque de insectos y resistencia a las enfermedades (Bibhuti Bhusan Mishra, 2016).



Por lo que, al cortar las raíces y durante el almacenamiento se pueden provocar cambios de color (decoloración) y sabor, debido a la acción de las enzimas peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PPO), llamado pardeamiento oxidativo. El mecanismo de pardeamiento se intensifica después del corte, una vez que la rotura celular conduce a la interacción entre los sustratos polifenólicos y las enzimas, en presencia de oxígeno (Tribst, Leite Júnior, de Oliveira, & Cristianini, 2016). Además, la POD requiere de peróxido de hidrógeno; sin embargo, se cree que la PFO es promotora de actividad de POD, ya que se genera peróxido de hidrógeno durante la oxidación de compuestos fenólicos (Daas Amiour & Hambaba, 2016).

La decoloración provocada por el pardeamiento enzimático se considera una característica negativa, ya que causa deterioro en la calidad de la planta por alterar las características organolépticas y nutricionales (Jukanti, 2017a). Por lo que la decoloración en alimentos causa un impacto negativo en la aceptación por el consumidor, vida útil de almacenamiento y su valor.

4.6.1 Polifenoloxidasas

Las polifenoloxidasas (PFO) son enzimas binucleares a base de cobre que se encuentra en la mayoría de los organismos eucariotas y procariotas. Su función principal es la adición catalítica de oxígeno (O_2) a los sustratos fenólicos. Las PFO pertenecen al subgrupo de cobre tipo 3 de metaloproteínas; que incluyen las tirosinasas (TYR), las aurona-sintasas y las catecol-oxidasas (CO) (Pretzler & Rompel, 2018). La diferencia de estos sub-grupos dentro de las PFOs, es que tienen actividad mono- y/o *orto*-difénolica en función de su especificidad por mono-fenoles u *orto*-difénoles (Figura 19) (McLarin & Leung, 2020).



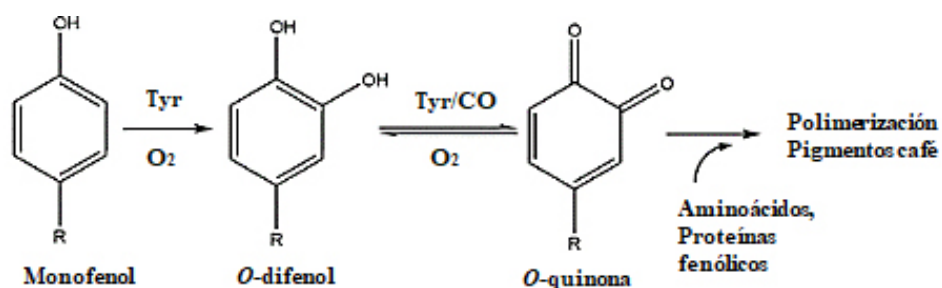


Figura 19 Reacción general de polifenoles catalizados por la tirosinasa (TYR) y catecol-oxidasa (CO). Hidroxilación lenta de mono-fenol y oxidación rápida de orto-difenoles como la realizan (TYR y CO). Ambas reacciones requieren oxígeno (O₂). La producción de quinonas sufre reacciones adicionales que acaban formando depósitos de pigmentos color marrón en los alimentos.

Las catecol-oxidasas (EC 1.10.3.1) catalizan la oxidación de dos electrones de los o-difenoles produciendo o-quinonas (sustratos más utilizados para ensayos de actividad: catecol y 4-terc-butilcatecol). Las *orto*-quinonas son bastante reactivas y, por tanto, sufren una serie de reacciones espontáneas, entre las que se encuentra la polimerización y la formación de pigmentos de color marrón o melanosis (Pretzler & Rompel, 2018), también conocido como oscurecimiento o pardeamiento enzimático (color marrón). Esta cascada de reacciones se da como mecanismo de defensa de la planta ante el ataque de microorganismo y la infección de las heridas por patógenos.

En los cereales, frutas y verduras, estos compuestos marrones disminuyen drásticamente las cualidades sensoriales y nutricionales causando un impacto económico importante. Por lo que se han sugerido diferentes estrategias para inhibir las catecol-oxidasas, que incluyen: agentes reductores, agentes quelantes, agentes acomplejantes, acidulantes, tratamientos enzimáticos (proteasas) y tratamientos térmicos (Jukanti, 2017b).

Por otro lado, la estructura cristalina de la catecol-oxidasas del camote ya se ha elucidado (Figura 20) en estado di-cúprico Cu (II) -Cu (II) en reposo, la forma di-cuprosa reducida ⁰Cu (I) -Cu (I) y en complejo con el inhibidor feniltiurea. El centro de cobre catalítico está



alojado en un haz central de cuatro hélices ubicado en un bolsillo hidrófobo cerca de la superficie. Ambos sitios de unión a metales están compuestos por tres ligandos de histidina. His 109, ligado al sitio CuA, está unido covalentemente a Cys 92 por un enlace tioéter inusual (Klabunde, Eicken, Sacchettini, & Krebs, 1998).

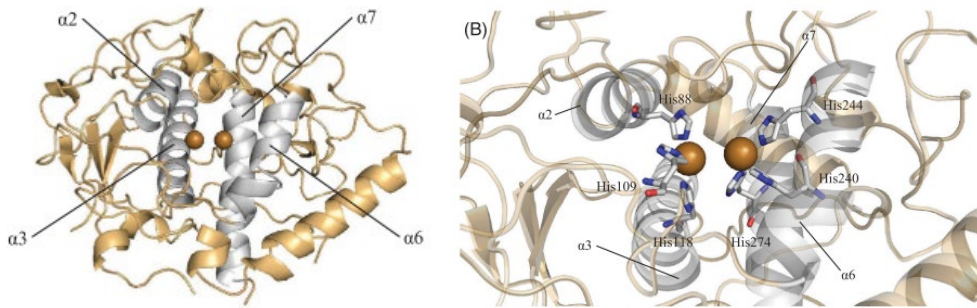


Figura 20 Estructura cristalina de la catecol-oxidasa de camote, primera estructura de PFO resuelta. (B) Primer plano del sitio activo que representa residuos de histidina conservados. His109 son cuatro residuos eliminados de $\alpha 3$; α -hélices conservadas coloreadas en gris, varillas de histidina en gris, ion de cobre en marrón y la estructura restante en naranja claro (McLarin & Leung, 2020).

Con base en los datos bioquímicos, espectroscópicos y estructurales, se ha propuesto un mecanismo catalítico de la catecol-oxidasa de camote, en el que uno de los átomos de oxígeno del sustrato di-fenólico se une al CuB de la enzima oxigenada. En la Figura 21 se muestra: a) la ruta de la reacción catalizada por la catecol-oxidasa de manera esquemáticamente en tres pasos: se oxidan dos moléculas de catecol (o sus derivados), junto con la reducción de oxígeno molecular a agua. El modo de enlace de PTU (inhibidor fenil-tiourea) se muestra en la parte inferior. b–d) Las estructuras tridimensionales para cada uno de los tres pasos de reacción, derivadas del análisis cristalográfico. Nota: El complejo ternario de la catecol-oxidasa – O_2^{2-} – CAT que se muestra en (c) es un modelo, guiado por e, el modo de unión observado por el inhibidor PTU (Klabunde et al., 1998).



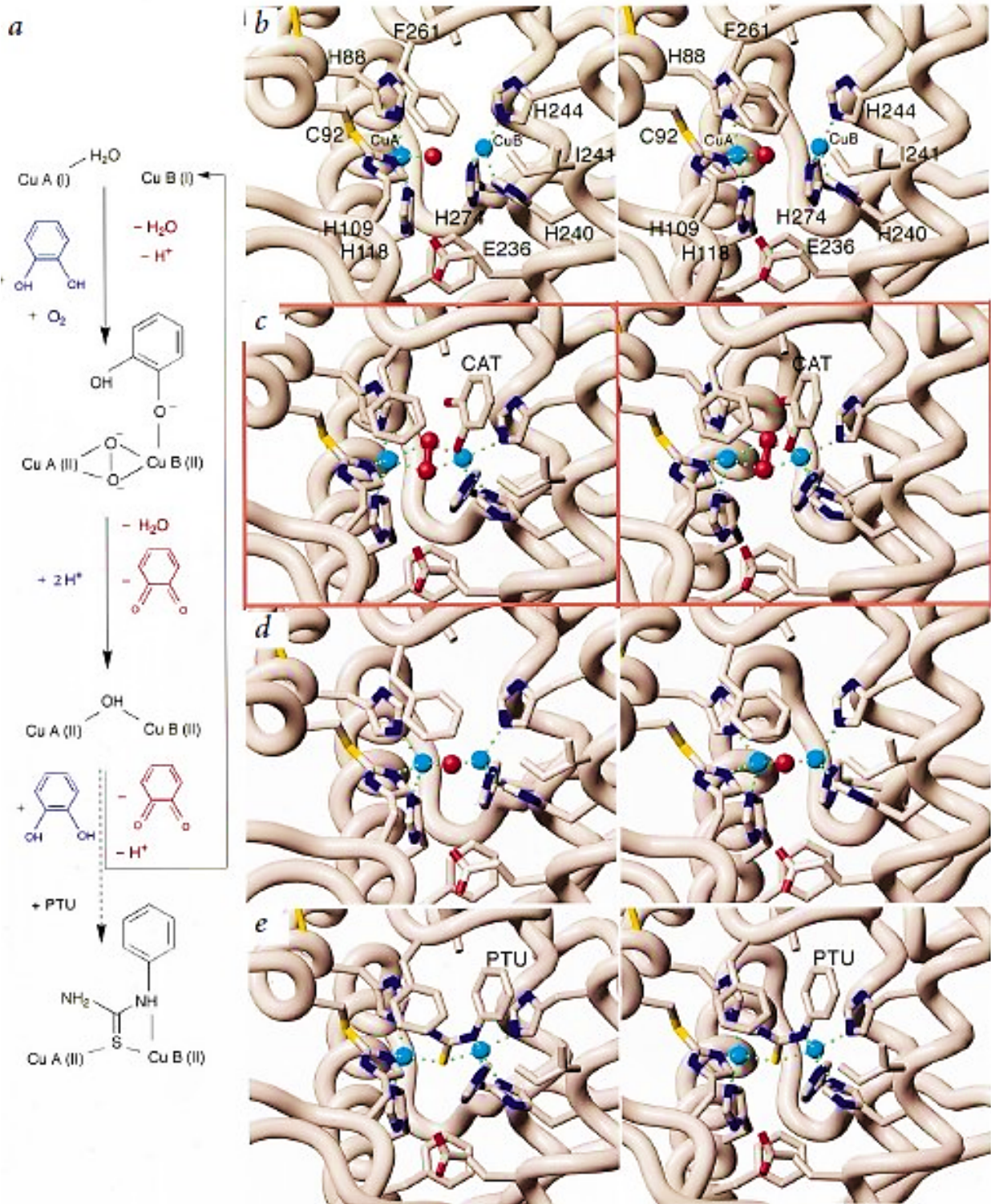
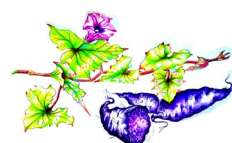
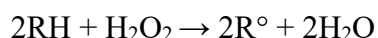


Figura 21 Ciclo catalítico de la catecol-oxidasa. (Klabunde et al., 1998).



4.6.2 Peroxidasas

Las peroxidasas (POD) (EC.1.11.1.x) son glicoproteínas con una composición de hematina como cofactor y catalizan la oxidación de una amplia gama de sustratos fenólicos y no fenólicos (RH) donantes de electrones concomitantes con la descomposición de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).



Las POD son ubicuas en la naturaleza y se encuentran en bacterias, hongos, algas, plantas y animales. Las POD vegetales, pertenecientes a la clase III de peroxidasa y están implicadas en varios procesos vitales de la planta: crecimiento y desarrollo a lo largo del ciclo de vida de la planta, incluyendo al metabolismo de la pared, lignificación, suberización, captación de especies reactivas de oxígeno (ROS), metabolismo de auxinas, crecimiento y maduración de frutos, así como de defensa contra patógenos, etc. (Pandey, Awasthi, Singh, Tiwari, & Dwivedi, 2017).

El ciclo catalítico de las POD, iniciado por la oxidación de un sustrato fenólico (Figura 22), pasa a través de los siguientes intermedios: la peroxidasa férrica (hidro) nativa (= enzima en reposo) [hemo (Fe³⁺-H₂O)] une H₂O₂ para formar un complejo de peróxido de hierro (-III) de vida extremadamente corta [hemo (Fe³⁺-O-OH)] que se escinde heterolíticamente entre los átomos de oxígeno mediante una transferencia de dos electrones desde el grupo hemo. Como resultado, se expulsa una molécula de agua y el Compuesto I, un complejo catiónico radical oxo-ferilo y hemo [hemo (Fe⁴⁺=O)], emerge y puede reaccionar con una primera molécula fenólica para dar un radical fenoxilo y el Compuesto II. Este último es un hemo oxo-ferilo [hemo (Fe⁴⁺= O)] y reacciona con la segunda molécula de sustrato dando como



resultado la formación de un segundo radical fenoxilo y la enzima férrica nativa. Es decir, dentro del ciclo típico de peroxidasa, dos moléculas de sustrato se oxidan por abstracción de un electrón (pero sin transferencia de oxígeno) mientras que se consume una molécula de peróxido de hidrógeno y se producen dos moléculas de agua (Ullrich & Hofrichter, 2007).

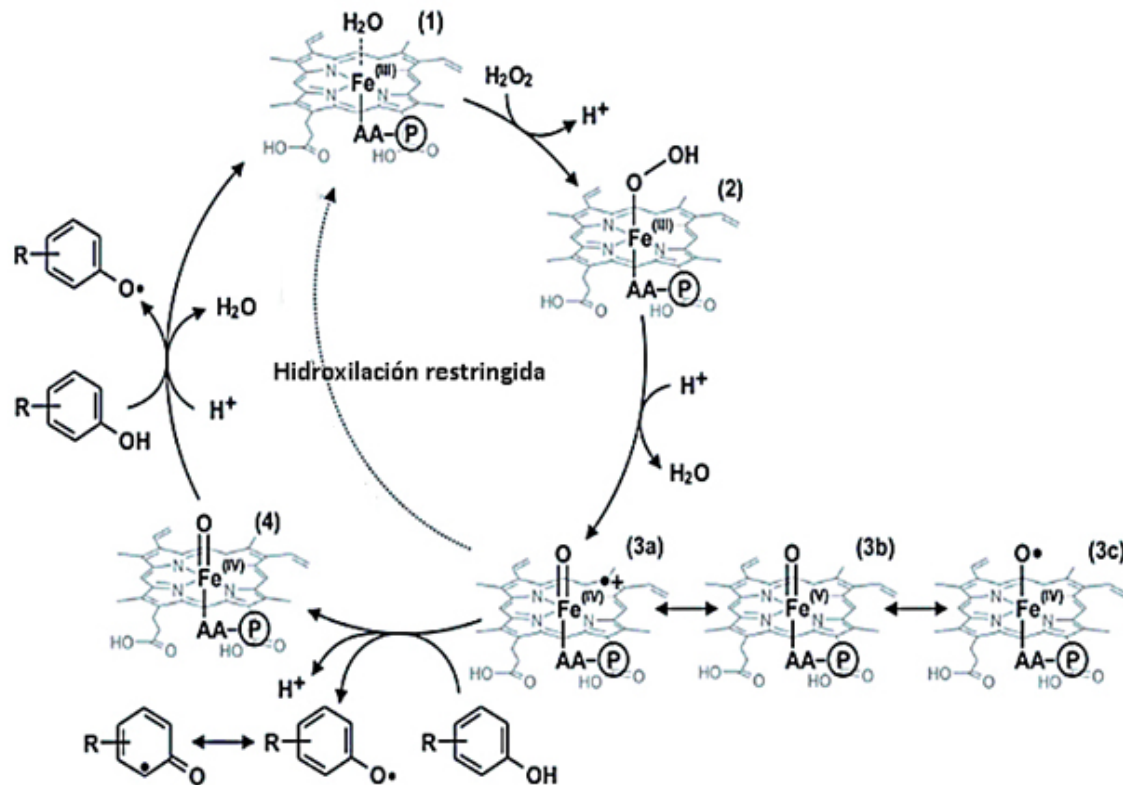


Figura 22 Ciclo catalítico de la peroxidasa por la oxidación de un sustrato fenólico. La flecha de puntos indica la capacidad de algunas peroxidasas para transferir el oxígeno del Compuesto I a un sustrato. (1) enzima (hidro) férrica nativa, (2) complejo de peróxido de hierro (III); (3a) Compuesto de peroxidasa I (complejo de radicales oxo-ferrilo) que existe en diferentes formas mesoméricas: (3b) complejo oxo-hierro (V), (3c) complejo oxo-radical ferril (IV) (4) Compuesto II (complejo oxo-ferril).



5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La planta de camote morada es una excelente fuente de metabolitos secundarios, en particular de los ácidos 5-CQ, 3,4-, 3,5-, 4,5-diCQ, 3,4,5 -triCQ y 4,5-FCQ, así como de antocianinas aciladas. Sin embargo, las oxidasas presentes comprometen la disponibilidad de estos compuestos. Y aunque el mecanismo de reacción de la PFO del camote es conocido y se sabe que la acción de ésta en las plantas induce la producción de H_2O_2 necesario para la acción de la POD, se desconoce el efecto preciso de las oxidasas sobre la mayoría de los compuestos fenólicos de la planta de camote morado. Es decir, cuánto es la pérdida de los principales metabolitos secundarios a causa de la acción de las oxidasas.

6. HIPÓTESIS

La PFO de camote es una catecol-oxidasa, es decir, oxida únicamente a los *orto*-difenoles y se conoce que el mayor grupo de fenoles del camote son derivados de ácido cafeoilquínico; por lo que se espera que la PFO sea capaz de degradar a la mayoría de los fenoles de la planta de camote morado y presenten una mayor afinidad por los compuestos con más de un sustituyente cafeoilo.

También se espera que la POD de camote sea capaz de reconocer a los fenoles mayoritarios de la planta de camote presentando mayor afinidad por los compuestos *orto*-metoxifenólicos, que los *orto*-difenoles, es decir oxide más rápido a los compuestos que contengan sustituyentes feruloilo.



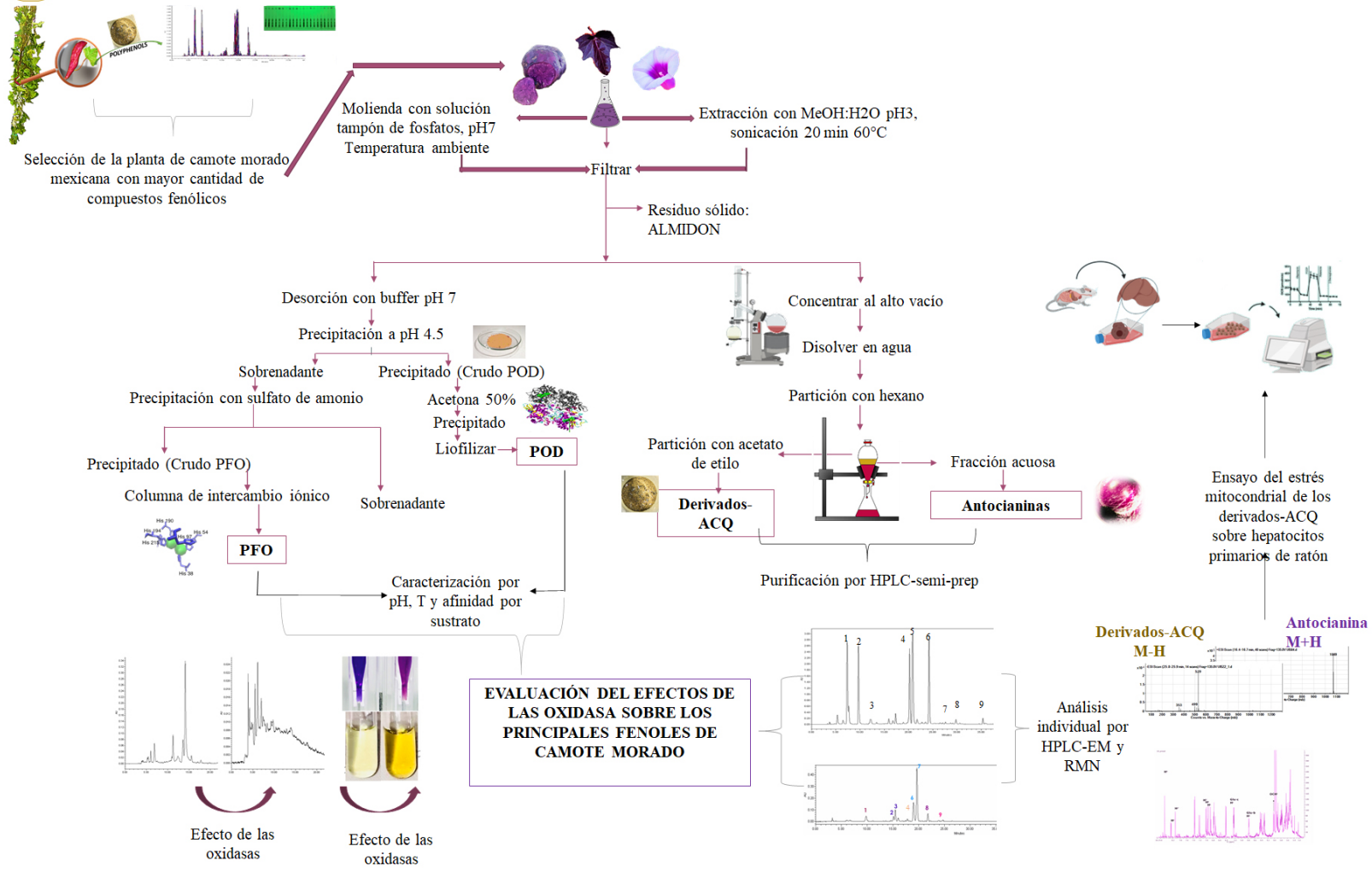
7. OBJETIVO GENERAL

Detección y caracterización de las oxidasas de *I. batatas* variedad morada mexicana (polifenoloxidasa y peroxidasa) en la etapa de madurez comercial, y evaluar el efecto de estas enzimas sobre los metabolitos secundarios presentes en mayor concentración e interés biológico (derivados de ácidos cafeoilquínico y antocianinas aciladas) en todos los órganos de la planta de camote morado (hojas, tallos, flores y raíz tuberosa).

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificación, caracterización y cuantificación de los derivados de ácido cafeoilquínico y de las antocianinas aciladas presentes en la raíz, hojas, tallos y flor de *I. batatas* variedad morada en la etapa de madurez comercial.
- Identificación y caracterización (pH, temperatura, inhibición o activación por agentes químicos y afinidad por sustrato) de la PFO y POD en *I. batatas* en la etapa de madurez comercial.
- Evaluación del efecto de la PFO y de POD sobre los derivados de ácido cafeoilquínico y de las antocianinas aciladas.





9. PROTOCOLO GENERAL



10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 MATERIAL

- ❖ Ultracongelador (Modelo ELT-13V-85 A 30)
- ❖ Liofilizadora (FreeZone liofilizado 4.5)
- ❖ Sonicador (Cole-Parmer 8892 (100 W))
- ❖ Espectrofotómetro (Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies) equipado con soportes multicelulares y controlador de temperatura.
- ❖ Rotavapor (Rotavapor Buchi)
- ❖ Columna analítica (Hypersil Gold C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m))
- ❖ Columna semi-preparativa (Hypersil Gold C18 (250x10 mm; 5 μ m))
- ❖ Amberlita (XAD-7HP)
- ❖ HPLC Waters
- ❖ HPLC-SM (Agilent 6410 Triple Quad equipado con una bomba binaria G1311A, una columna de termostato G1316A y un muestreador automático G1367E).
- ❖ RMN-400Hz (Espectrofotómetro Varian (VNMRS) de 9,4 T)
- ❖ RMN-600Hz (Espectrofotómetro Agilent DD2 600 con One NMR Probe)
- ❖ FPLC (Cromatografía Líquida de Proteína Rápida, Pharmacia Biotech)
- ❖ Intercambio iónico ($-N^+CH_3$)₃ (50 μ m, 1000 Å, Cartucho Econo-Pac High Q BIORAD))
- ❖ Equipo de evaluación mitocondrial (Agilent Technologies)



10.2 MÉTODOS

10.2.1 Material vegetal y preparación de muestras

Las hojas de 200 accesiones de la planta de camote, cultivadas en las mismas condiciones, fueron suministradas por el Centro de Conservación de especies subtropicales del Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI) SNICS-SAGARPA; ubicada en Harinas de Coatepec en el Estado de México, se recolectaron en abril de 2018, y fueron accesiones provenientes de 18 estados de la República mexicana, cada muestra contenía entre 20 y 30 hojas de aproximadamente 5 cm de largo y se almacenaron en bolsas de papel a -80°C en un ultra congelador, posteriormente se liofilizaron y se almacenaron en frascos a temperatura ambiente.

Una vez seleccionada la planta de camote morado, por región productora del país, de acuerdo con el contenido de fenoles, se obtuvieron el resto de los órganos de la planta (raíz, flores y tallos). Las raíces, flores y tallos fueron conservados a -80°C , posteriormente se liofilizaron y se almacenaron en frascos a temperatura ambiente.

Las hojas, raíces, flores y tallos secos se trituraron a un tamaño de partícula malla 60 y el polvo resultante se almacenó en botellas de vidrio ámbar para el análisis de compuestos bioactivos. Para los ensayos enzimáticos, se utilizaron cada uno de los órganos frescos y recién cosechados.



10.2.2 Análisis de compuestos fenólicos

- **Extracción de los compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se extrajeron de acuerdo al método descrito por Torres y colaboradores (Torres & Navarro, 2013) (Torres Alcalá & Navarro Ocaña, 2016) el cual consistió en extracción asistida por sonicación a 40 °C durante 20 min, se utilizó 1 g de polvo liofilizado de hojas de camote suspendido en 20 mL de mezcla de disolventes que contenía acetona: agua (40: 60) y 1 % de ácido láctico (>98%). Los resultados se expresaron en mg de fenol/g por base seca (BS). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

- **Cuantificación de fenoles totales**

Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos en las muestras, se utilizó el método previamente descrito por Taga y colaboradores (Taga, Miller, & Pratt, 1984), el cual consistió en una mezcla de 100 µL del extracto filtrado con 2 mL de Na₂CO₃ al 2% (p/v) y se dejó reposar durante 2 min. Pasado ese tiempo, se agregaron 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalten (diluido con H₂O 1: 1) y se dejó reposar durante 30 min. A continuación, se midió la absorbancia a 750 nm. Para la curva de calibración, se preparó un conjunto de soluciones estándar de ácido tánico en concentraciones que van desde 0.03-1.0 mg/mL.

El contenido de fenoles totales (FT) se determinó por comparación con la curva de calibración estándar. Los resultados se expresaron como mg FT/g de muestra BS.



- **Cuantificación de flavonoides totales**

El ensayo se llevó a cabo siguiendo el método modificado descrito por Chang y colaboradores (Chang, Yang, Wen, & Chern, 2002). Se mezcló 1 ml de extracto con 1.4 ml de H₂O y 300 µL de NaNO₃ al 5% (p/v) y se dejó reposar durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, se agregaron 300 µL de AlCl₃ al 10% (p/v), 2 mL de NaOH 1 M y 5 mL de H₂O. La absorbancia se midió a 415 nm. Para la curva de calibración, se preparó un conjunto de soluciones estándar de catequina en un rango de concentración de 0.01-0.3 mg/mL.

El contenido de flavonoides totales (FLT) se determinó mediante comparación con la curva de calibración estándar. Los resultados se expresaron como mg FLT/g muestra BS.

- **Cuantificación de antocianinas totales**

La cuantificación de antocianinas totales se determinó por el método de pH diferencial descrito por Giusti y Wrolstad (Giusti & Wrolstad, 2001). En resumen, a un tubo de ensayo que contenía 200 µL del extracto se le añadieron 1800 µL de solución amortiguadora de cloruro (0.025 M, pH 1) y se mezclaron. Se transfirieron otros 200 µL de extracto a un tubo de ensayo que contenía 800 µL de solución amortiguadora de acetatos (0.4 M, pH 4.5) y se mezclaron. La diferencia de absorbancia de ambas muestras se midió a 510 y 700 nm. El contenido total de antocianinas (AT) se calculó utilizando las ecuaciones propuestas por Giusti.

El peso molecular y la absorptividad molar usados en esta fórmula corresponden a los de cianidina-3-*o*-glucósido. Los resultados se expresaron como mg AT/g muestra BS.



10.2.3 Caracterización y cuantificación de los derivados-ACQ y de las antocianinas

- **Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Todos los análisis de identificación, cuantificación, caracterización por espectrometría de masas (EM), así como evaluación del efecto de las oxidasas en estudio sobre los principales metabolitos secundarios de la planta de camote morado se hicieron con el mismo método de HPLC analítico. Se modificó para el HPLC semi-preparativo: la columna y flujo; mientras que para el HPLC-EM: el equipo de análisis.

Las condiciones que se emplearon fueron las descritas por Torres y colaboradores (Torres Alcalá & Navarro Ocaña, 2016) y son las siguientes: se empleó una columna de selectividad Hypersil Gold C18 (250 X 4,6 mm; 5 μ m) en un sistema Waters equipado con auto-muestreador y detector UV-Visible (320 nm para derivados del ácido cafeico y 510 nm para antocianinas). La fase móvil binaria consistió en: (A) H₂O/CH₃CN/H-COOH (98%) (89: 10: 1) y (B) CH₃CN que se administró a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y un gradiente de 3-25 % B en 45 min, 30 % de B a los 47 min y 3 % de B a los 56 min.

- **Preparación de los extractos**

Se implementó un método integral para realizar extractos enriquecidos y pre-purificados de los derivados de ácido cafeoilquínico y las antocianinas; fue el mismo para cada uno de los órganos de la planta de camote. Las respectivas muestras en polvo, descritas en la sección de preparación de las muestras, se suspendieron en 2 L de una mezcla de disolvente que contenía acetona: agua: ácido láctico (40: 59: 1) y se sonicó por 20 min a 50 °C. La mezcla se concentró a presión reducida y posteriormente se disolvió en 200 mL de H₂O. Posteriormente, se realizó una extracción líquido-líquido con n-hexano (1 L) y acetato de



etilo (1 L), en esta última se recuperó la fracción orgánica (fracción enriquecida con derivados del ácido cafeoilquínico) y se concentró a presión reducida hasta obtener un sólido, se almacenó a 4 °C. Al mismo tiempo, se recuperó la fracción acuosa (fracción enriquecida en antocianinas).

- **Purificación de los derivados de ácidos cafeoilquínico**

Para obtener a cada uno de los derivados del ácido cafeoilquínico de alta pureza, se implementó el siguiente método: con la fracción enriquecida en derivados-ACQ (acetato de etilo del extracto de hojas de camote morado) se llevó a cabo una separación por HPLC semi-preparativo; se empleó una columna de selectividad Hypersil Gold C18 (250 X 10 mm; 5 µm) y se administró una fase móvil a un flujo de 2.5 mL/min. El extracto sólido crudo se disolvió en MeOH a una concentración de 30 mg/mL y se añadieron 30 µL a la columna. Las condiciones de elución de HPLC fueron las descritas en la sección de análisis por HPLC. Cada fracción que se colectó contenía cada uno de los derivados del ácido cafeoilquínico, que se concentraron a presión reducida y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior caracterización por HPLC-EM y resonancias magnética nuclear (¹H-RMN y ¹³C-RMN), para realizar las respectivas curvas de calibración (ANEXO 2), pruebas biológicas, así como para los análisis de afinidad de sustrato de las oxidasas.

- **Purificación de las antocianinas**

Para la purificación de antocianinas se empleó el método descrito por Torres y colaboradores (Torres Alcalá & Navarro Ocaña, 2016), el cual consistió agregar Amberlita a la fracción acuosa del extracto de la raíz y se realizaron 5 lavados consecutivos con H₂O. Finalmente, las antocianinas se desadsorbieron de la Amberlita con una mezcla de MeOH: CH₃COOH



>99% (99:01). La solución resultante, denominada extracto crudo de antocianinas, se secó a presión reducida y el polvo obtenido se almacenó a 4 °C.

Para obtener antocianinas de alta pureza, se llevó a cabo una separación por HPLC semi-preparativo. Se utilizó una columna de selectividad Hypersil Gold C18 (250 X 10 mm; 5 µm) y una fase móvil a un flujo de 2.5 mL/min. Las condiciones de elución fueron las descritas en la sección de análisis mediante HPLC. El extracto de antocianina seco se disolvió en MeOH con CH₃COOH al 1% a una concentración de 50 mg/mL y se añadieron 30 µL a la columna. Las antocianinas purificadas se secaron a presión reducida y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior caracterización mediante HPLC-EM y ¹H-RMN y ¹³C-RMN, para realizar las respectivas curvas de calibración (ANEXO 2), así como para los análisis de afinidad de sustrato de las oxidasas.

- **Caracterización de los derivados de ácidos cafeoilquínico y de las antocianinas**

La caracterización de cada uno de los derivados de ácidos cafeoilquínico y de las antocianinas purificadas por el HPLC-semi-preparativo se realizó por HPLC-EM y por RMN, en las siguientes condiciones:

HPLC-EM: Se utilizó un sistema LC/MS Agilent con una fuente de ionización por electropulverización (ESI). La separación se logró mediante una columna Hypersil-Gold a 25 °C, las condiciones de análisis fueron las descritas en la sección de análisis por HPLC. Para la detección de EM, se utilizó el modo de iones negativos para los derivados del ácido cafeoilquínico, mientras que se aplicó el modo de iones positivos para las antocianinas. Los espectros se registraron para m/z entre 200 y 2000. Otros parámetros de adquisición de MS fueron los siguientes: voltaje capilar = 4000 V; gas nebulizador (nitrógeno) = 50 psi; caudal



de gas seco = 12 L/min; temperatura del gas seco del calentador de la fuente = 350 °C. El espectrómetro de masas se programó para realizar una exploración completa (MS) y una exploración de zoom de los iones 179, 353, 367, 515, 529, 677 y 1069 m/z en la primera exploración (MS2). Los iones fueron monitoreados con una energía de colisión de 15 eV.

Para los derivados-CQA: los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN (400 MHz) utilizando un espectrofotómetro Varían con sonda de banda ancha conmutable de dos radiofrecuencias ($^1\text{H}/^{19}\text{F}$) ($^{31}\text{P}/^{15}\text{N}$). Se utilizó resonancia CD_3OD a $\delta_{\text{H}} 3,35$ como referencia interna. Los datos obtenidos fueron analizados (ANEXO 1) y comparados con la literatura disponible sobre análisis estructural de cada uno de los derivados-ACQ.

Para las antocianinas: se utilizó un espectrofotómetro de RMN para el registro de los espectros de ^1H (600 MHz) y ^{13}C (150 MHz), cada compuesto fue diluido en CD_3OD y 1% de TFA, el estándar interno que se utilizó fue TMS; además, se llevaron a cabo los experimentos bidimensionales: COSY, HSQC y HMBC (ANEXO 1).

- **Cuantificación de los derivados de ácidos cafeoilquínico y de las antocianinas por HPLC**

Con el fin de preparar curvas estándar para HPLC, se pesaron con precisión de cada uno de los derivados-ACQ y antocianinas purificadas y se disolvieron en MeOH al 80 % (v/v) y 1 % de CH_3COOH . Se preparó un conjunto de soluciones estándar (1 mg/mL) mediante diluciones seriadas y se obtuvo la siguiente concentración: 0.75, 0.50, 0.30 y 0.10 mg/mL. Las ecuaciones de las curvas y el error estándar de regresión correspondientes a cada uno de los compuestos se describen en el ANEXO 2.



10.2.4 5-CQ, 4,3- y 4,5-diCQ como moduladores de la función mitocondrial

- **Cultivo de células de hepatocitos primarios**

Para la obtención de hepatocitos primarios de ratón se utilizaron ratones macho C57BL/6 de 8 a 12 semanas de edad proporcionados por el Departamento de Investigaciones Experimentales y Centro de Cuidado Animal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). El Comité de Ética y Cuidado Animal del INCMNSZ aprobó todos los procedimientos (número de aprobación CICUAL-FNU-2000-20-22-1). Los hepatocitos primarios de ratón se recogieron mediante perfusión in situ del hígado según el método de Berry y Friend (Berry & Friend, 1969), que consiste en canular y exanguinar el hígado in vivo, seguido de una perfusión continua con colagenasa. Posteriormente, se aisló el hígado y se colocó en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) para disgregar el tejido. La suspensión celular se filtró a través de una malla 70 μ M, luego las células filtradas se lavaron dos veces con HBSS y finalmente se resuspendieron en medio M199 (Sigma Aldrich) suplementado con FBS (10 %), antibiótico 1 X, BSA (0.1 %), insulina (1 nM), dexametasona (100 nM) y triyodotironina (100 nM).

- **Evaluación de la función de las mitocondrias**

Los hepatocitos primarios se sembraron en una microplaca XFe96 a una densidad de 4.000 células/pocillo. El medio se cambió después de 4 h para eliminar las células sueltas. Después, las células se incubaron con 5, 10 o 20 μ g/mL de 5-CQ, 3,4-diCQ o 4,5-diCQ durante 18 h. En seguida, se evaluó la función mitocondrial usando una prueba de estrés mitocondrial con la adición de 2-desoxiglucosa en un analizador de flujo extracelular (XFe96). En resumen, las células se lavaron e incubaron durante 1 h sin CO₂ con medio basal XF complementado



con glucosa (10 mM), piruvato (1 mM) y glutamina 2 (mM). Durante el experimento, se inyectaron secuencialmente oligomicina (2 μ M), FCCP (1 μ M), rotenona/antimicina A (1 μ M) y 2-desoxiglucosa (50 mM), y se realizaron tres mediciones en condiciones basales y después de la adición de cada compuesto. Se obtuvieron y analizaron medidas OCR y ECAR siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente se calcularon la respiración mitocondrial basal, la respiración ligada a ATP, la fuga de protones, la respiración máxima, la respiración no mitocondrial y la capacidad respiratoria de reserva con los valores de OCR, y la glucólisis, la reserva y la capacidad glucolíticas con los valores de ECAR como describió Van den Bossche (Van den Bossche, Baardman, & de Winther, 2015). La respiración mitocondrial basal se calculó restando el OCR promedio después de la inyección de rotenona/antimicina A al OCR basal promedio, la respiración ligada al ATP se calcula restando el OCR promedio después de la inyección de oligomicina al OCR basal promedio, la fuga de protones se calcula restando el OCR promedio después de la inyección de rotenona/antimicina A al OCR promedio después de la inyección de oligomicina, la respiración máxima se calcula restando el OCR promedio después de la inyección de rotenona/antimicina A al OCR promedio después de la inyección de FCCP, la respiración no mitocondrial es el OCR promedio después de la rotenona/inyección de antimicina A, y la capacidad respiratoria de reserva se calcula restando el OCR basal promedio al OCR promedio después de la inyección de FCCP. Por otro lado, la glucólisis se calculó restando el ECAR promedio después de la inyección de 2-desoxiglucosa al ECAR basal promedio, la reserva glucolítica se calculó restando el ECAR basal promedio al ECAR promedio después de la inyección de oligomicina y la capacidad glucolítica se calculó restando el ECAR promedio después de la inyección de 2-



desoxiglucosa al ECAR promedio después de la inyección de rotenona/antimicina A. Para evaluar la oxidación de ácidos grasos (OAG), se realizó la prueba de estrés mitocondrial en medio basal que contenía concentración mínima de glucosa (0.5 mM), carnitina (0.5 mM) y palmitato (170 μ M) como sustrato principalmente para la oxidación. La respiración basal y máxima se calcularon como se describió anteriormente.

Los resultados se presentan como media \pm media del error estándar (SEM) de tres experimentos independientes. La significancia estadística se evaluó con una prueba t-Student pareada a una $p < 0.05$ de cada concentración usada frente al control usando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

10.2.5 Purificación y caracterización de las PFO y POD

- **Extracción y purificación de la PFO**

Se implementó el método para la extracción y purificación de la PFO, el cual consistió en homogeneizar 200 g de raíces frescas de camote morado con solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH 6.5 y se filtraron. A continuación, la solución acuosa fue adsorbida en Amberlita, para retener a las antocianinas. El extracto bruto resultante se filtró de nuevo y se filtró a través del carbón activado para eliminar los compuestos fenólicos restantes. Finalmente, la solución resultante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% (p/v) y se llevó a cabo la diálisis con solución amortiguadora de fosfato pH 6.5. Posteriormente, se purificaron 50 mL del extracto dializado que contenía PFO por cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) de acuerdo por al método reportado por Camacho y colaboradores (Camacho & Guillermo, 2018), se utilizó una columna de intercambio iónico y una fase móvil de una



solución amortiguadora de fosfato 0.1 M pH 6 suministrado a un flujo de 1 mL/min. En total, se recogieron 42 fracciones a un volumen de 3 mL.

- **Parámetros del ensayo enzimático**

Se evaluó la actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$) de PFO usando catecol como sustrato control en soluciones amortiguadoras 0.1 M (pH 3-8) en un intervalo de temperaturas (4-60 °C). En resumen, se mezclaron 0.40 ml de solución de sustrato 50 mM con 0.10 ml del extracto de PFO purificado y el progreso de la reacción se evaluó espectrofotométricamente a 417 nm durante 5 min. Se llevaron a cabo experimentos simultáneos utilizando un soporte multicelda con espectrofotómetro de temperatura controlada. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

La concentración de proteínas en las muestras de prueba se midió utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). El cual consistió en diluir 50 mL de la muestra con 50 mL de H₂O y se agregaron 200 mL de reactivo de Bradford. La mezcla se dejó reaccionar durante 5 min y después de ese tiempo se midió la absorbancia a 595 nm. Los datos obtenidos se representaron en una curva estándar preparada para albúmina de suero bovino como patrón de proteína (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se calculó la concentración de PFO.

- **Caracterización de la PFO**

- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la PFO

El efecto del pH sobre la actividad catalítica de PFO se evaluó a las siguientes temperaturas: 4, 15, 20, 30, 40 y 60 °C. Las soluciones amortiguadoras de pH utilizadas en los experimentos se prepararon a una concentración de 0.1 M en el rango de pH de 3 a 8 (soluciones amortiguadoras: de citrato para pH 3, de acetato para pH 4 y 5 y de fosfato para pH 6, 7 y 8).



- Efecto de la inhibición o activación por agentes químicos

Para investigar posibles inhibidores o activación de PFO, se probaron siete sales inorgánicas diferentes que contienen iones divalentes: CuCl_2 , ZnSO_4 , CaCl_2 , BaCl_2 , CoCl_2 , MoCl_2 , MnCl_2 y MgCl_2 . Además, en el ensayo también se incluyó EDTA como agente quelante. En resumen, se añadieron 30 μL de sal o solución de EDTA (170 mM) a la mezcla de reacción que contenía catecol (0.37 ml, 0.55 mM) y extracto de enzima purificado (0.10 ml) en solución amortiguadora de fosfato 0,1 M pH 7 a 30 °C.

- Determinación del efecto de la PFO sobre di-fenoles de la planta de camote.

Se evaluó el efecto de la PFO ($\mu\text{mol}/\text{min}$) sobre los siguientes ácidos: ferúlico, cafeico, 5-CQ, 3,4-; 3,5- y 4,5- diCQ, 3,4,5-triCQ, 4,5-FCQ y una antocianina acilada. La reacción consistió en adicionar 0.40 mL de cada fenol (70 mM) disuelto en buffer fosfato (pH 7, 0.1M)) agregando 0.10 mL de PFO, el progreso de la reacción se controló espectrofotométricamente a 417 nm durante 5 min.

- Determinación de parámetros enzimáticos K_m y V_{max} de la PFO

Para examinar la especificidad del sustrato de PFO, se determinaron los parámetros enzimáticos K_m y V_{max} para los siguientes compuestos fenólicos: ácido cafeico, 5-CQA, 4,5-, 3,5-, 3,4-diCQ, 3,4,5-triCQ, 4,5-FCQ y peonidina 3-cafeoil-p-hidroxibenzoil soforosido-5-glucósido. La reacción consistió en adicionar 0.40 mL de cada fenol disuelto en buffer fosfato (pH 7, 0.1M) (ajustando 6 concentraciones diferentes de cada uno de ellos) agregando 0.10 mL de PFO, con el fin de realizar la cinética correspondiente (V_{max} y K_m). Usando un espectrofotómetro.



- **Purificación por punto isoeléctrico de la POD**

Se implementó el método para la purificación de la POD de camote morado, el cual se homogeneizaron 200g de camote morado con buffer de fosfatos 0.1M pH 7, se filtró y el sobrenadante se adsorbió en Amberlita, se filtró y al sobrenadante se le realizó una precipitación a pH 4.5 con HCl 1M, se centrifugó y nuevamente se recuperó el sobrenadante que contenía principalmente la POD, posteriormente dicho sobrenadante fue liofilizado para las pruebas posteriores.

- **Parámetros del ensayo enzimático**

Se evaluó la actividad enzimática ($\mu\text{mol}/\text{min}$) de POD usando guayacol y H_2O_2 como sustrato control en soluciones amortiguadoras 0.1 M (pH 4-8) en un intervalo de temperaturas (4 –80 °C).

La reacción fue la siguiente, se mezclaron 0.10 mL de solución de fenol (90 mM) con 0,7 ml del extracto de POD purificado y hasta el último se agregar 0.5 mL de H_2O_2 (30 mM); el progreso de la reacción se controló espectrofotométricamente a 417 nm durante 5 min. Se llevaron a cabo experimentos simultáneos utilizando un soporte multicelda con espectrofotómetro de temperatura controlada. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. La concentración de proteínas en las muestras de prueba se midió utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976): se diluyeron 50 mL de la muestra con 50 mL de H_2O y se agregaron 200 mL de reactivo de Bradford. La mezcla se dejó reaccionar durante 5 min y después de ese tiempo se midió la absorbancia a 595 nm. Los datos obtenidos se representaron en una curva estándar preparada para albúmina de suero bovino como patrón de proteína (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se calculó la concentración de POD.



- **Caracterización de la POD**

- Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad de la PFO

El efecto del pH sobre la actividad catalítica de POD se evaluó bajo las siguientes condiciones: las soluciones amortiguadoras de pH utilizadas en los experimentos se prepararon a una concentración de 0.1 M en el rango de pH de 4 a 8 (solución amortiguadora de acetato para pH 4 y 5, y de fosfato para pH 6, 7 y 8) y se utilizó una temperatura constante de 30 °C.

El efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de POD se evaluó en las siguientes condiciones: 4, 20, 40 y 80 °C, y se utilizó solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 6 en todos los experimentos.

- Determinación del efecto de la POD sobre fenoles con unidad metil-fenol de la planta de camote.

Se evaluó el efecto de la POD ($\mu\text{mol}/\text{min}$) sobre los siguientes ácidos: ferúlico, cafeico, feruloil-quínico y 4,5-FCQ. En resumen, se mezclaron 0.10 mL de solución de fenol (90 mM) con 0.7 mL del extracto de POD purificado y hasta el último se agregar 0.5mL de H_2O_2 (30 mM); el progreso de la reacción se controló espectrofotométricamente a 417 nm durante 5 min.

- **Análisis de electroforesis y zimogramas de PFO y POD**

Las muestras de enzimas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (12 %) con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y posteriormente se sometió a electroforesis, primero durante 60 min a corriente constante de 80 V y luego durante 60 min a corriente constante de 120 V.



El ensayo bio-autográfico (zimograma) de la PFO se basa en el informe de Rescigno y colaboradores (Rescigno, Sollai, Rinaldi, Soddu, & Sanjust, 1997). Esta se realizó directamente en SDS-PAGE, éste se tiñó en 40 mM de solución de catecol (pH 6.8) durante 12 h o hasta que se tiñeron las bandas enzimáticas. Se fotografiaron los geles teñidos.

Mientras que la bio-autografía de POD el SDS-PAGE se tiñó con 75 mM de solución de pirogalol (en pH 6.8) y H₂O₂ al 1% durante 10 min o hasta que se tiñeron las bandas enzimáticas. Se fotografiaron los geles teñidos.

10.2.6 Evaluación del efecto de la PFO y POD sobre los derivados -ACQ y las antocianinas

- **Evaluación de la degradación de los compuestos fenólicos por la PFO y POD analizados por HPLC**

El grado de degradación de los compuestos fenólicos por la PFO y POD respectivamente, se evaluó en experimentos separados para una mezcla de derivados-ACQ (fracción orgánica) y antocianinas (fracción acuosa) obtenida durante los pasos de extracción como se describe en la sección 10.2.3 (preparación de los extractos). En resumen, se mezcló 1 ml del extracto fenólico crudo con 0.20 mL de la fracción de PFO o POD purificada y se mezcló bien; en el caso del ensayo de la POD se agregaron al final 0.1 mL de H₂O₂ (30 mM).

El análisis por HPLC se llevó a cabo como se describe en la Sección 10.2.3 (Análisis por HPLC) y la absorbancia se midió a 320 y 510 nm para detectar derivados-ACQ y antocianinas, respectivamente. El rendimiento de conversión de cada sustrato se calculó a partir del área del pico de la muestra en comparación con una muestra en blanco correspondiente y se expresó como porcentaje.



- **Evaluación de la degradación de la antocianina mayoritaria camote morado por PFO (analizada por UV-vis)**

Para evaluar la degradación oxidativa de la antocianina principal por PFO, se mezclaron 100 μL del extracto de antocianina a una concentración de 10 mM en una solución amortiguadora fosfato pH 7 con 10 μL del extracto de enzima purificado. La muestra en blanco se añadió con 10 μL de una solución amortiguadora fosfato pH 7. Se realizó un barrido espectrofotométrico de 200-700 nm a 30 °C usando un espectrofotómetro Cary 60 equipado con soportes multicelulares y controlador de temperatura.



11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1 SELECCIÓN DE LA PLANTA DE CAMOTE

El objetivo principal de esta investigación fue determinar el efecto de las oxidasas sobre los fenoles con diferente número de sustituyentes cafeoilo, por lo que primero se seleccionó la planta que tuviera la mayor concentración y diversidad de fenoles totales, en específico de derivados-ACQ, para obtener cada uno de ellos de manera cuantitativa. Para seleccionar el origen de la planta de camote, se realizó una colecta de las hojas de 200 accesiones de las principales regiones productoras del país; ya que se sabe, que las hojas de la planta de camote son el órgano con las concentraciones más altas y con mayor diversidad estructural. Las hojas colectadas fueron congeladas y liofilizadas, para posteriormente hacer el análisis de fenoles (FT), flavonoides (FLT), antocianinas totales (AT), perfil de derivados-ACQ y en específico de los ácidos 3,4,5-triCQ y 4,5-FCQ.

11.1.1 Contenido de fenoles totales

En la Figura 23 se muestra el contenido de fenoles totales en hojas de las 200 accesiones de camote, las cuales exhiben una gran variabilidad en la concentración de FT que va de 54.41 a 284.64 mg FT/g BS. Sin embargo, solo el 28 % de los valores registrados fueron superiores a 100 mg FT/g BS. En comparación con el contenido de FT de otras variedades de hojas de camote en el mundo, las hojas de camotes mexicano analizadas en este estudio, mostraron valores superiores; por ejemplo, las variedades chinas reportan tener hasta 61.14 mg FT/g BS (Song, Li, Liu, & Zhang, 2011), mientras que las variedad SM-2 de Wufeng, Ciudad de Taichung, Taiwán, variaron de 39.34 a 154.05 mg FT/g de BS (Jeng, Lai, Liao, Lin, & Sung, 2015b).



En el presente estudio, solo 13 accesiones mexicanas excedieron la concentración de 150 mg/g BS. También, cabe destacar que los valores de fenoles totales de las hojas de camote son superiores a los obtenidos para otras hortalizas más consumidas en el mundo como la espinaca (Fрати, Antonini, & Ninfali, 2016). Además, los FT en las hojas de camote son equivalentes o superiores a otras hojas disponibles comercialmente, como las hojas de café con hasta 212.4 mg/g BS (Salgado, Favarin, Leandro, & Lima Filho, 2008). Adicionalmente, con los datos obtenidos de esta investigación en relación con el contenido de fenoles, se podría asegurar que, si las hojas de camote fueran consumidas de manera comercial en las poblaciones preocupadas por su salud, aumentaría entre el 10-34 % la ingesta diaria de polifenoles, tomando en consideración que este sector poblacional en Europa tiene una ingesta diaria de polifenoles de 584-1783 mg/día, y las fuentes principales de estos compuestos son el café, junto con las hojas de té y otras frutillas (Zamora-Ros et al., 2016).

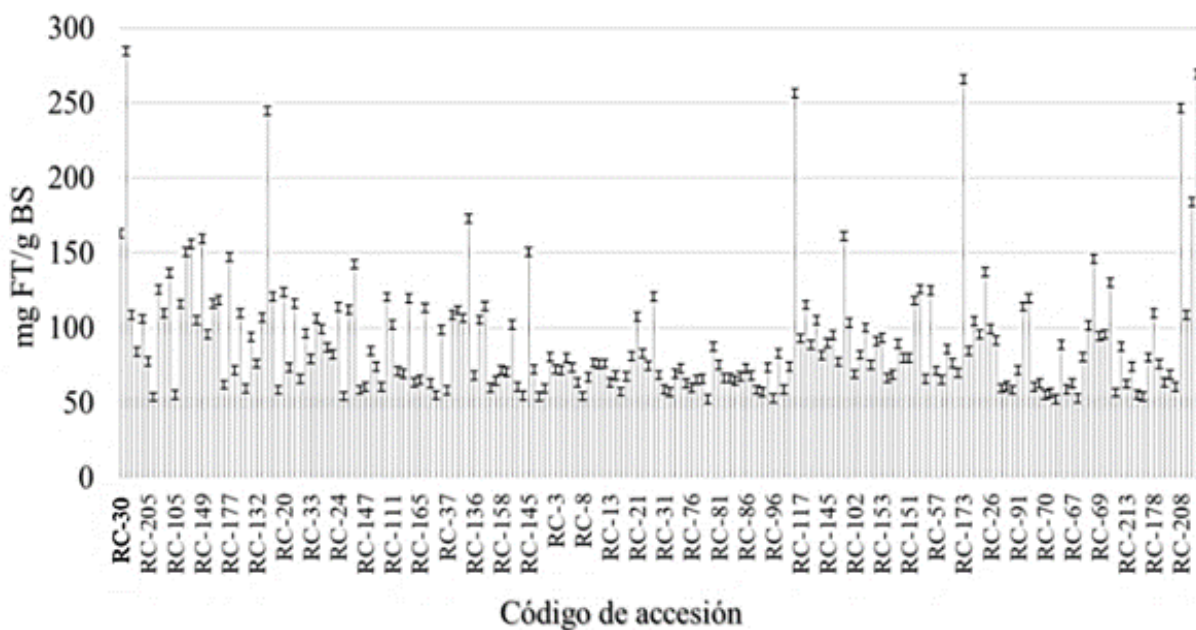


Figura 23 Contenido de fenoles totales en hojas de 200 accesiones de la planta de camote.



11.1.2 Contenido de flavonoides totales

En general, el contenido total de flavonoides en las hojas de las 200 accesiones de camote analizadas en este estudio varió de 10.01 a 40.17 mg FLT/g BS, como se ilustra en la Figura 24. Las hojas de las accesiones, que presentaron mayor contenido de fenoles, también, fueron ricas en flavonoides con concentraciones que variaron de 25 a 40.17 mg FLT/ g BS, lo cual representa hasta el 2 5% del total de fenoles. Los valores obtenidos fueron superiores a los reportados en otro estudio en China con valores que variaron de 3.14 a 16.51 mg FLT/g BS (L. Zhang et al., 2015).

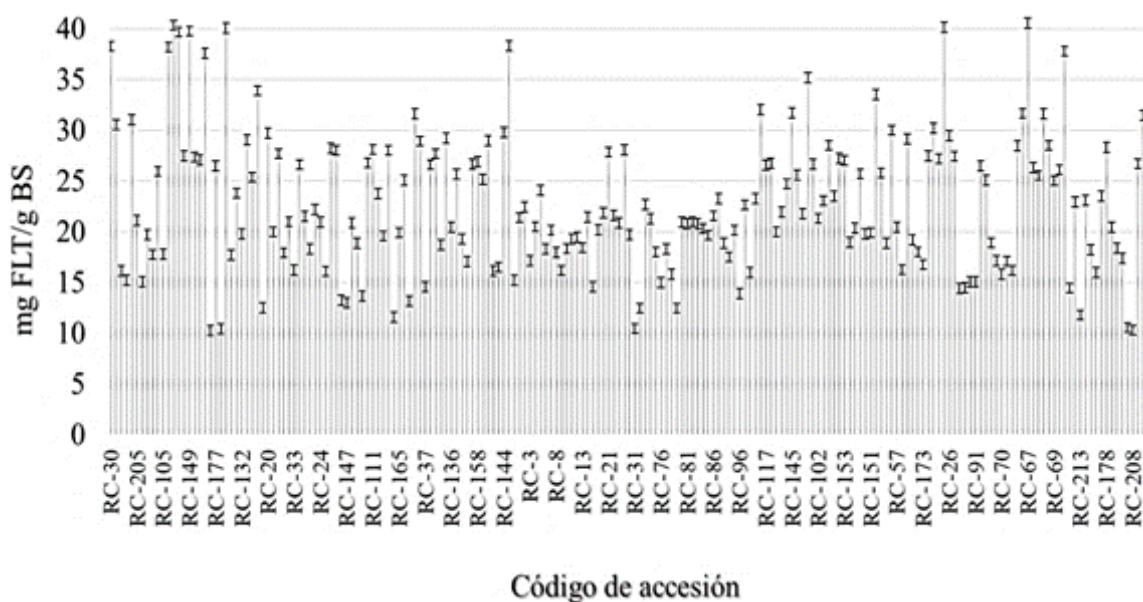


Figura 24 Contenido de flavonoides totales en hojas de 200 accesiones de la planta de camote.



11.1.3 Contenido de antocianinas totales

Debido a la coloración rojiza que presentan algunas hojas de las accesiones estudiadas, se cuantificaron las AT, como se muestra en la Figura 25. Para determinadas accesiones, el AT no pudo ser cuantificable, pero la mayoría de las muestras estudiadas contenían antocianinas en una concentración inferior a 0.15 mg AT/g BS. Por otro lado, las accesiones que contienen las mayores cantidades de fenoles y flavonoides también mostraron el contenido de antocianinas totales más alto con valores superiores a 0.2 mg AT/g BS, lo que representa hasta el 2.5 % del total de flavonoides.

Los valores obtenidos de AT en las hojas de las accesiones analizadas son superiores a los descritos para las hojas del cultivar de camote de pulpa morada P40 con hasta 0.038 mg AT/g BS y son similares al contenido de AT determinado para los cultivares Beauregard de pulpa anaranjada y Bonita de pulpa blanca con concentraciones de 0.24 y 0.45 mg de AT/g de BS, respectivamente (Su et al., 2019).

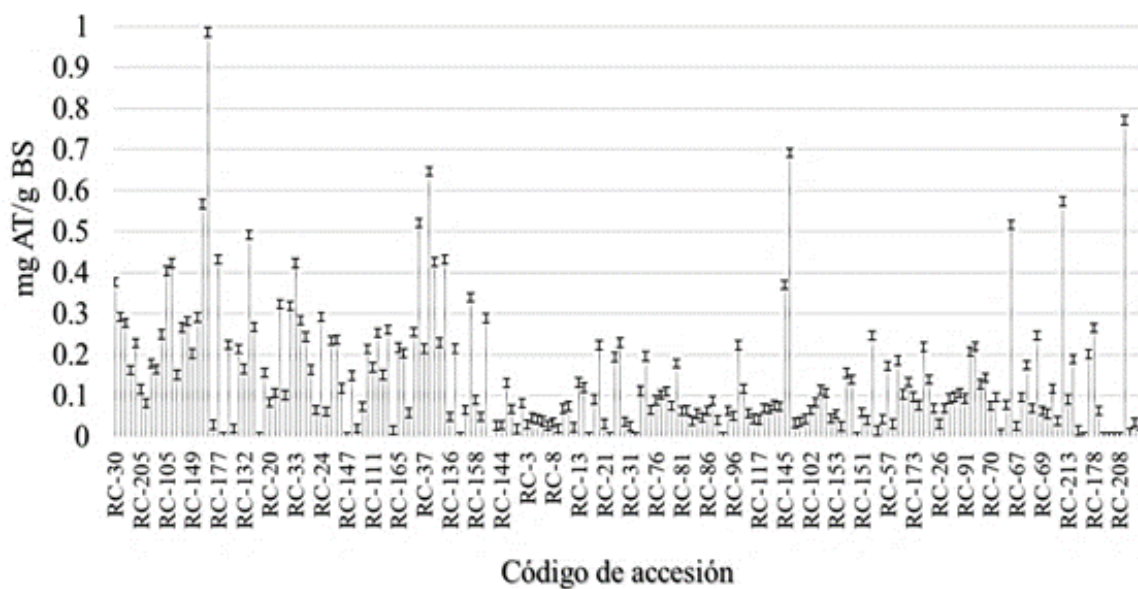


Figura 25 Contenido de antocianinas totales en hojas de 200 accesiones de la planta de camote.



11.1.4 Identificación por HPLC de los derivados-ACQ

Finalmente, las hojas de las 200 accesiones de camote fueron analizadas por HPLC (Figura 26), para determinar el perfil de fenoles, y de acuerdo con el orden de elución mostrado en la Figura 26 y Cuadro 3, se demostró que todas las muestras tenían el mismo perfil en cuanto a la presencia de los ácidos: cafeico, 5-CQ, di-CQ y 4,5-FCQ, aunque variaron en su concentración total. Además, la tendencia predominante observada entre las muestras fue de mayor a menor concentración los ácidos: di-CQ, 5-CQ, cafeico y 4,5-FCQ. Las concentraciones de 3,4,5-triCQA fueron las más bajas y solo 21 accesiones exhibieron cantidades cuantificables de este compuesto en las condiciones experimentales establecidas para este trabajo. Asimismo, en estudios previos sobre el perfil de los derivados de ácido cafeoilquínico en diferentes variedades de hojas de camote variedad coreana (Jung et al., 2011) describen una mayor concentración de los ácidos di-CQ en comparación con el ácido 5-CQ, sin embargo, no reportaron la presencia de 3,4,5-triCQ y 4,5-FCQ.

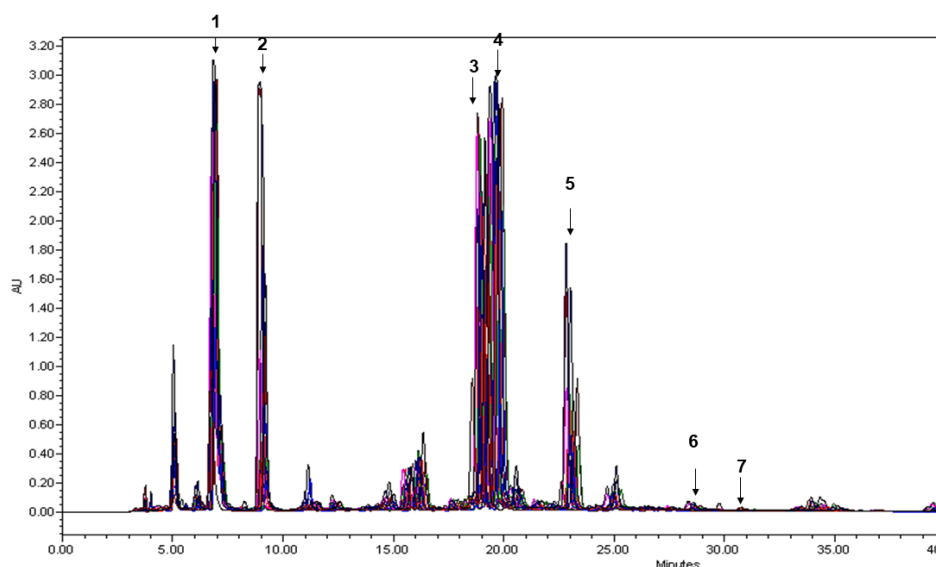


Figura 26 Análisis HPLC comparable de 21 accesiones de la planta de camote: (1) 5-CQ, (2) ácido cafeico, (3) ácido 3,4-diCQ, (4) ácido 3,5-diCQ, (5) Ácido 4,5-diCQ, (6) ácido 4,5-FCQ y (7) ácido 3,4,5-triCQ.



Las 21 accesiones de hojas de camote con concentraciones cuantificables de ácido 3,4,5-triCQ se encontraron dentro del 28% de las accesiones con valores más altos registrados para FT (105.06-284.5 mg /g), FLT (25.09 mg -38.29 mg/g), y también se observó que contenía una concentración de AT superior a 0.65 mg/g. Además, es destacable que estas 21 accesiones se cultivan en tierras pertenecientes a los estados ubicados geográficamente en el Sur de México (Figura 27) culturalmente conocido como Mesoamérica, lugar reconocido como uno de los centros de origen y domesticación.



Figura 27 Ubicación geográfica y color de pulpa correspondiente de las accesiones de camote en México

11.1.5 Cuantificación de 3,4,5 -triCQ y 4,5-FCQ

Una vez que se identificaron por HPLC las accesiones que contenían cantidades cuantificables de 3,4,5-triCQ, se midieron sus concentraciones y variaron de 44.73-193.22 mg/100g BS, como se muestra en el Cuadro 2. Lo que nos indica que las variedades de hojas



de camotes mexicanos contienen concentraciones importantes del compuesto con actividad biológica más importante dentro del grupo de los derivados de ácido cafeoilquínico.

Por otro lado, las concentraciones de 3,4,5-triCQ obtenidas en este trabajo fueron comparables o superiores con otras variedades de hojas estudiadas previamente, por ejemplo, Islam y colaboradores (Islam et al., 2002) reportaron en 1389 genotipos de hojas de camote de diferentes partes del mundo concentraciones de 15.84-220.95 mg /100 g de BS. Mientras que Jeng y colaboradores (Jeng et al., 2015b) reportaron, en la variedad de camote SM-2 de Taiwán, concentraciones de entre 53-155 mg/100 g BS. Por otro lado, en los estudios realizados por Kurata y colaboradores (Kurata et al., 2011), indicaron que la concentración del 3,4,5-triCQ fue de 76 mg/100 BS, demostrando de esta manera que las variedades de camotes mexicanos son una fuente promisoría para la obtención de este compuesto fenólico. Respecto al contenido del ácido 4,5-FCQA en las hojas de camote de las 21 accesiones, se encontró que la concentración de este compuesto variaba de 139.58-415.91 mg/100 g BS (Cuadro 2). Es importante señalar que los derivados de ácido feruloil-cafeoil quínico, no han sido reportados frecuentemente en la planta de camote, por ejemplo, la presencia de 4,5-FCQA en cultivares de camote de Tanzania y China se determinó sólo de forma cualitativa y se sugirió que la presencia de FCQA variaba según el país de origen (Zheng & Clifford, 2008a), sin embargo, en las variedades de camote mexicano dicho compuesto está presente en concentraciones cuantitativas.

El color de la pulpa de la raíz de las 21 accesiones con mayor contenido de los ácidos 3,4,5-triCQ y 4,5-FCQ son: el 43% de pulpa morada, el 14% de pulpa amarilla, 29% de pulpa blanca, y 14% de pulpa crema con cáscara morada. Por lo tanto, la variedad de la planta de camote morado que se eligió para hacer todo el análisis de compuestos fenólicos y de las



oxidadas en las siguientes partes de este estudio fue la accesión proveniente de Oaxaca: RC-163.

Cuadro 2 Concentraciones de los ácidos 3,4,5-triCQ y 4,5-FCQ en 21 accesiones de la planta de camote mexicano (cada valor se representa como media \pm SD (n=3))^a

ACCESIÓN	Estado	3,4,5-triCQ (mg/100g BS)	4,5-FCQ (mg/100g BS)	Color de la raíz
RC-30	Michoacán	193.22 \pm 7.99 ^a	363.66 \pm 20.79 ^m	Amarillo
RC-163	Oaxaca	185.43 \pm 7.70 ^{ab}	248.62 \pm 8.06 ^{ef}	Morado
RC-172	Puebla	184.40 \pm 9.54 ^{ab}	267.46 \pm 17.07 ^{fgh}	Amarillo
RC-131	Morelos	181.02 \pm 14.48 ^b	286.83 \pm 12.31 ^{hij}	Morado
RC-170	Oaxaca	174.56 \pm 9.99 ^{bc}	278.14 \pm 14.11 ^{ghi}	Morado
RC-145	Michoacán	167.48 \pm 10.18 ^{cd}	256.49 \pm 9.93 ^{efg}	Morado
RC-167	Oaxaca	167.15 \pm 8.17 ^{cd}	244.01 \pm 13.39 ^{de}	Blanco
RC-144	Michoacán	156.56 \pm 10.52 ^d	238.41 \pm 12.04 ^{de}	Crema
RC-101	Guanajuato	143.20 \pm 6.25 ^e	221.29 \pm 11.12 ^d	Blanco
RC-125	Michoacán	140.48 \pm 6.81 ^e	287.14 \pm 7.38 ^{hij}	Morado
RC-178	Morelos	140.42 \pm 7.42 ^e	326.45 \pm 22.08 ^l	Blanco
RC-139	Guerrero	132.93 \pm 6.06 ^{ef}	305.05 \pm 14.69 ^{jkl}	Morado
RC-162	Querétaro	123.45 \pm 5.18 ^{fg}	314.39 \pm 12.10 ^{kl}	Morado
RC-141	Guerrero	116.40 \pm 4.02 ^{gh}	294.48 \pm 20.27 ^{ijk}	Crema
RC-29	Puebla	114.21 \pm 4.23 ^{gh}	167.85 \pm 12.75 ^{bc}	Morado
RC-140	Guerrero	107.18 \pm 3.95 ^{hi}	185.78 \pm 15.61 ^c	Amarillo
RC-67	Puebla	97.94 \pm 3.98 ⁱ	237.36 \pm 13.05 ^{de}	Morado
RC-188	Hidalgo	95.36 \pm 2.95 ⁱ	150.47 \pm 18.87 ^{ab}	Blanco
RC-21	Estado de México	82.69 \pm 2.83 ^j	415.91 \pm 11.84 ⁿ	Blanco
RC-143	Michoacán	79.27 \pm 1.93 ^j	139.58 \pm 14.58 ^a	Crema
RC-53	Chiapas	44.73 \pm 1.45 ^k	155.44 \pm 15.96 ^{ab}	Blanco

^a Los datos se muestran como media \pm DE (desviación estándar)

^b Las letras minúsculas en superíndice alfabético indican una diferencia estadística significativa entre las accesiones con respecto a la cuantificación de 3,4,5-triCQ.

^c Las letras minúsculas en superíndice alfabético indican una diferencia estadística significativa entre las accesiones con respecto a la cuantificación del 4,5-FCQ.



11.2 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Una vez que se seleccionó, por la concentración y la diversidad de fenoles con sustituyentes cafeoil en el follaje (hojas), la accesión de la planta de camote para trabajar en esta investigación (accesión RC-163); se cuantificaron fenoles y antocianinas totales en cada órgano de la planta (Figura 28), para establecer cuál sería la parte vegetal candidata para la obtención de derivados-ACQ y de antocianinas.

Las hojas se clasificaron por tamaño: extra pequeñas (XP) menores a 1 cm de largo, pequeñas (P) de 1-3 cm de largo, mediadas (M) de 3-5 cm de largo, y grandes (G) 5-10 cm, mientras que la raíces se clasificaron de acuerdo a la talla/calidad: primera calidad (1ra) de 1-2 kg, segunda calidad (2da) de 0.25-1 kg y tercera calidad (3ra) de 0.09-0.25 kg.

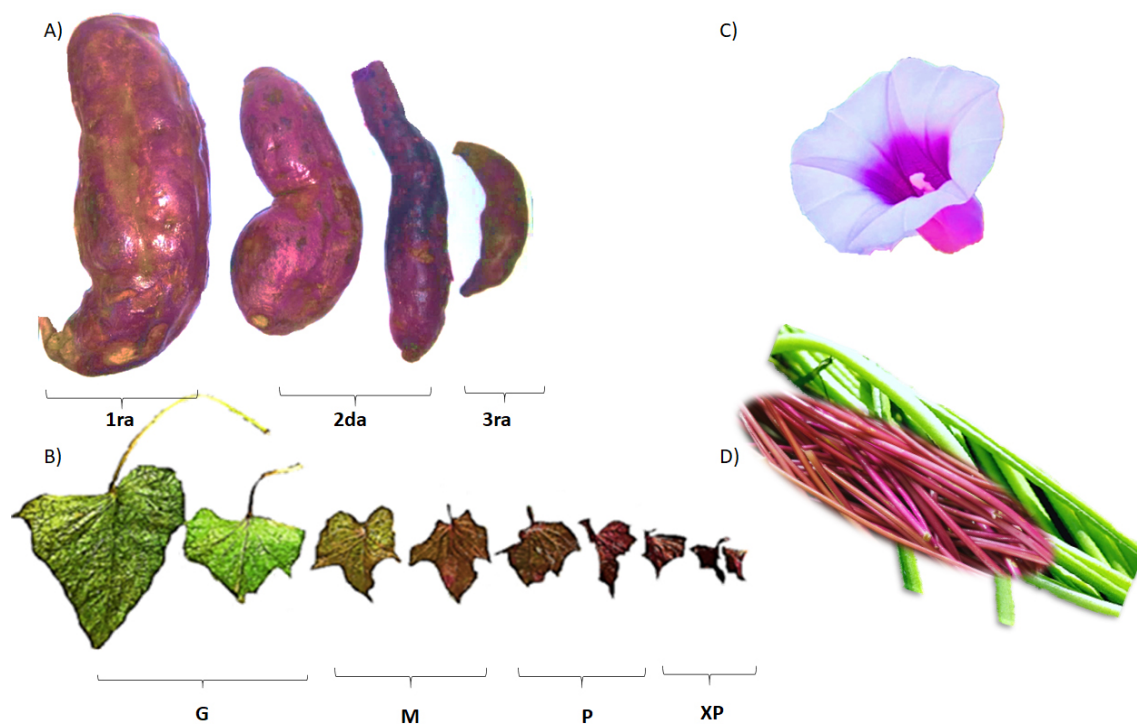


Figura 28 Órganos de la planta de camote. A) Raíces. Clasificación de acuerdo con la talla/calidad: 1ra, 2da y 3ra calidad. B) Hojas. Clasificación de acuerdo con el tamaño: XP, p, M, y G. C) Flor. D) Tallos.



11.2.1 Fenoles totales en los órganos de la planta de camote morado

La cuantificación de fenoles totales por órgano de camote se muestra en la Figura 29, en donde se confirma que el órgano con mayor concentración son las hojas, seguido por los tallos, flores y raíces. Jung y colaboradores (Jung et al., 2011) reportan datos similares en cuanto a la distribución de fenoles en la planta de camote variedad Borami (color de la raíz morado intenso).

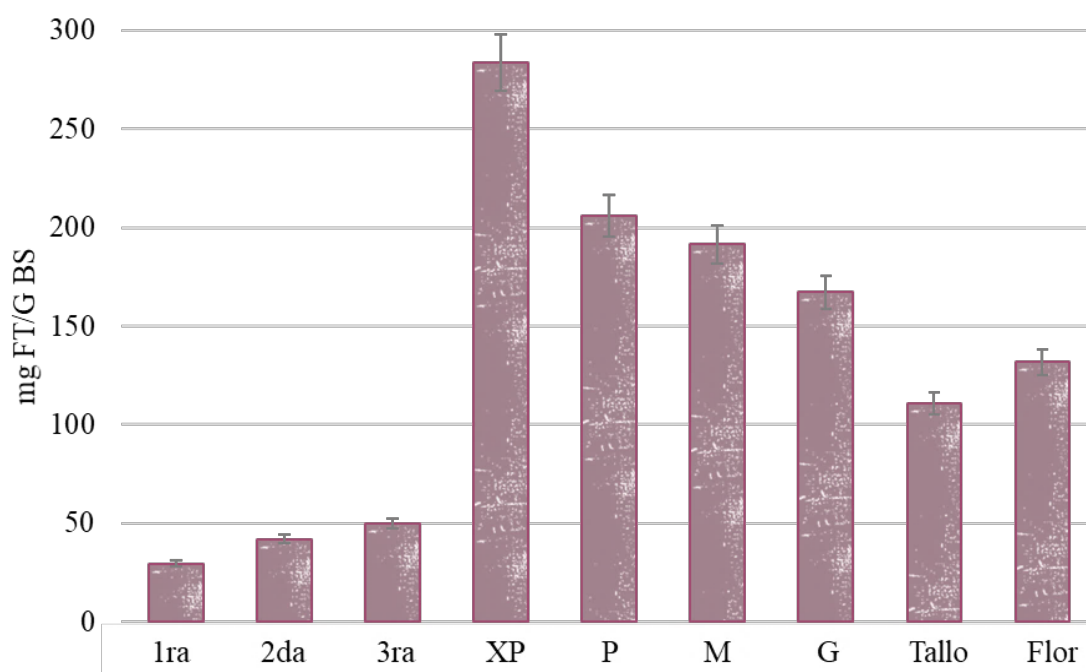


Figura 29 Concentración de fenoles totales de acuerdo con el órgano y la clasificación de la planta de camote morado. $n=3$

Una clasificación por tamaño de hoja permite una optimización en la concentración de fenoles, ya que las hojas más pequeñas (XP), que son las que emergen primero de la planta, tienen mayor contenido de los compuestos de interés, y a medida que las hojas crecen de tamaño la cantidad de fenoles disminuye casi un 40%. Estos datos coinciden con los reportados por Jeng y colaboradores (Jeng et al., 2015b), quienes hacen una selección de hojas



por nivel de expansión (1ra, 2da, 3ra y 4ta), evidenciando una mayor concentración de fenoles en las hojas con menor nivel de expansión.

Respecto a las raíces, la talla influye en la concentración de fenoles, presentando una mayor concentración en los camotes de 3ra calidad, seguido por los de 2da y 1ra calidad. Los FT encontrados en los camotes de 1ra calidad fueron similares a los reportados por otros autores como Meng y colaboradores (Meng, Tan, & Feng, 2019) quienes reportaron una concentración máxima de fenoles de 14.16 mg/g BS. Del mismo modo, Wang y colaboradores (H. Wang et al., 2020) informan que en la variedad S-3 de camote morado hay 15.25 mg /g BS. Por lo que es destacable que el contenido de FT en las raíces de 3ra calidad es el doble de lo reportado previamente; y en general la concentración de FT en las raíces de la planta de camote morado son más altos que en otros tubérculos y raíces comestibles como en las zanahorias moradas (3.94 mg/g BS) y la papas moradas (8.45 mg/g BS) (Kita, Bąkowska-Barczak, Hamouz, Kułakowska, & Lisińska, 2013).

A la fecha, no se tienen datos previos sobre la relación del tamaño de la raíz y la concentración de compuesto fenólicos; pero puede suponerse que esto se debe a la cantidad de almidón que almacenan. Ya que las raíces de 1ra calidad por ser de talla más robusta, tienen mayor cantidad de almidón, mientras que las de 3ra calidad tienen cantidades menores. Algunos datos apuntan que la cantidad de almidón está relacionado con la cantidad de fenoles y la cantidad de almidón a su vez está relacionada con el tamaño de la raíz, y cuando se degrada el almidón hay mayor expresión de fenoles (S. Wang et al., 2016). Es decir, se podría inferir que las raíces más pequeñas (3ra calidad) tienen menos cantidad de almidón por degradar y por tanto una mayor concentración de fenoles. Por otro lado, Kim y colaboradores (Y.-H. Kim et al., 2015) hicieron una clasificación de la raíz de acuerdo con la etapa de



desarrollo: raíz fibrosa, raíz gruesa y raíz de almacenamiento (mayor cantidad de almidón); y reportan que la mayor concentración de FT se encuentra en la raíz gruesa, seguida de la raíz fibrosa. En la raíz de raíz de almacenamiento fue en donde encontraron una menor concentración de FT. Al mismo tiempo, encontraron que las raíces donde hay mayor concentración de FT, hay una mayor actividad de PFO, por lo que se plantea la hipótesis de que a una mayor concentración de FT hay una mayor actividad de la PFO como mecanismo de regulación.

11.2.2 Antocianinas totales

Para determinar que órgano de la planta camote era el óptimo para separar a las antocianinas se cuantificaron las totales; los datos se muestran en la Figura 30; en donde se observa que la mayor concentración de antocianinas se encuentra en las raíces, seguida de las hojas y flor, y en los tallos fue en donde se cuantificaron concentraciones más bajas.

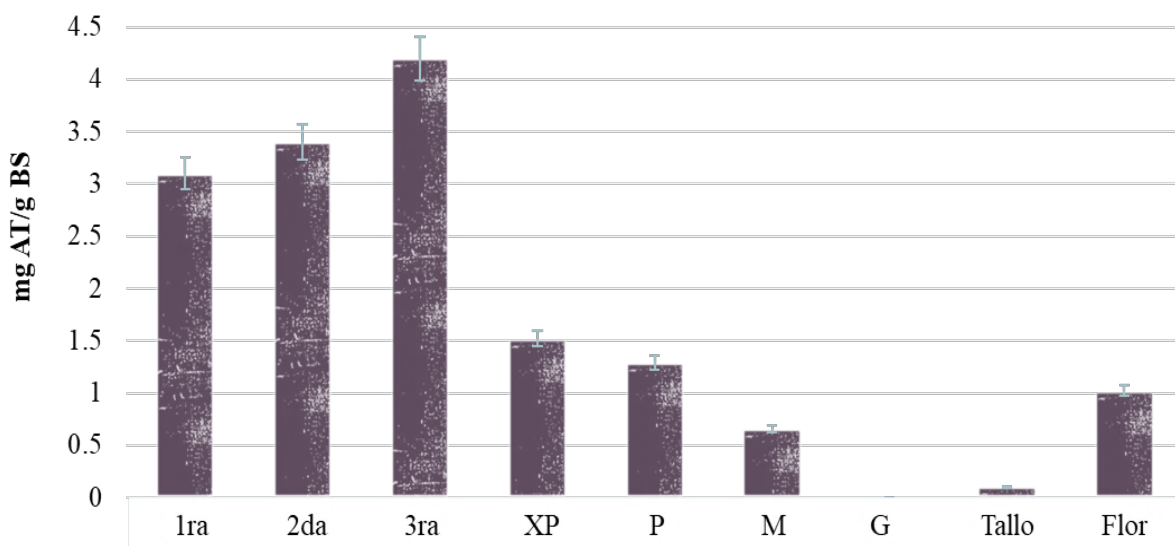


Figura 30 Concentración de antocianinas totales de acuerdo con el órgano y la clasificación de la planta de camote morado. $n=3$



La tendencia de concentración de antocianinas con respecto a la talla de la raíz y el tamaño de las hojas fue proporcional con respecto a los fenoles. Es decir, en las raíces de menor talla se cuantificaron concentraciones más altas de AT con hasta 4.22 mg/g BS, estas concentraciones son superiores a las descritas en las variedades de camote morado chinas, con 2.44 mg/g BS (Cai et al., 2016); pero los valores encontrados en esta investigación son inferiores con los reportados en la variedad Shinzami con hasta 10.39 mg/g BS (H. W. Kim et al., 2012b); cabe destacar que esta variedad coreana fue creada cruzando Yamagawamurasaki con Shinmi y se propagó como una variedad líder para la producción de pigmentos en 2001 después de un proceso de selección.

Del mismo modo, en las hojas, las de tamaño más pequeño fueron las que presentaron concentraciones más altas de AT con 1.5 mg/g BS, mientras que en las hojas de mayor tamaño las AT fueron incuantificables, esto se debe a que cuando las hojas van desarrollando un mayor tamaño, la aparición de la clorofila se vuelve más evidente y, por lo tanto, la concentración de AT baja (en la Figura 28, se puede observar la pigmentación rojiza como va disminuyendo con respecto al tamaño). Cabe destacar, que los valores AT en las hojas de las variedades de camote mexicano son más altos que los reportados para las hojas de la variedad de camote morado p40 (variedad selecta del centro de horticultura John C. Pair de la Universidad estatal de Kansas) con una concentración de 0.038 mg/g BS de AT (Su et al., 2019). Respecto a los tallos, las concentraciones de AT fueron muy bajas, menores a los 0.25 mg/g BS. Mientras que la flor presentó concentraciones por debajo de 1 mg/g BS; cabe destacar que con respecto a estos dos últimos órganos (tallos y flor) no se encontró información en la literatura respecto a las antocianinas: concentración y perfil.



11.3 OBTENCIÓN DE LOS DERIVADOS-ACQ Y DE ANTOCIANINAS

11.3.1 Derivados-ACQ

11.3.1.1 Identificación y caracterización de los derivados-ACQ

Se llevó a cabo la identificación y la caracterización de los derivados-ACQ por HPLC y HPLC-EM en cada órgano de la planta de camote (hojas, tallos, flor y raíz) y los resultados se compararon con los datos reportados en la literatura. Además, los ácidos: cafeico; 5-CQ; 3,4-, 4,5- y 3,5-diCQ fueron comparados mediante los tiempos de retención con los estándares comerciales. Los resultados se resumen en el Cuadro 3.

En el Cuadro 3, se muestran 7 derivados-ACQ: un isómero de ácido mono-cafeoilquínico, 3 isómeros de di-cafeoilquínicos, un tricafeoilquínico, 2 isómeros de feruloil-cafeoilquínico y adicionalmente se detectaron los ácidos cafeico y feruloil quínico, distribuidos en los diferentes órganos. De los cuales, en las hojas, tallos y flores se encuentra presentes cada uno de ellos, mientras que en la raíz solo se detectaron 5 y el ácido cafeico.

Todos estos derivados-ACQ ya han sido descritos previamente en la literatura en los diferentes órganos de la planta de camote; siendo los más comunes los ácidos: 5-CQ; 3,4-, 3,5- y 4,5 diCQ; y el 3,4,5-triCQ (Jeng et al., 2015b) (Kurata et al., 2011) (Yoshimoto et al., 2002) (Islam et al., 2002). Sin embargo, los isómeros de ácidos feruloil-cafeoil quínico, así como el ácido feruloil-quínico en el camote solo los han identificado en pequeñas cantidades en hojas, tallos y cáscara de camotes de Tanzania y China (Zheng & Clifford, 2008b).



Cuadro 3 Caracterización e identificación de los derivados-ACQ presentes en cada órgano de la planta de camote morado por HPLC-EM.

Núm	Derivados -ACQ	PM (M-1)	Fragmento (m/z)	Raíz	Flor	Hoja	Tallo
1	5-cafeoilquínico	353	191	+	+	+	+
2	Ácido cafeico	179	135	+	+	+	+
3	Feruloil-quínico	367	179	-	+	+	+
4*	3,4-dicafeoilquínico	515	353	+	+	+	+
5*	3,5-dicafeoilquínico	515	353,179	+	+	+	+
6*	4,5-dicafeoilquínico	515	353	+	+	+	+
7*	4,5-feruloil cafeoilquínico	529	367, 191	+	+	+	+
8	3,5-feruloil cafeoilquínico	529	367,179,161	-	+	+	+
9*	3,4,5-tricafeoilquínico	677	515,353	-	+	+	+

*Compuestos que fueron caracterizados por RMN (ANEXO 1)

El signo +, significa identificado

El signo -, significa no identificado

11.3.1.2 Obtención de los derivados-ACQ

Una vez que se definió que las hojas más pequeñas (XP) eran el órgano de la planta de camote morado (RC-163) que contenían la mayor diversidad y concentración de fenoles; con este material vegetal se realizó un extracto pre-purificado y enriquecido en derivados-ACQ y, posteriormente, se realizó la separación de cada uno de los principales ácidos con sustituyentes cafeoil por HPLC-semi-preparativo. El cromatograma del extracto total se muestra en la Figura 31 y en el Cuadro 5 se presenta la caracterización de cada uno de ellos por T_R (HPLC), por peso molecular (HPLC-EM), y la caracterización completa de algunos de ellos se realizó por RMN (ANEXO 1). A partir de esta separación y caracterización, se realizaron curvas de calibración por HPLC (Cuadro A1, ANEXO 2) para cuantificar en cada



órgano dichos compuestos, hacer ensayos específicos de actividad biológica y para utilizarlos en la determinación de los parámetros cinéticos de las oxidasas.

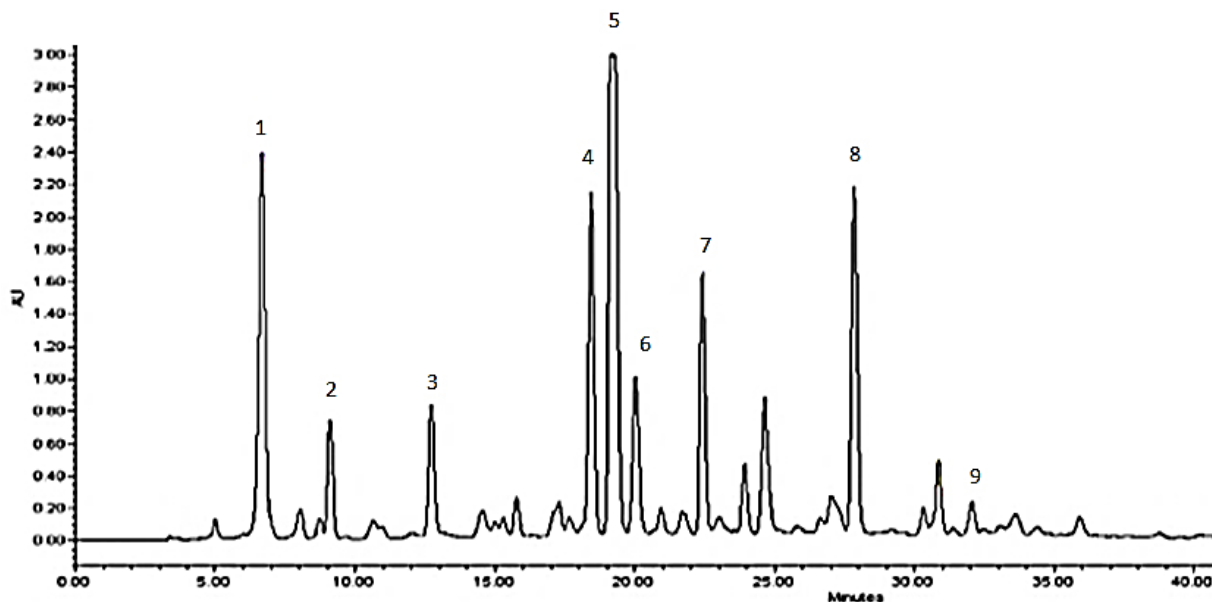


Figura 31 Cromatograma de un extracto enriquecido en derivados -ACQ de hojas de camote morado. Pico 1: 5-ACQ, pico 2: AC, pico 3: AFQ, pico 4: 3,4-diCQ, pico 5: 3,5-diCQ, pico 6: 4,5-diCQ, pico 7: 3,5FCQ, pico 8: 4,5FCQ, pico 9: 3,4,5-triCQ.

10.3.1.3 Cuantificación de los derivados-ACQ en cada órgano

Adicionalmente, en esta investigación, se realizó la cuantificación de cada uno de los derivados-ACQ que fueron caracterizados en cada órgano de la planta. Los datos se muestran en el Cuadro 4, donde se observa que los ácidos mayoritarios en todos los órganos de esta variedad mexicana de camote morado son el 3,5-diCQ y el 5-CQ, representado el 50%; mientras que los otros dos isómeros de di-CQ (3,4- y 4,5-) representan el 35% del total de los derivados-ACQ cuantificados, es decir, estos 4 ácidos son los mayoritarios en toda la planta de camote morado. También podemos observar, que el total de los derivados-ACQ, corresponden aproximadamente al 65% del total de fenoles mostrados en la Figura 23.



Cuadro 4 Cuantificación de los derivados-ACQ en cada órgano de la planta de camote morado

Núm	Calidad de raíz tuberosa (mg/g BS)			Tamaño de hoja (mg/g BS)				Tallo (mg/g BS)	Flor (mg/g BS)
	1ra	2da	3ra	XP	P	M	G		
1	5.2 ± 0.6	4.3 ± 0.5	6.6 ± 0.7	40.6 ± 3.5	22.9 ± 3.3	20.4 ± 3.1	20.4 ± 2.9	13.6 ± 1.4	1.9 ± 0.1
2	N/D	N/D	N/D	5.8 ± 0.6	8.9 ± 0.9	6.6 ± 0.7	4.7 ± 0.8	4.0 ± 0.05	0.5 ± 0.06
3	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.3	5.8 ± 0.7	3.6 ± 0.5	7.8 ± 1.5	7.4 ± 0.9	6.2 ± 0.06	2.1 ± 0.3
4	N/D	N/D	N/D	27.5 ± 1.9	15.3 ± 1.6	24.3 ± 2.6	24.1 ± 2.6	17.4 ± 2.1	20.9 ± 3.2
5	23.9 ± 1.5	20.8 ± 1.2	25.8 ± 2.1	52.6 ± 3.6	45.5 ± 5.1	35.3 ± 4.3	36.9 ± 5.3	45.6 ± 5.3	48.8 ± 5.5
6	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.2	1.67 ± 0.2	32.9 ± 3.1	35.3 ± 4.2	31.3 ± 5.3	23.5 ± 2.7	45.9 ± 5.7	19.5 ± 2.2
7	N/D	N/D	N/D	6.8 ± 0.5	2.8 ± 3.6	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.07	1.8 ± 0.1
8	N/D	N/D	N/D	0.27 ± 0.3	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.06	0.5 ± 0.09	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.03
9	N/D	N/D	N/D	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.08	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.05	1.2 ± 0.09
Total	34.09	27.74	34.82	173.17	135.70	128.09	125.91	134.12	96.93

Los datos se muestran como media ± DE (desviación estándar)

11.3.2 Antocianinas

11.3.2.1 Identificación de las antocianinas

La identificación de las antocianinas se realizó utilizando los extractos pre-purificados/crudos de antocianinas, de cada órgano de la planta de camote por HPLC y HPLC-EM; los datos obtenidos (Cuadro 5) fueron comparados con los reportados en la literatura.



Cuadro 5 Caracterización e identificación de las antocianinas presentes en cada órgano de la planta de camote morado por HPLC-EM..

Núm	Antocianina	PM (M+1)	Fragmento (m/z)	Raíz	Flor	Hoja	Tallo
1	Cianidina 3-p-hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido	893	731	+	-	+	-
2	Peonidina 3-p-hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido	907	745	+	-	-	-
3	Cianidina 3-cafeoil-p-hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido	1055	893	+	-	+	-
4	Cianidina 3-cafeoil-feruloil-soforósido-5-glucósido	1111	1055, 949	+	-	+	-
5	No identificada	1099	937, 463	+	-	-	-
6	Peonidina 3-(6',6''-di-cafeoil-soforósido)-5-glucósido	1111	1069, 303	+	-	+	-
7	Peonidina 3-cafeoil-p-hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido	1069	907	+	-	+	-
8	Peonidina 3-cafeoil-feruloil-soforósido-5-glucósido	1125	963	+	-	-	-
9	Cianidina 3-di-feruloil-soforósido-5-glucósido	1125	963	+	-	+	-
10	Peonidina 3-p-hidroxibenzoil-feruloil-soforósido-5-glucósido	1083	921,301	+	-	-	-
11	Peonidina 3-cafeoil-soforósido-5-glucósido	949	787, 303	-	-	+	-
12	Cianidin 3-di-cafeoil-soforósido-5-glucósido	1097	935	-	+	+	+
13	Cianidina 3-feruloil-soforósido-5-glucósido	949	787	-	-	+	-
14	Peonidina 3-cafeoil-cumaroil-soforósido-5-glucósido	1095	303	-	-	+	-
15	Cianidina 3-cafeoil-soforósido-5-glucósido	935	773	-	+	-	+
16	Cianidina 3-cafeoil-cumaroil-soforósido-5-glucósido	1081	919	-	+	+	+

*Compuestos que fueron caracterizados por RMN (ANEXO 1)

El signo +, significa identificado

El signo -, significa no identificado



En el Cuadro 5, se muestran las 16 de antocianinas identificadas en los diferentes órganos de la planta de camote morado, cuyos perfiles fueron comprados con la base de datos descrita por Kim y colaboradores (H. W. Kim et al., 2012b). Todas las antocianinas están aciladas con ácidos: *p*-hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico y cumárico; tri-glicosiladas y con aglucón de peonidina o cianidina. De estas 16 antocianinas, 10 fueron di-aciladas, 5 mono-aciladas, y una no identificada. Cada órgano de la planta presentó un perfil particular: en la raíz se detectaron la presencia de 10: 7 di-aciladas, 2 mono aciladas y una no identificada, en las cuales su aglucón principalmente fue peonidina.

Así mismo, en las hojas también se detectó la presencia de 10 antocianinas, pero principalmente con aglucona de cianidina, de las cuales 8 fueron di-aciladas y 2 mono-aciladas. Estos datos coinciden con lo reportado previamente por Vishnu y colaboradores (Vishnu et al., 2019b), quienes reportan que en las hojas de camote tienen una mayor proporción de cianidina que de peonidina, y en las raíces reportan una mayor proporción de peonidina que de cianidina.

Por otro lado, en los tallos y flores, las antocianinas solo fueron identificadas 3 antocianinas, todas con aglucón de cianidina; de estas, dos fueron di-aciladas y una mono-acilada, a la fecha no hay datos que describan los perfiles de antocianinas presentes en tallos y flores de camote.

11.3.2.2 Obtención de las antocianinas

A partir de las raíces de 3ra calidad de la planta de camote (RC-163), se realizó un extracto enriquecido y pre-purificado de antocianinas, y se llevó a cabo la separación por HPLC-semi-preparativo de 6 antocianina; el cromatograma del extracto total se muestra en la Figura 32.



En el Cuadro 5 se presenta la caracterización de cada una de ellas por T_R (HPLC), por peso molecular (HPLC-EM), y la caracterización completa de la antocianina 7 se realizó por RMN (ANEXO 1). A partir de esta separación y caracterización, se realizaron curvas de calibración por HPLC (Cuadro A2, ANEXO 2) para cuantificar en cada órgano dichos compuestos; a escala preparativa solo se obtuvo la antocianina 7 por lo que fue la que se utilizó para la determinación de los parámetros cinéticos de las oxidasas.

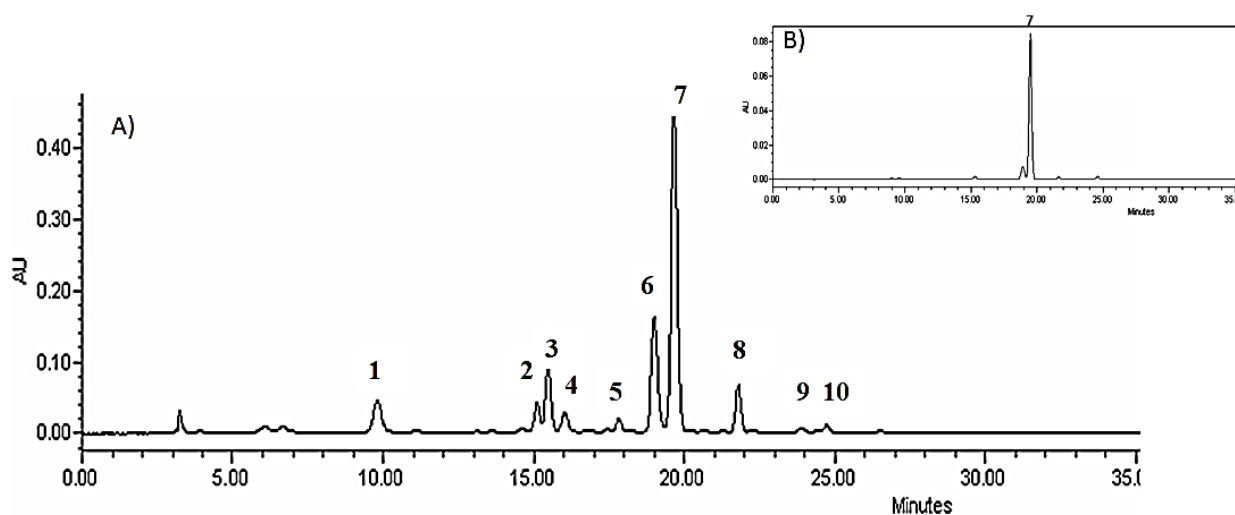


Figura 32 A) Cromatograma de un extracto enriquecido en antocianinas de la raíz de camote morado. B) antocianina aislada: Peonidina 3-cafeoil-p-hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido.

11.3.2.3 Cuantificación de las antocianinas

Se cuantificaron 6 antocianinas en los diferentes órganos de la planta de camote morado. Sin embargo, las antocianinas que se aislaron en esta investigación, ninguna fue identificada en tallos y flores, por lo que los datos que se muestran en el Cuadro 6 solo incluyen a las hojas y raíces en sus diferentes clasificaciones.



Cuadro 6 Cuantificación de las antocianinas en cada órgano de la planta de camote morado.

Núm	Calidad de la raíz tubero (mg/g BS)			Tamaño de hoja (mg/g BS)			
	1ra	2da	3ra	XP	P	M	G
2	0.21±0.01	0.22±0.02	0.26±0.02	N/D	N/D	N/D	N/D
4	0.47±0.03	0.70±0.04	0.81±0.04	0.14±0.02	0.15±0.02	N/D	N/D
6	0.26±0.02	0.31±0.02	0.34±0.02	0.14±0.02	0.23±0.03	0.15±0.03	N/D
7	1.10±0.16	1.15±0.17	1.30±0.18	0.40±0.04	0.34±0.03	0.10±0.04	N/D
8	0.49±0.09	0.51±0.04	0.62±0.08	0.34±0.4	0.24±0.03	0.25±0.03	N/D
9	0.28±0.03	0.40±0.02	0.33±0.02	N/D	N/D	N/D	N/D
Total	2.84	3.29	3.66	1.02	0.96	0.50	-

Los datos se muestran como media ± DE (desviación estándar).

Es de gran importancia, destacar que la antocianina mayoritaria en esta variedad mexicana de camote morado en hojas y raíces es la antocianina 7 que corresponde a una antocianina di-acilada: peonidina 3-cafeoil-*p*-hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido, representando del 36-40% del total de las antocianinas aisladas y el 30% del total de las antocianinas cuantificadas (Figura 32). Tomando en cuenta que el grado de acilación, influye en la estabilidad y biodisponibilidad de este grupo de compuestos, es decir, a mayor acilación, las antocianinas presentan una mejor estabilidad térmica y de pH.



11.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los ácidos: 5-CQ, 4,3- y 4,5-diCQ como moduladores de la función mitocondrial en los hepatocitos primarios de ratón

Para señalar la importancia de los derivados-ACQ como compuestos bioactivos, se llevaron a cabo experimentos adicionales y, de esta manera proponer a 3 de los derivados-ACQ más abundantes de la planta de camote morado, como moduladores de la función mitocondrial. Los ácidos evaluados fueron los ácidos: 5-CQ, 3,4-diCQ y 4,5-diCQ para pruebas de estrés mitocondrial en hepatocitos primarios de ratón, éstos fueron tratados con una concentración creciente de cada derivado-ACQ. Mostrando los siguientes datos, el 5-CQ no modificó la respiración basal, ni el consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP y la respiración no mitocondrial. Sin embargo, el 5-CQ aumentó significativamente la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva de los hepatocitos primarios, lo que indica un aumento de la capacidad oxidativa mitocondrial (Figura 33). Respecto a los parámetros glucolíticos el 5-CQ no modificó ninguno, excepto por una disminución de la capacidad glucolítica a 5 $\mu\text{g/L}$.



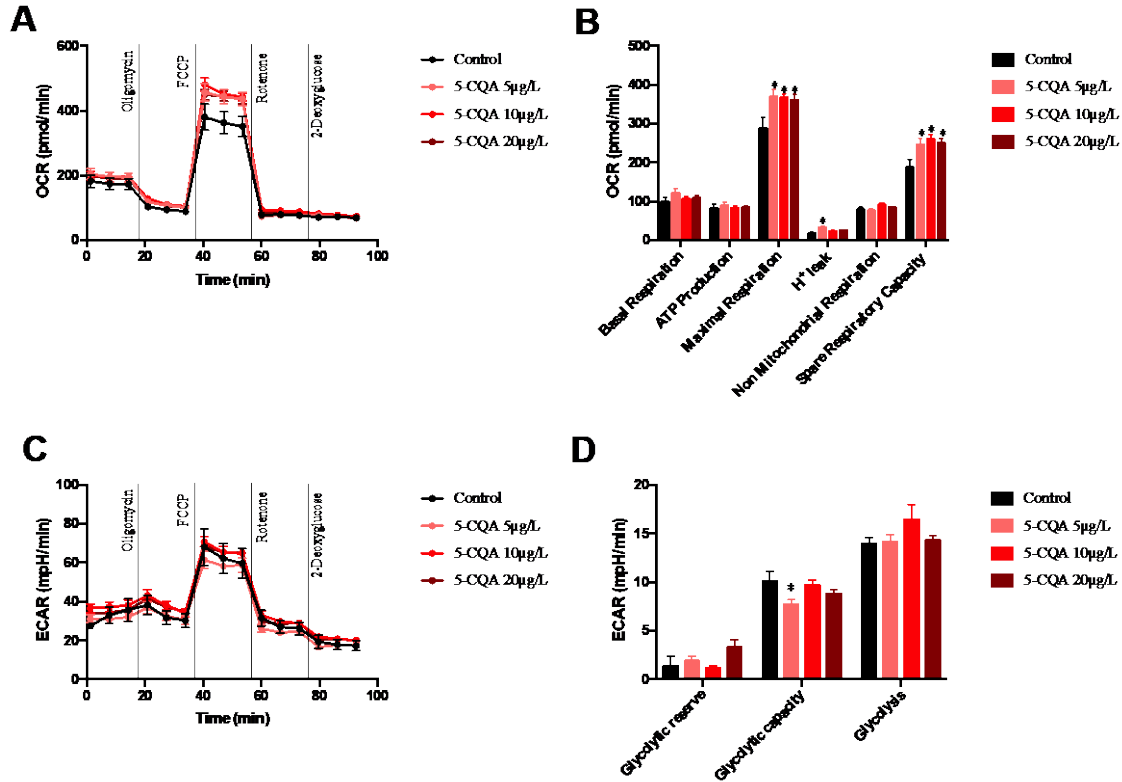


Figura 33 Evaluación de la respiración mitocondrial del ácido 5-CQ A) Tasa de consumo de oxígeno (OCR), B) parámetros de función mitocondrial, C) tasa de acidificación extracelular (ECAR) y D) parámetros glucolíticos en hepatocitos primarios de ratón incubados durante 18 h con las concentraciones indicadas de 5-CQ. Cada barra es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $p \leq 0.05$ usando una prueba t-Student y se indica con *.

EL ácido 3,4-diCQ no modificó la respiración basal, el consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP y la respiración no mitocondrial. Sin embargo, y de forma similar al ácido 5-CQ, el 3,4-diCQ aumentó significativamente la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva de los hepatocitos primarios, lo que indica un aumento de la capacidad oxidativa mitocondrial (Figura 34). Sin embargo, el ácido 3,4-diCQ aumentó significativamente la reserva glucolítica. Estos resultados indican que el ácido 3,4-diCQ aumenta la función mitocondrial y la capacidad celular para responder a una demanda de energía a través de la glucólisis en los hepatocitos primarios.



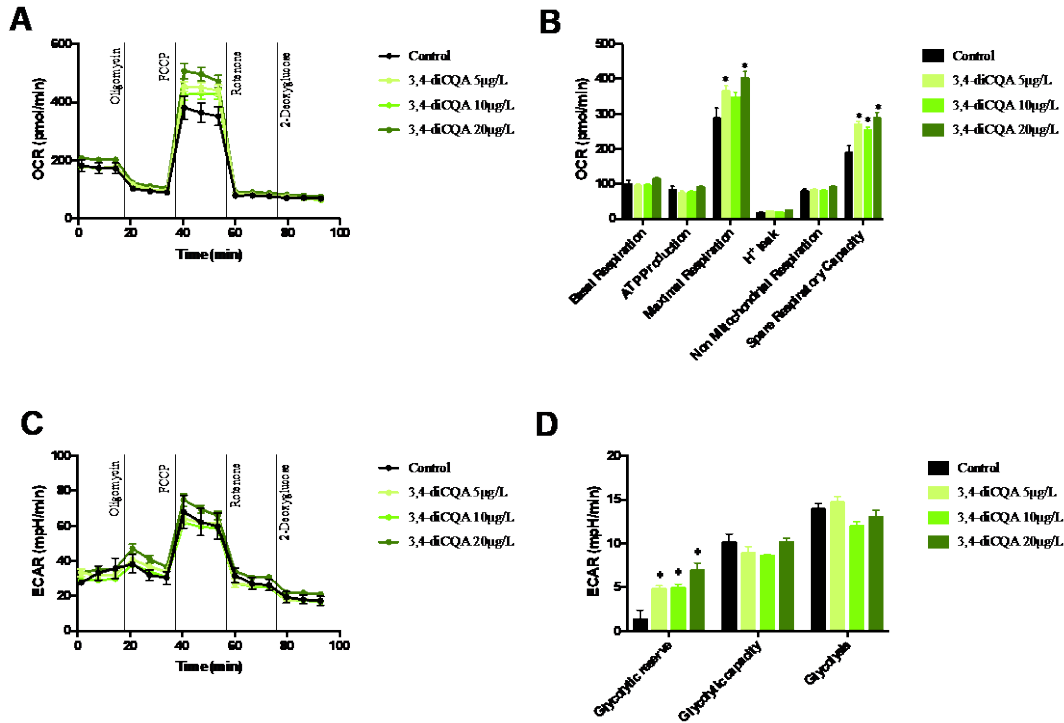


Figura 34 Evaluación de la respiración mitocondrial del ácido 3,4-diCQ A) Tasa de consumo de oxígeno (OCR), B) parámetros de función mitocondrial, C) tasa de acidificación extracelular (ECAR) y D) parámetros glucolíticos en hepatocitos primarios de ratón incubados durante 18 h con las concentraciones indicadas de 3,4- diCQ. Cada barra es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $p \leq 0.05$ usando una prueba t-Student y se indica con *.

Finalmente, el ácido 4,5-diCQ presentó una respuesta diferente al derivado de 3,4-di-CQ. El 4,5-diCQ no afectó a ninguno de los parámetros mitocondriales a excepción del consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP y la respiración no mitocondrial que aumentaron a una concentración de 5 $\mu\text{g/L}$ (Figura 35). Además, el 4,5-diCQ no modificó ningún parámetro glucolítico en forma similar al 5-CQ, excepto por un aumento de la glucólisis a 5 $\mu\text{g/L}$. Estos resultados indican que el ácido 4,5-diCQ no modifica la función mitocondrial, pero aumenta la glucólisis a baja concentración en los hepatocitos primarios.



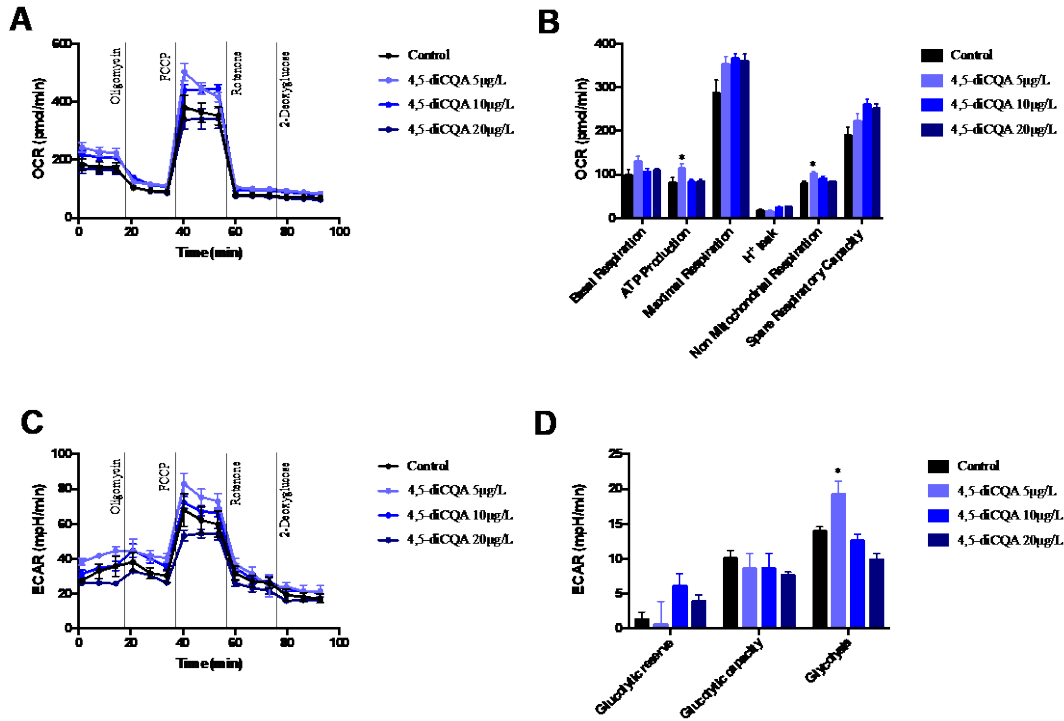


Figura 35 Evaluación de la respiración mitocondrial del ácido 4,5-diCQ A) Tasa de consumo de oxígeno (OCR), B) parámetros de función mitocondrial, C) tasa de acidificación extracelular (ECAR) y D) parámetros glucolíticos en hepatocitos primarios de ratón incubados durante 18 h con las concentraciones indicadas de 4,5- diCQ. Cada barra es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $p \leq 0.05$ usando una prueba t-Student y se indica con *.

También se evaluó el efecto de los 3 derivados-ACQ en la oxidación de ácidos grasos en hepatocitos primarios, para ellos se realizó una prueba de estrés mitocondrial en presencia de palmitato como principal fuente de oxidación en hepatocitos primarios de ratón tratados con concentración creciente de cada uno de los derivados-ACQ. Se demostró que el 3,4-diCQ aumentó la oxidación de ácidos grasos tanto en la respiración basal como en la respiración máxima en todas las concentraciones utilizadas (Figura 36 B), mientras que 5-CQ aumentó solo la oxidación de ácidos grasos en la respiración basal (Figura 36 A) y el 4,5-diCQ aumentó la oxidación de ácidos grasos tanto en la respiración basal como en la máxima sólo



a 20 $\mu\text{g/L}$ (Figura 36 C). En conjunto, estos datos indican que los derivados-ACQ aumentan significativamente la capacidad de oxidación de ácidos grasos en los hepatocitos.

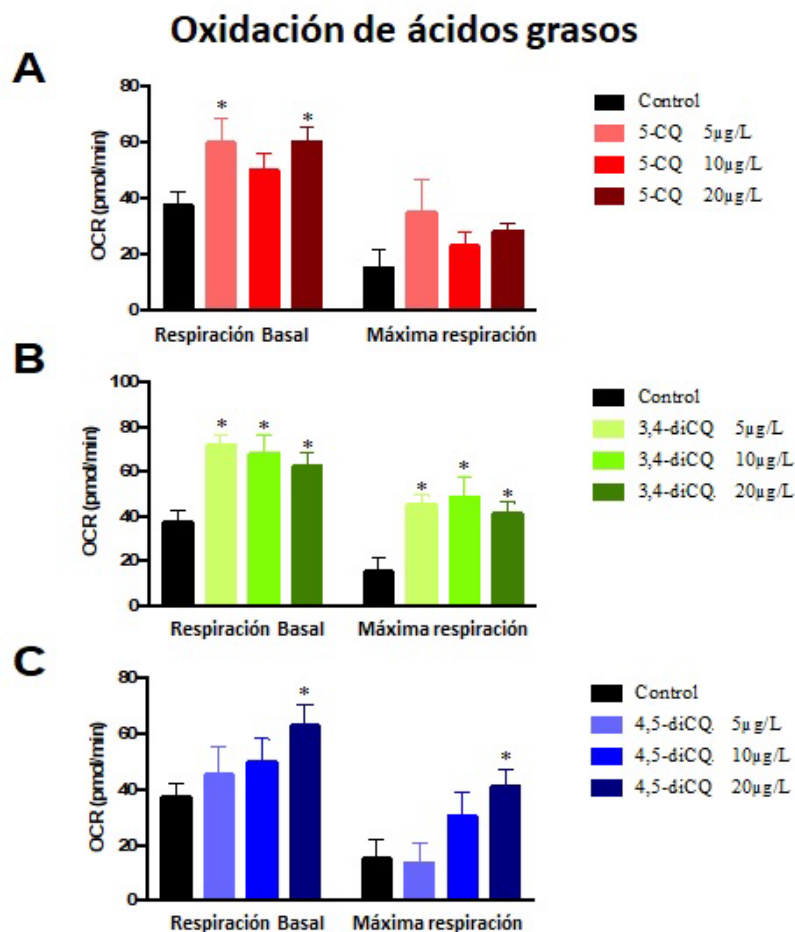


Figura 36 Tasa de consumo de oxígeno (OCR) utilizando palmitato como sustrato principal para la oxidación para estimar la oxidación de ácidos grasos en hepatocitos primarios de ratón incubados durante 18 h con las concentraciones indicadas de los ácidos A) 5-CQ, B) 3,4-diCQ y C) 4,5-diCQ. Cada barra es la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Las diferencias se consideraron significativas a $p \leq 0.05$ usando una prueba t-Student y se indica con *.

Con estos datos se demuestra que los ácidos 5-CQ y 3,4-diCQ aumentaron la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva de los hepatocitos primarios, lo que indica una función mitocondrial mejorada. Además, el ácido 3,4-diCQ aumentó la capacidad de los



hepatocitos para responder a una demanda de energía a través de la glucólisis. Por el contrario, el ácido 4,5-diCQ no modificó la función mitocondrial, pero aumentó la glucólisis a baja concentración en los hepatocitos primarios. Estos datos concuerdan con un informe anterior que mostró que los derivados-ACQ, extraídos de Achicoria (*Cichorium intybus* L.), promovieron un aumento de la respiración mitocondrial y el metabolismo celular en células de hepatoma de rata (Jackson, Rathinasabapathy, Esposito, & Komarnytsky, 2017).

Adicionalmente, este estudio respalda la noción del uso potencial de derivados-ACQ para ayudar en el tratamiento de enfermedades que involucran disfunción mitocondrial. La disfunción mitocondrial se produce en parte por alteraciones en la cadena de transporte de electrones y, por lo tanto, se sugiere que el uso de los ácidos 5-CQ y 3,4-diCQ podrían ayudar a superar dichas alteraciones, ya que inducen un aumento de OCR con el uso de FCCP. Por otro lado, se descarta que los derivados-ACQ podrían modificar la función de la ATP sintasa, conocida como complejo V, ya que los derivados-ACQ no modificaron la respuesta en presencia de oligomicina, un conocido inhibidor del complejo V. Sin embargo, una limitación de este estudio y la falta de información en la literatura se refieren a la fracción de derivados-ACQ y las proteínas celulares involucradas en la respuesta. A este respecto, Jackson y colaboradores en el 2017, proporcionaron pruebas de que la fracción de ácido cafeico es importante para mantener los efectos sobre la función mitocondrial (Jackson et al., 2017). En cuanto a las proteínas implicadas en la respuesta, podemos especular que la AMPK puede estar implicada ya que un extracto rico en derivados-ACQ de *Pandanus tectorius* indujo la activación de AMPK en el hígado de hámsteres (X. Zhang et al., 2013). En particular, la AMPK modula la función mitocondrial en dos niveles: la AMPK activa por el proliferador de peroxisomas el proliferador-activador del receptor- γ -coactivado 1 α (PGC1- α), que



aumenta la actividad de los factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial y, por tanto, aumenta el gasto energético (Cantó et al., 2009) y la AMPK fosforila el factor de fisión mitocondrial (MFF) que regula la fisión mitocondrial (Toyama et al., 2016), proceso que aumenta el número de mitocondrias durante las agresiones de estrés como la privación de nutrientes, lo que permite la mitofagia de fragmentos sin potencial de membrana (Herzig & Shaw, 2018). Además, se ha demostrado que otro compuesto fenólico, como la isoflavona genisteína, activa la AMPK y conduce a un aumento de la oxidación de los ácidos grasos (Palacios-González et al., 2014).

Los resultados de esta investigación también demostraron que los derivados-ACQ aumentan significativamente la capacidad de oxidación de ácidos grasos en los hepatocitos. Anteriormente, se observó que un aumento de la oxidación de ácidos grasos en los hepatocitos mejora la esteatosis hepática en ratones alimentados con una dieta rica en grasas (Zamora-López et al., 2020). Por lo tanto, los derivados-ACQ podrían ser un enfoque alternativo para mejorar la esteatosis hepática, que debe abordarse en estudios posteriores.

Cabe destacar, que las mitocondrias son la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un aumento de ROS provoca estrés oxidativo (Betteridge, 2000) que genera peroxidación lipídica, daño a las proteínas y se ha asociado con la producción de daño tisular en enfermedades como la obesidad, la diabetes tipo 2 y de muchos trastornos neurológicos como el Alzheimer y Enfermedades de Parkinson (Bhatti, Bhatti, & Reddy, 2017). También, se ha confirmado que los derivados-ACQ protegen a las células de neuroblastos SH-SY5 contra la lesión inducida por H_2O_2 a través de un mecanismo que implica la activación de enzimas antioxidantes endógenas (Jiang et al., 2017). Por lo tanto,



es posible que la mejora en la función mitocondrial que observamos pueda atribuirse a la capacidad antioxidante de los derivados-ACQ.

Además, la disfunción mitocondrial desempeñan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) que incluye esteatosis hepática y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que puede progresar a fibrosis y cirrosis (Rector, Thyfault, Wei, & Ibdah, 2008). NAFLD es una característica común de la obesidad, la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico. De hecho, al 53% de los niños con obesidad y al 65% de las personas con obesidad de clases I y II, se les diagnostica con NAFLD (Tominaga et al., 2009). Por lo tanto, los derivados-ACQ tienen un potencial como suplementos nutricionales terapéuticos para NAFLD, especialmente debido a su efecto sobre los hepatocitos primarios.

A manera de conclusión de este ensayo biológico, se puede decir, que debido a que cada derivado-ACQ presentó un efecto diferente, el uso de extractos que contienen varios derivados-ACQ podría potenciar su eficacia terapéutica. Nuestros datos sobre células hepáticas *in vitro* son relevantes para un organismo completo, ya que previamente se ha comprobado la absorción de los derivados-ACQ en humanos.

11.5 OXIDASAS EN LOS CAMOTES MORADOS

Los resultados anteriores, demuestran que la planta de camote morado es una excelente fuente de metabolitos secundarios, específicamente de derivados-ACQ con concentraciones equivalentes o superiores a vegetales que son característicos por el contenido de estos compuestos. Además, de las concentraciones elevadas y la gran diversidad de derivados-



ACQ se demuestra que tienen grandes beneficios sobre la salud humana, por ejemplo, como auxiliares en el tratamiento de enfermedades que involucran disfunción mitocondrial.

Por otro lado, los camotes morados mexicanos, contienen de las mejores fuentes de antocianinas comestibles reportadas en la naturaleza. Ya que, por su alta acilación, presentan características químicas, físicas y biológicas destacables. Y, además, hace que estas antocianinas sean un candidato realmente competitivo con los colorantes artificiales.

Sin embargo, tanto los derivados-ACQ como las antocianinas (por su estructura química en la que poseen una gran cantidad de grupos cafeoilo/catecol) se pueden ver comprometidos, por la presencia de oxidasas, en específico de las PFO y POD. Por lo que a continuación se presentan los resultados de cuanto afectan las oxidasas a este grupo de fenoles de la planta de camote.

11.5.1 Identificación de la PFO y de la POD

Para hacer la identificación de la PFO y de la POD en cada órgano de la planta de camote morado, se realizaron reacciones colorimétricas con extractos enriquecidos de estas enzimas de cada órgano utilizando sustratos control de cada enzima. Para la PFO se utilizó: catecol y oxígeno, mientras que la POD se utilizaron en una reacción: guayacol y H_2O_2 y en otra: ABTS y H_2O_2 (Figura 37).

La extracción enzimática se llevó a cabo, eliminando con resinas la coloración propia de vegetal (morado) y la coloración debida a las reacciones aceleradas de oxidación (pardeamiento oxidativo) y posteriormente, una precipitación por punto isoeléctrico en cada órgano; en el caso de la raíz se hizo un comparativo del extracto crudo, el precipitado por punto isoeléctrico y la parte acuosa del último.



Este primer ensayo se realizó debido a que no hay estudios específicos sobre las oxidasas en camotes morados en ninguno de sus órganos. En esta identificación colorimétrica, se puede observar (Figura 37) un cambio de coloración específico para cada sustrato, dicho cambio significó una reacción positiva, es decir presencia de las enzimas de interés, en cada grupo de sustrato hubo un control negativo, el cual contenía los sustratos, pero no contenía el extracto enzimático; en caso de las reacciones que contenía H_2O_2 se incluyó una reacción adicional que contenía POD de rábano (estándar comercial) el cual se empleó como control positivo. Todas las reacciones de cada órgano empleando catecol y oxígeno como sustrato control de la PFO por lo que generaron tonalidades ámbar, permitiendo concluir que todos los órganos de la planta contienen PFO. Respecto a la presencia de POD, además de un control negativo, se utilizó un control positivo para asegura el tono de coloración ya sea utilizando guayacol o ABTS, en este caso utilizando guayacol, todas las reacciones dieron positivo (color rojizo), pero con ABTS, solo dieron positivo el precipitado de la raíz y los tallos (tono palo de rosa), por lo que se puede decir, que la POD solo se detectó en tallos y raíz (Figura 37).



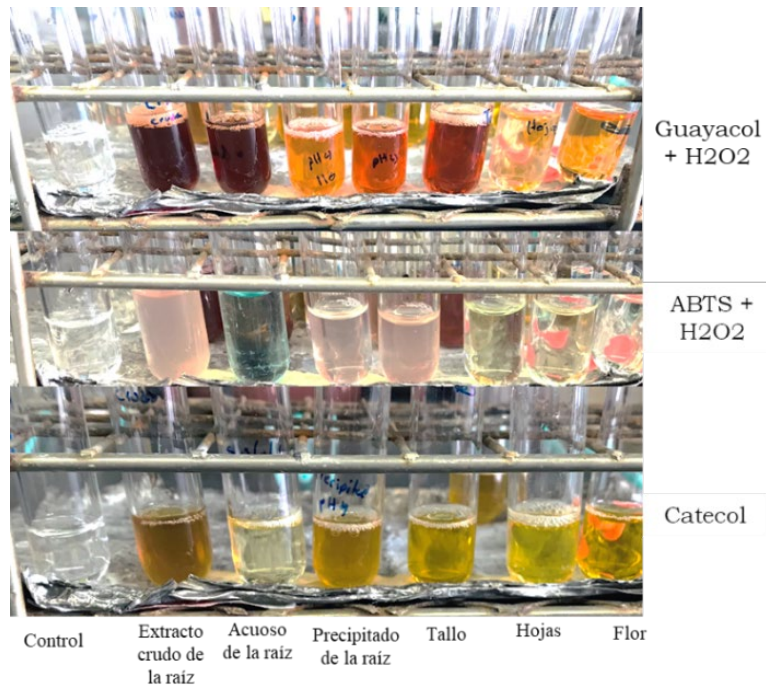


Figura 37 Reacciones de oxidación colorimétricas de cada órgano de la planta de camote, usando diferentes sustratos.

Posteriormente, se realizó un análisis de proteínas por electroforesis (Figura 38) y se detectaron las bandas de las oxidasas de interés por peso molecular de acuerdo con lo reportado en las bases de datos utilizadas; también se incluyó como referencia un extracto enzimático de camote blanco (debido a que de esta variedad se ha cristalizado la PFO) y de rábano (POD comercial). Además, se implementó una identificación por zimograma que permitió, por reconocimiento de sustrato (catecol para PFO+ oxígeno y guayacol + H₂O₂ para POD: Figura A1 y A2, ANEXO 3), confirmar las bandas de cada una de ellas. En la parte de los zimogramas, solo se logró confirmar la presencia tanto de la PFO como de la POD en las raíces.



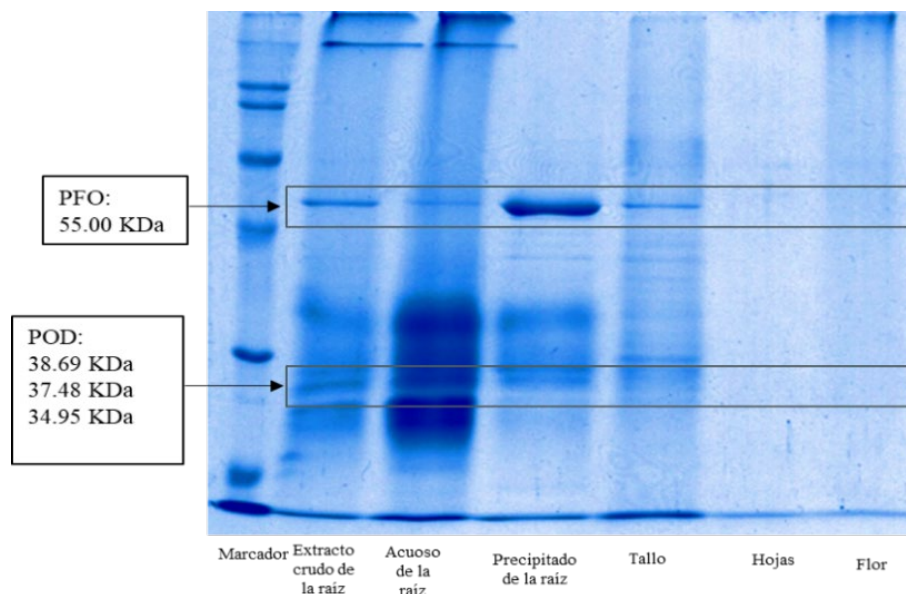


Figura 38 Gel de poliacrilamida 12 % de los extractos enzimáticos de cada uno de los órganos de la planta de camote morado

Finalmente, en esta parte de identificación de las oxidasas, se midieron la actividad enzimática y la proteína en cada órgano de la planta, los resultados se muestran en el Cuadro 7, en donde se observa que las actividades enzimáticas más altas para las dos oxidasas de la planta de camote, está en la raíz. Por lo que, para hacer la purificación y caracterización de estas enzimas en los ensayos siguientes, se utilizó únicamente la raíz.

Cuadro 7 Actividad enzimática de la PFO y POD en cada órgano de la planta de camote morado

Órgano	Actividad enzimática/mL PFO	Actividad enzimática/mL POD	Protein $\mu\text{g/mL}$
Precipitado de extracto de raíz	10.23 \pm 1.8	37.36 \pm 2.05	152.36
Hojas	1.03 \pm 0.11	5.06 \pm 0.19	264.96
Flores	0.93 \pm 0.10	1.96 \pm 0.21	182.27
Tallos	1.98 \pm 0.13	22.63 \pm 0.98	201.45



11.5.2 Extracción y caracterización de la PFO

Para evitar reacciones de oxidación no deseadas y la formación de melanoidinas debido a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de la PFO de la raíz de camote, se aplicó un procedimiento de separación de dos pasos: la adición de amberlita y, posteriormente carbón activado; lo que permitió la eliminación de antocianinas y ácidos fenólicos, respectivamente, del extracto de PFO. La actividad de la enzima se midió en cada etapa del proceso de purificación como se muestra en el Cuadro A3, ANEXO 4.

Posteriormente, se realizó un precipitado con sulfato de amonio, el cual se utilizó como material de partida para la cromatografía de intercambio iónico. La actividad de PFO se encontró en las primeras 11 fracciones (Figura 39), y la actividad de PFO más alta se observó para la fracción 5, fracción que se utilizó para la caracterización por pH, temperatura, comportamiento por presencia de iones, y para comparar la especificidad de sustrato de los principales compuestos fenólicos extraídos en este trabajo.

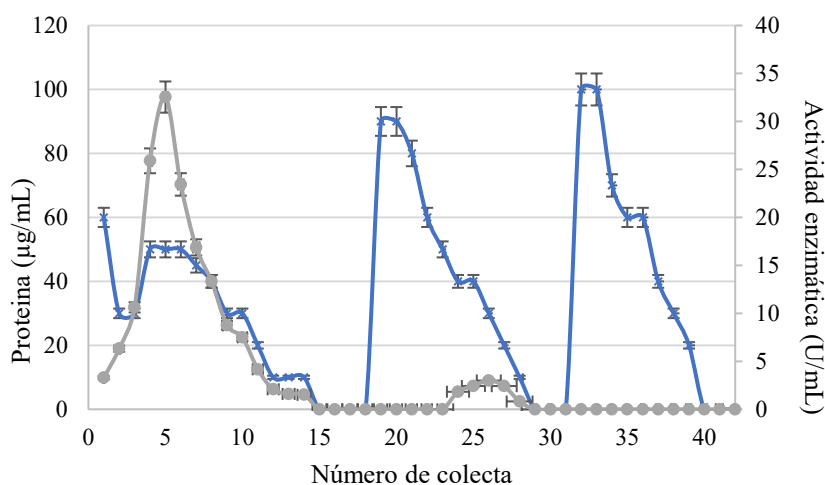


Figura 39 Valores de actividad enzimática y concentración de proteína de cada colecta de la columna de intercambio iónico. La línea gris describe la actividad enzimática /mL y la línea azul describe la proteína (µg/mL) $n = 3$



- **Evaluación del pH y temperatura**

Dado que la actividad de las enzimas depende estrictamente del pH de la reacción (Bisswanger, 2014). Las condiciones óptimas de rendimiento de la PFO se establecieron como se muestra en la Figura 40. La enzima se inactivó completamente a pH inferiores a 4 y superiores a 7 a 30 °C. La actividad máxima se observó a pH 7, mientras que para pH por debajo de 6 el rendimiento de PFO disminuyó gradualmente en un 20 a 80%. Estos resultados coincidieron con los reportados por Nozue M. y colaboradores (Nozue, Souri, Arakawa, & Kojima, 1998) quienes encontraron un pH óptimo de 6.7 para una de las isoformas de PPO extraídas del camote.

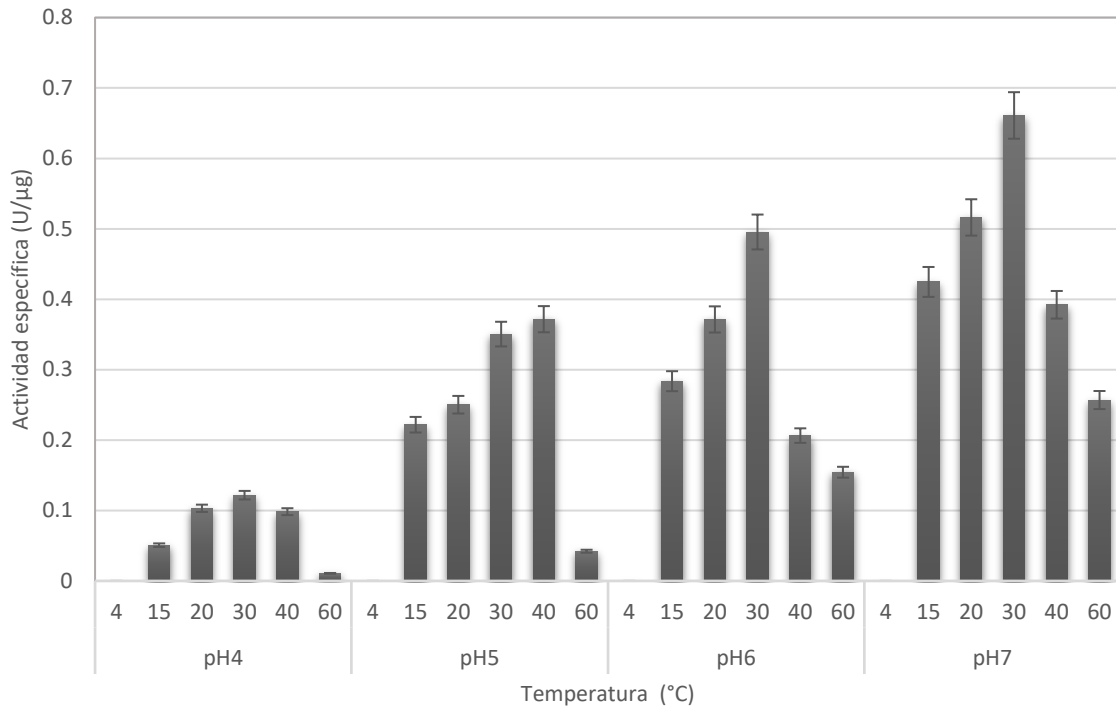


Figura 40 Actividad específica del PFO de camote morado por efecto del pH y la temperatura, utilizando catecol como sustrato. n = 3.



Otro factor crítico que afecta la eficiencia catalítica de la enzima es la temperatura, como se muestra en la Figura 40, no se detectó actividad para PFO por debajo de 15 °C mientras que la temperatura óptima para esta enzima se observó entre 20-30 °C. Se registró una disminución en el rendimiento de la enzima para temperaturas por encima de esa ventana óptima a través de diferentes pH, por ejemplo, una disminución del 22% de la actividad específica a pH 7; 10% a pH 6; 89% a pH 5 y 72% a pH 4. Estos resultados fueron consistentes con los rangos de temperatura óptimos de otras PFO de diferentes plantas, por ejemplo, la manzana (30 °C), papa (45 °C), lechuga (25-25 °C), entre otros (Jukanti, 2017b). Sin embargo, Manohan & Wai determinaron la temperatura óptima para la actividad de PFO de camote fue a 30 °C en lugar de un rango de temperaturas (Manohan & Wai, 2012).

- **Efecto de los inhibidores y estimuladores químicos sobre la actividad de la PPO**

Dado que se sabe que la PFO del camote posee un sitio activo di-cúprico (Klabunde et al., 1998), se investigó el efecto de los iones divalentes, como los metales alcalinotérreos y de transición, sobre la actividad enzimática. Además, se incluyó EDTA en el ensayo como un quelante químico común. Como se muestra en la Figura 41, la adición de metales alcalinotérreos (Ca^{2+} , Ba^{2+} y Mg^{2+}) o EDTA no tuvo ningún efecto sobre el desempeño de la PFO en comparación con un control (sin agente químico agregado). Sin embargo, se observó una mayor actividad específica de la PFO en presencia de metales de transición, como Cu^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} . El efecto más pronunciado sobre la actividad enzimática fue mostrado por los iones de cobre con un aumento de dos veces en comparación con el control. Este resultado se mantiene de acuerdo con las observaciones de otras PFO encontradas en frutas como el albaricoque y la manzana, donde la adición de iones Cu^{2+} mejoró el rendimiento enzimático



en un 134% (Derardja, Pretzler, Kampatsikas, Barkat, & Rompel, 2017) y un 145% (Aydin, Gulcin, & Alwasel, 2015), respectivamente. Se observó el efecto opuesto para Zn^{2+} , que fue el único metal divalente y de transición que redujo significativamente la actividad específica de la PFO (71%) en nuestro estudio. Asimismo, otros autores describieron un efecto inhibitor similar del Zn^{2+} sobre el rendimiento de la PFO, por ejemplo, en lentejas (*Lens culinaris Medik*) (Sikora et al., 2019) y en manzanas (*Malus communis L.*) (Aydin et al., 2015).

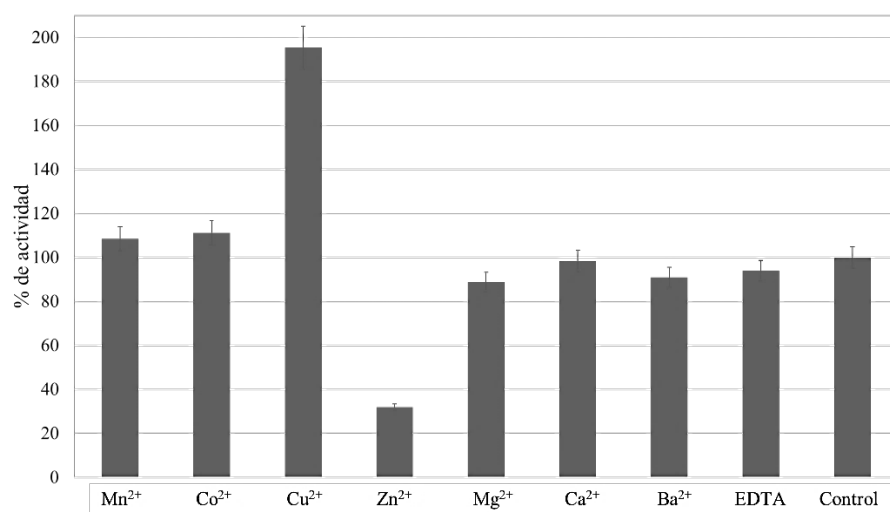


Figura 41 Porcentaje del efecto sobre la actividad específica con respecto al control de la PFO de inhibidores y estimuladores químicos (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , EDTA y control) pH 7, 30 °C y catecol como sustrato. $n = 3$.

11.5.2.1 Evaluación del efecto del PFO sobre los principales fenoles de camote morado

La PFO requiere la presencia de oxígeno para lograr la oxidación de los compuestos fenólicos (Bibhuti Bhusan Mishra, 2016) y, dependiendo de la fuente de la planta, la actividad de esta enzima varía con la concentración y el tipo de sustrato (Jukanti, 2017b). Por lo tanto, el enfoque de esta investigación fue evaluar el efecto de las oxidasas sobre de los metabolitos secundarios más abundantes y que muestran importantes propiedades biológicas y tecnológicas del camote morado.



Antes de los experimentos cinéticos, los sustratos y las soluciones de control se prepararon a una concentración de 0.31 mM a la cual todos los sustratos mostraron actividad enzimática cuantitativa y solubilidad completa en tampón fosfato pH 7 y 30 °C (Figura 42) y la actividad específica más alta se mostró para los ácidos 3,5-diCQ y 3,4,5-triCQ, seguidos de 5-CQ, ácido cafeico, peonidina acilada con ácidos cafeico y p-hidroxibenzoico. La PFO demostró la menor preferencia por los ácidos 3,4- y 4,5-di.-CQ, 4,5-FCQ en comparación con el catecol (control).

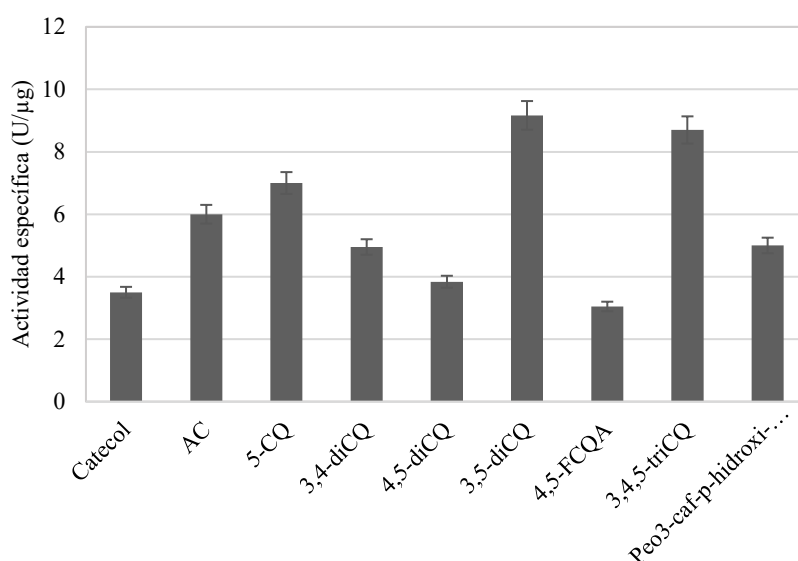


Figura 42 Actividad específica de la PFO para 8 estructuras fenólicas extraídas de la planta de camote morado y catecol (control) a una concentración de sustrato de 0,31 mM, pH 7 y 30 °C. n = 3.

Posteriormente, se determinaron los parámetros cinéticos de la enzima (K_m y V_{max}) para los sustratos fenólicos. Como se enumera en el Cuadro 8, la PFO mostró los valores de K_m más bajos, entendidos como la afinidad más alta, para los ácidos 3,4,5-triCQ y 3,5-diCQ. Respectos a los siguientes sustratos, 5-CQ y ácido cafeico; 3,4-diCQ, antocianina acilada; y 4,5-diCQ, se observó un aumento en el parámetro de K_m obtenido de casi 2,4; 3; y 3,4 veces en comparación con 3,4,5-triCQ, respectivamente. Por el contrario, 4,5-FCQ y catecol fueron



estructuras por las que la PFO presentó la menor especificidad de sustrato. Nuestros resultados se mantuvieron de acuerdo con los reportados por Lourenco et al. (Lourenco, Neves, & Da Silva, 1992) quienes encontraron la mayor afinidad de la PFO de camote es por el ácido clorogénico con valores comparables a los del ácido cafeico, y una menor afinidad hacia el catecol.

Cuadro 8 Parámetros cinéticos determinados para la PFO y 8 sustratos extraídos de la planta de camote morado y catecol como control a pH 7 y 30 °C.

Compuesto	K _m	V _{max}
Catecol	0.62±0.08 ^F	200.00±25.11 ^d
Ácido 5-CQ	0.22±0.02 ^C	270.18±31.47 ^f
Ácido cafeico	0.22±0.02 ^C	140.84±20.73 ^a
Ácido 4,5-diCQ	0.31±0.04 ^E	161.29±21.36 ^{bc}
Ácido 3,5-diCQ	0.14±0.01 ^B	277.78±36.94 ^f
Ácido 3,4-diCQ	0.27±0.04 ^D	178.57±20.36 ^c
Ácido 4,5-FCQ	0.68±0.09 ^G	212.77±29.65 ^d
Ácido 3,4,5-triCQA	0.09±0.01 ^A	238.95±34.71 ^e
Peonidina 3-cafeoil- <i>p</i> -hidroxibenzoil soforosido-5-glucósido	0.29±0.03 ^E	158.73±20.46 ^b

a Los datos se muestran como media ± DE (desviación estándar) n = 3

b Diferentes letras mayúsculas en superíndice indican una diferencia estadística significativa entre el compuesto con respecto al parámetro K_m

c Diferentes letras minúsculas en superíndice indican una diferencia estadística significativa entre el compuesto con respecto al parámetro V_{max}.

11.5.2.2 Efecto de la PFO sobre el perfil de los derivados-ACQ y antocianinas aciladas

De manera complementaria a la cinética enzimática, se determinó el perfil por HPLC de especificidad sobre los compuestos de la PFO. Para ello, se empleó una mezcla de derivados-ACQ en condiciones óptimas de reacción enzimática (pH 7 y 30 °C), los resultados se muestran en la Figura 43 A-B. También, se llevó a cabo un experimento separado para una mezcla de antocianinas (Figura 45 A-B).



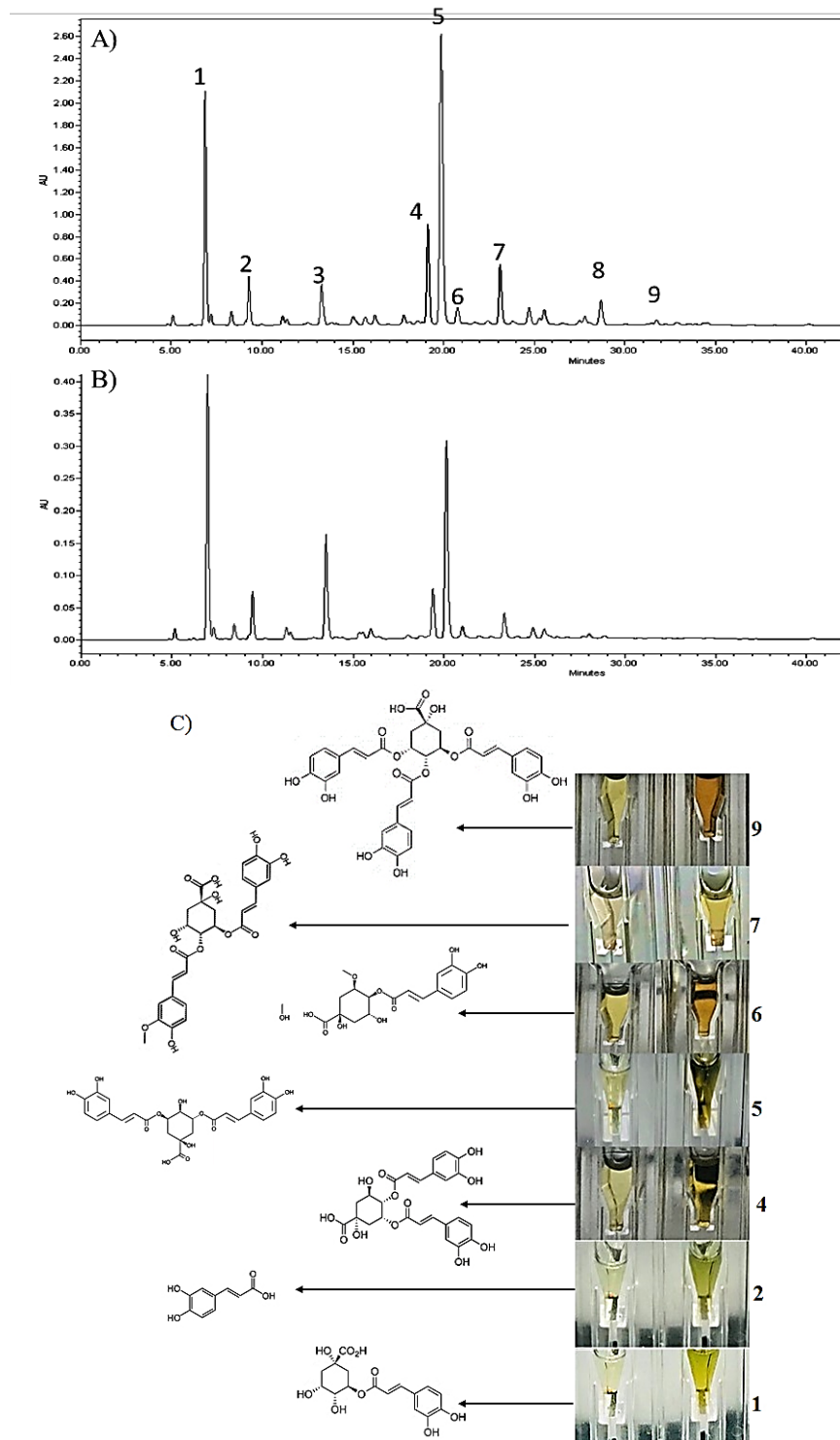


Figura 43 Cromatograma de oxidación enzimática de la mezcla de derivados-ACQ utilizando PFO de camote morado a pH 7, 30 °C y 320 nm. Pico 1: 5-ACQ, pico 2: AC, pico 3: AFQ, pico 4: 3,4-diCQ, pico 5: 3,5-diCQ, pico 6: 4,5-diCQ, pico 7: 3,5FCQ, pico 8: 4,5FCQ, pico 9: 3,4,5-triCQ. A) extracto de derivados-ACQ. B) Mezcla de derivados-ACQ en presencia de PFO. C) Imágenes del cambio de color de las reacciones de cada uno de los derivados-ACQ; izquierda sin PFO, derecha con PFO.



La PFO degrada rápidamente a todo los derivados-ACQ como lo confirman los altos valores de conversión/degradación obtenidos en un rango de 72.5–93.5% de cada uno de los compuestos fenólicos, como se resume en el Cuadro 9. Los fenoles que fueron mayormente degradados por la PFO fueron los ácidos 3,5-diCQ y 3,4,5-triCQ que se degradaron del 85 y 93.5%, respectivamente. Estos resultados confirmaron los experimentos previos de afinidad de sustrato.

La degradación de estos derivados de ácido cafeoilquínicos fueron causados por combinaciones de oxidación enzimática y reacciones acopladas de oxidación, como se muestra con el modelo propuesto por Vissers y colaboradores (Vissers et al., 2017) usando como sustrato derivados de ácido cafeoilquínicos (Figura 44, esquema modificado), en el esquema se muestra como el éster ácido se oxida enzimáticamente en una quinona; después de este paso. las *orto*-quinonas que son altamente reactivas pueden hacer reacciones enzimáticas y no enzimáticas con compuestos fenólicos y no fenólicos, provocando una alta polimerización y posteriormente la formación de melaninas (Mai, Mertens, & Glomb, 2019).

Cuadro 9 Porcentaje de degradación de derivados-ACQ y de antocianinas por la PFO a pH 7 y 30 °C analizados por HPLC.

t _R min	Compuesto	Degradación (%)*
7.5	Ácido 5-CQ	79.49
9.9	Ácido cafeico	72.57
18.5	Ácido 4,5-diCQ	82.26
19.6	Ácido 3,5-diCQ	85.40
22.3	Ácido 3,4-diCQ	80.25
28.6	Ácido 4,5-FCQ	83.76
32.9	Ácido 3,4,5-triCQ	93.50
20.7	Peonidina 3-cafeoil- <i>p</i> -hidroxibenzoil soforosido-5-glucósido	99.83

*Los valores de conversión se calcularon de acuerdo con el área del pico del cromatograma de HPLC en comparación con la muestra control (sin enzima) registrada a 320 y 510 nm para los derivados-ACQ y las antocianinas, respectivamente.



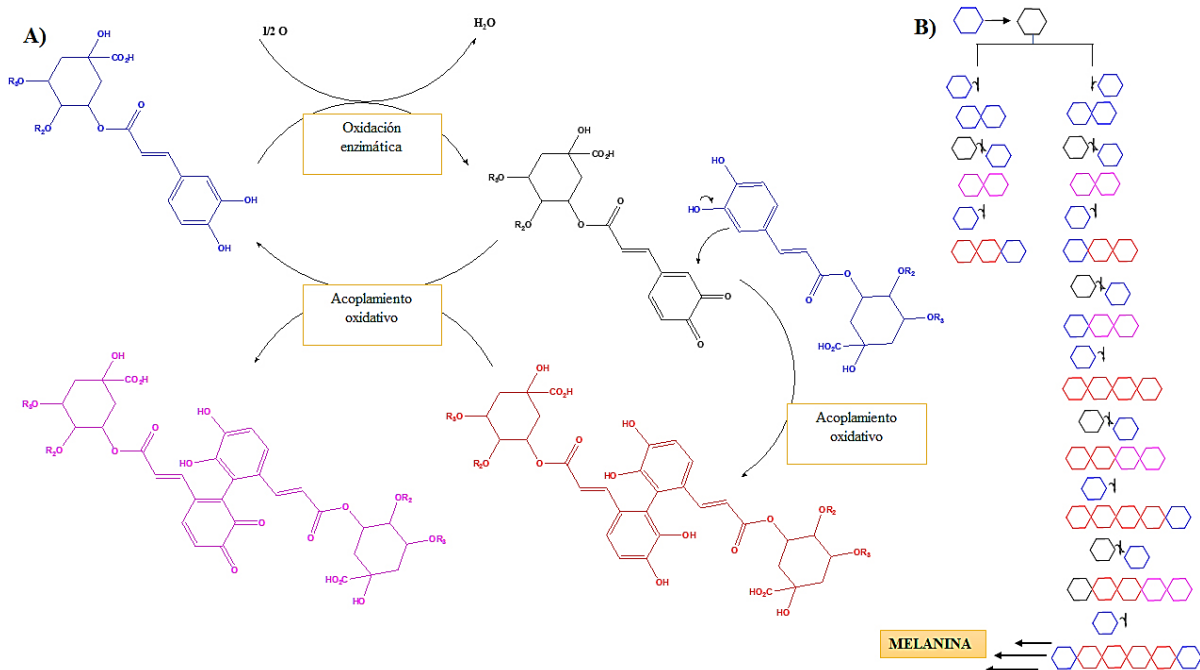


Figura 44 Mecanismo de oxidación de los derivados de ACQ A) Mecanismo propuesto por Vissers y colaboradores en el 2017 de oxidación enzimática de un éster de ácido cafeico, seguido de acoplamiento oxidativo al éster de ácido cafeico y posterior oxidación acoplada. (B) Representación esquemática de oxidación acoplada y reacciones de acoplamiento oxidativo en niveles altos y bajos de proporción de no-sustrato a sustrato y su posterior formación de melaninas.

De manera similar, el perfil de especificidad de PFO se realizó utilizando un extracto crudo de una mezcla de antocianinas aciladas. Los sustratos se consumieron tras la adición de PFO, se muestra en la Figura 45 B. Estos resultados difieren considerablemente de las observaciones descritas por Kader y colaboradores (Kader, Rovell, Girardin, & Metche, 1997) y por Aguiar Cipriano y colaboradores (de Aguiar Cipriano, Ekici, Barnes, Gomes, & Talcott, 2015), quienes afirmaron que la PFO no es capaz de reconocer a las antocianinas y la degradación observada fue resultado de la oxidación por otros compuestos fenólicos presentes en la matriz. Según el análisis de HPLC, se obtuvo una degradación (99.8%) de la antocianina di-acilada al agregar PFO.

Además, se llevó a cabo una exploración UV de la antocianina aislada en esta investigación; en donde se analizaron al mismo tiempo una reacción control (línea azul) y una reacción



enzimática con la antocianina (línea roja) (Figura 45 C), en donde se observó un efecto hiperocrómico del aglucona (peonidina) y de los ácidos cinámicos en la región de máxima absorción, lo que indica la posibilidad de que la PFO catalizara la oxidación de los grupos acilo en la antocianina acilada, es decir, el ácido cafeico y ácido *p*-hidroxibenzoico. Nuestra hipótesis puede estar respaldada por los cambios en los espectros UV observados para la reacción de acilación de las antocianinas. En el estudio realizado por Ahmadiani y colaboradores (Ahmadiani, Robbins, Collins, & Giusti, 2016) los efectos batocrómicos e hiperocrómicos se asociaron con la formación de enlaces acilo en la pelargonidina de forma que la absorbancia disminuye a 400-440 nm y aumenta a 310-325 (región de absorción máxima de ácidos cinámicos). En esta investigación, tras la adición de PFO a la antocianina acilada, se observó el efecto contrario: la absorbancia aumentó a 500-550 nm y disminuyó a 300-320. Con base en este razonamiento, postulamos que la actividad de PFO ha afecta a los grupos acilo de la antocianina.



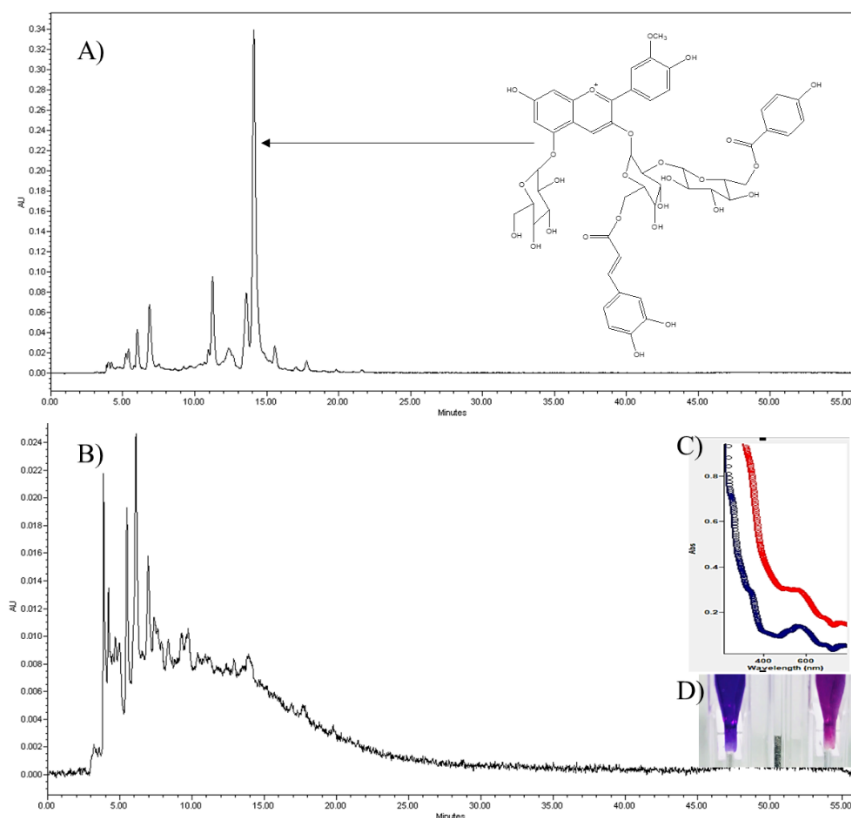


Figura 45 Cromatograma de la oxidación enzimática de la mezcla de antocianinas usando PFO de camote morado, pH 7, 30 °C, 510 nm. A) Extracto control sin PFO. B) Extracto de antocianinas en presencia de PFO. C) Espectro UV-vis de antocianina en presencia de PFO (línea roja) y muestra sin PFO (línea azul) a pH 7 y 30 °C. D) Imagen del cambio de color de las reacciones de la antocianina; izquierda sin PFO, derecha con PFO.

11.5.3 Extracción y caracterización de la POD

La extracción de la POD de la raíz de la planta de camote morado, al igual que la PFO se realizó con buffer de fosfato pH 7 y para evitar reacciones de oxidación no deseadas y la formación de melanoidinas debido a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de la POD de la raíz de camote, se aplicó un procedimiento de separación de dos pasos utilizando resinas: amberlita y carbón activado, para la eliminación de antocianinas y ácidos fenólicos, respectivamente, del extracto de POD. Posteriormente, se realizó una precipitación por punto isoelectrico a pH 3 con ácido clorhídrico y el extracto resultante fue el que se utilizó para la



caracterización parcial de la POD. Se midió la actividad de la enzima en cada etapa de prepurificación. Los resultados se muestran en el Cuadro A4, ANEXO 4.

- **Evaluación del pH y temperatura**

La caracterización por pH y temperatura de POD utilizando guayacol y H₂O₂ se hizo de manera separada, los datos de pH se muestran en la Figura 46, en donde podemos observar que el pH óptimo de reacción de la POD es de 4-6, pH inferior a 4 y superior a 6 comienza a presentar un decremento en la actividad. Sin embargo, a diferencia de la PFO, la POD, si muestra actividad hasta pH 8 y 9, por lo que se podría suponer que esta oxidasa es más resistente a los cambios de pH.

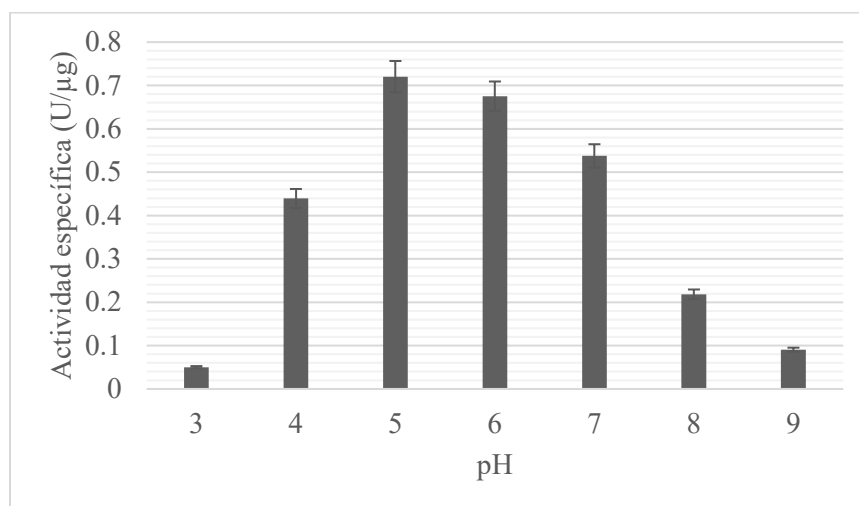


Figura 46 Actividad específica del POD de camote morado por efecto del pH, utilizando guayacol como sustrato a 30°C. n = 3.

Respecto a la temperatura, los datos obtenidos se muestran en la Figura 47, este parámetro se determinó utilizando el pH óptimo de los resultados anteriores; la temperatura óptima de la POD es similar al de la PFO, es decir, se encuentra en un rango de 20-30 °C, mostrando una drástica caída en la actividad a temperatura inferiores a 20 °C y mayores de 40 °C, mostrando una actividad prácticamente nula a 80 °C.



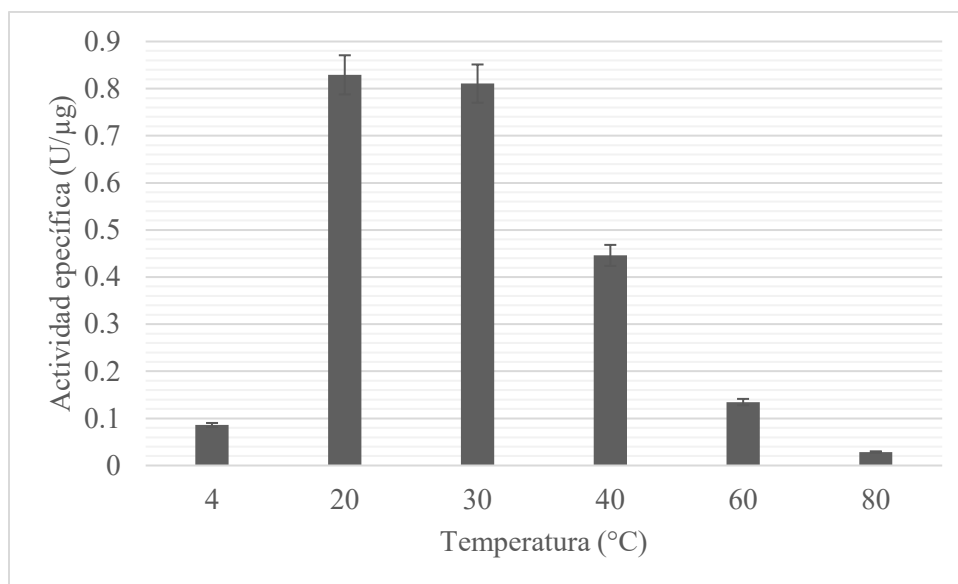


Figura 47 Actividad específica del POD de camote morado por efecto de la temperatura, utilizando guayaco como sustrato y pH 6. n = 3.

11.5.3.1 Evaluación del efecto del POD sobre los principales fenoles de camote morado

Una vez determinados los parámetros de pH y temperatura óptimos de reacción de la POD, se procedió a hacer una evaluación parcial del efecto de la POD sobre algunos fenoles del camote morado (0.31 mM) como fueron los ácidos: cafeico, 5-CQ y con sustituyentes *orto*-metoxi-fenol (ácido feruloil-quínico y el 4,5-FCQ), así como otros fenoles con unidades guayacilo comunes, involucrados en la lignificación (proceso biológico que cataliza la POD (Almagro et al., 2009)) como son el guayacol y el ácido ferúlico (Barros, Serk, Granlund, & Pesquet, 2015).

Los resultados se muestran en la Figura 48, en donde se observa, que la mayor actividad la presentan los ácidos cafeico y 5-CQ seguido por el guayacol y, por último, los derivados de ácido ferúlico; y la actividad específica fue de 71.6-81.6 % menor con respecto al ácido cafeico. Estos datos contradicen la hipótesis que infería que la POD de camote morado, como



otras POD de origen vegetal, mostraría mayor afinidad por los compuestos con sustituyentes *orto*-metoxi-fenol, que por los compuestos con sustituyentes *orto*-difenólicos (catecoles).

Esta suposición se hizo a partir de que una de las funciones principales de la POD en las plantas es la de lignificación y las ligninas de angiospermas son polímeros fenólicos complejos que consisten principalmente en guaiacilo y unidades de siringilo, junto con cantidades pequeñas o trazas de unidades *p*-hidroxifenilo (Firon et al., 2013), por lo que se esperaba que la POD de camote morado oxidara principalmente a los derivados de ácido ferúlico.

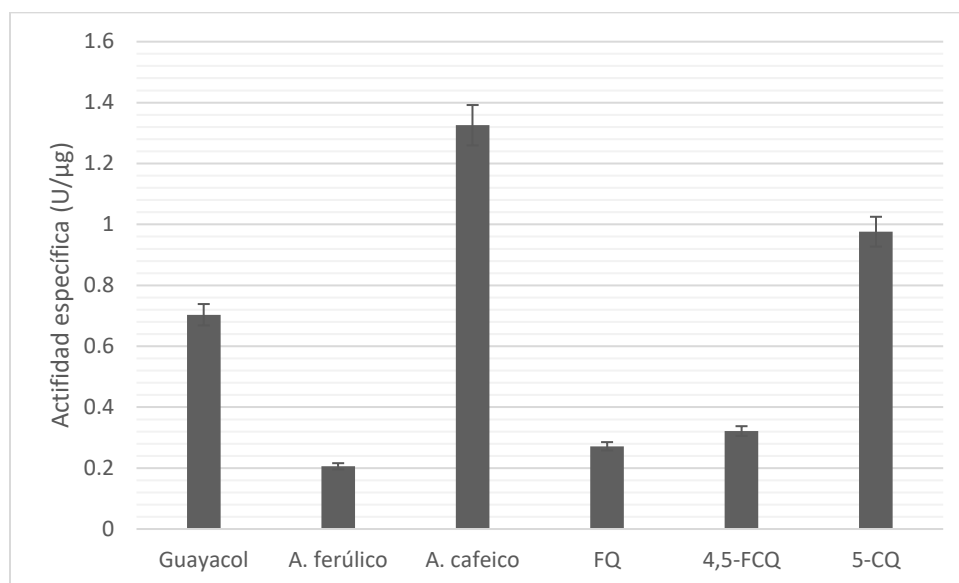


Figura 48 Actividad específica del POD utilizando diferentes sustratos (0.31 mM), pH6 y 20°C. n = 3.

11.5.3.2 Efecto de la POD sobre el perfil de los derivados-ACQ

Finalmente, se realizó un ensayo cualitativo del efecto de la POD sobre un extracto enriquecido de los derivados-ACQ y H₂O₂ por HPLC (Figura 49). Se observó que los compuestos fenólicos que sufren mayor degradación son el ácido cafeico, el 5-CQ, los 3 isómeros de di-CQ, en particular del 4,5-diCQ (compuesto 6), y aparentemente son menos



afectados los ácidos quínicos con sustituyentes con ácido ferúlico (compuesto 3,7 y 8). De esta manera que la POD del camote morado degrada mayoritariamente a los compuestos fenólicos con sustituyentes *orto*-difenoil que a los fenoles con sustituyentes de *orto*-metoxifenol.

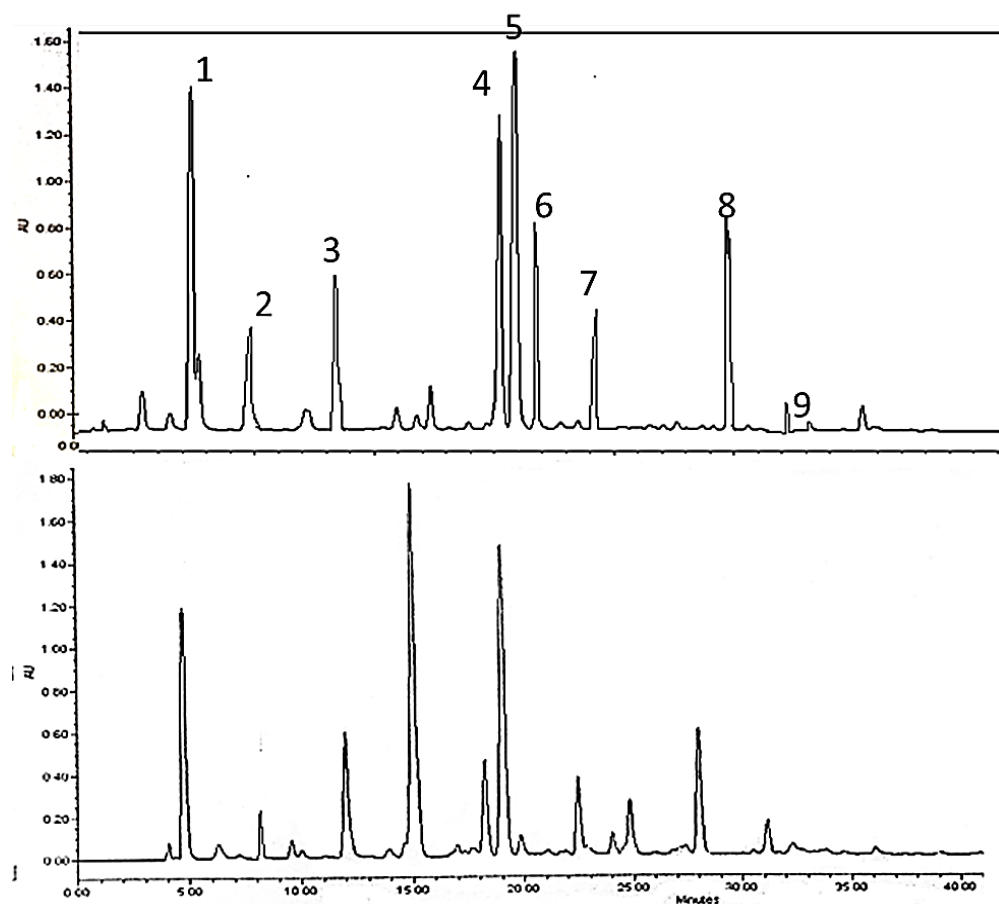


Figura 49 Cromatograma de la oxidación enzimática de la mezcla de derivados-ACQ utilizando POD de camote morado a pH 6, 20 °C y 320 nm. Pico 1: 5-ACQ, pico 2: AC, pico 3: AFQ, pico 4: 3,4-diCQ, pico 5: 3,5-diCQ, pico 6: 4,5-diCQ, pico 7: 3,5FCQ, pico 8: 4,5FCQ, pico 9: 3,4,5-triCQ. A) extracto de derivados-ACQ. B) Mezcla de derivados-ACQ en presencia de POD y H₂O₂.

De esta parte, se puede concluir que las dos oxidasas evaluadas en el presente trabajo degradan principalmente a los compuestos fenólicos con sustituyentes *orto*-difenoles (sustituyentes principales de los fenoles mayoritarios de la planta de camote morado); es



decir, las oxidasas de camote catalizan reacciones de oxidación de los principales metabolitos secundarios de la planta de camote morado degradándolos hasta un 99.8%.

Además, de acuerdo con los parámetros cinéticos evaluados, nos dan un primer acercamiento, respecto a la estereoselectividad que presenta la PFO de camote morado en su sitio activo, ya que, de los sustratos probados, algunos solo son isómeros (3 ácidos di-cafeoilquínico), y otros difieren de la cantidad de sustituyentes cafeoil unidos al ácido quínico, y aun así los valores de afinidad de sustrato fueron específicos.



12. CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró que las plantas de camote mexicanas son una rica fuente de fenoles, flavonoides y antocianinas totales, hacer una preselección de la planta de las principales regiones productoras permitió identificar una accesión de pulpa morada con una gran concentración de derivados-ACQ y de antocianinas altamente aciladas, con una diversidad estructural sobresaliente a otras variedades del mundo, destacando su alta concentración en compuestos que en la naturaleza se encuentran en concentraciones limitadas como son los ácidos 3,4,5-tricafeoilquinico y el 4,5-feruloilcafeoilquínico, así como la peonidina triglicosilada y diacilada con ácidos cafeico y *p*-hidroxibenzoico. Adicionalmente, los resultados de este trabajo indicaron que los ácidos 5-CQ, 3,4-diCQ y 4,5-diCQ tienen el potencial de mejorar la función mitocondrial deteriorada en los hepatocitos y de aumentar la oxidación de ácidos grasos; suponiendo que pueden evitar la esteatosis hepática durante la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico.

Sin embargo, se evidenció que la disponibilidad de estos compuestos se compromete con la presencia de las oxidasas (PFO y POD). Respectos a la PFO, se encontró que la mayor actividad fue a pH 7 y 30 °C, la adición de iones Cu^{2+} aumentó el rendimiento de la enzima 2 veces, mientras que la presencia de iones Zn^{2+} redujo la actividad catalítica en un 70%. Los experimentos cinéticos enzimáticos mostraron la mayor afinidad hacia los ácidos 3,4,5-triCQ y 3,5-diCQ, seguida de los ácidos 5-CQ y cafeico, 3,4-diCQ, antocianina diacilada y 4,5-diCQ. El valor de K_m más alto se determinó para el ácido 4,5-FCQ. Así mismo, la PFO catalizó la degradación oxidativa de compuestos fenólicos biológicamente importantes del 72.5-99.8%. Mientras que la POD presentó una mayor actividad a pH 6 y 20-30 °C, y degradó principalmente a los ácidos cafeico y 5-CQ.



En consecuencia, se expuso la degradación por oxidación enzimática (POD y PFO) de los principales metabolitos secundarios que tienen dentro de su estructura *orto*-difenoles (catecoles). Por lo que estos resultados permiten desarrollar metodologías de conservación de dichos metabolitos (colorantes y antioxidantes) para su aprovechamiento en las industrias alimenticia y farmacéutica.



REFERENCIAS

- Ahmadiani, N., Robbins, R. J., Collins, T. M., & Giusti, M. M. (2016). Molar absorptivity (ϵ) and spectral characteristics of cyanidin-based anthocyanins from red cabbage. *Food Chemistry*, *197*, 900–906. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.032>
- Akoetey, W., Britain, M. M., & Morawicki, R. O. (2017). Potential use of byproducts from cultivation and processing of sweet potatoes. *Ciência Rural*, *47*(5). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160610>
- Allen, J. C., Corbitt, A. D., Maloney, K. P., Butt, M. S., & Truong, V. (2012). Glycemic Index of Sweet Potato as Affected by Cooking Methods. *The Open Nutrition Journal*, *6*, 1–11.
- Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., & Pedreño, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, *60*(2), 377–390. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern277>
- Anjali Krishna, T. U., Pragalyaashree, M. M., & Balamurugan, P. (2018). Extraction and quantification of lutein from sweet potato leaves (*Ipomoea batatas*). *Drug Invention Today*, *10*(Special Issue 1), 2618–2621.
- Aydin, B., Gulcin, I., & Alwasel, S. H. (2015). Purification and characterization of polyphenol oxidase from hemşin apple (*Malus communis* L.). *International Journal of Food Properties*, *18*(12), 2735–2745. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1012725>
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., & Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of Botany*, *115*(7), 1053–1074. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv046>
- Basurto, F., Martínez, D., Rodríguez, T., Evangelista, V., Mendoza, M., Castro, D., ... Vaylón, V. (2015). Conocimiento actual del cultivo de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) en México. *Agroproductividad*, *8*, 30–34.
- Berry, M. N., & Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *Journal of Cell Biology*, *43*(3), 506–520. <https://doi.org/10.1083/jcb.43.3.506>
- Betteridge, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, *49*(2), 3–8. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(00)80077-3)
- Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1863*(5), 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.010>
- Bibhuti Bhusan Mishra, B. x. (2016). Polyphenol oxidases: biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control. *Enzyme Engineering*, *05*(01), 1–9. <https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000141>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, *1*(1–6), 41–55.



<https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cai, Z., Qu, Z., Lan, Y., Zhao, S., Ma, X., Wan, Q., ... Li, P. (2016). Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chemistry*, 197, 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.110>
- Camacho, M., & Guillermo, A. J. (2018). *Estudio de la producción de amilasas sobre sustratos complejos por Aspergillus Flavus*. UNAM.
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., ... Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Clark, C. A., Ferrin, D. M., Smith, T. P., & Holmes, G. J. (2013). *Compendium of Sweetpotato Diseases, Pest, and Disorders*. St. Paul, Minnesota 55121, U.S.A.: The American Phytopathological Society.
- Contreras-Toledo, A. R., Cortés-Cruz, M. A., Costich, D., de Lourdes Rico-Arce, M., Brehm, J. M., & Maxted, N. (2018). A Crop Wild Relative Inventory for Mexico. *Crop Science*, 58(3), 1292–1305. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.07.0452>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001. <https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Cuevas, E., Silke, M., & Peter, H. (2011). Anthocyanins in Purple Sweet Potato (Ipomoea batatas L.) Varieties. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5(2), 19–24.
- Daas Amiour, S., & Hambaba, L. (2016). Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.027>
- de Aguiar Cipriano, P., Ekici, L., Barnes, R. C., Gomes, C., & Talcott, S. T. (2015). Pre-heating and polyphenol oxidase inhibition impact on extraction of purple sweet potato anthocyanins. *Food Chemistry*, 180, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.020>
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289.



<https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

- Derardja, A. eddine, Pretzler, M., Kampatsikas, I., Barkat, M., & Rompel, A. (2017). Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase from Apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(37), 8203–8212. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03210>
- Díaz, D. M. (2009). Ipomoea : un género con tradición. *Contactos*, 73, 36–44.
- Ding, H., Gao, Y., Lei, H., Luo, L., Chao, H., & Ruan, R. (2010). In Vitro Antioxidant Effects of Flavonoids of Sweet Potato Vines. *International Journal of Food Properties*, 13(2), 360–368. <https://doi.org/10.1080/10942910802398537>
- dos Santos, A. M. P., Lima, J. S., dos Santos, I. F., Silva, E. F. R., de Santana, F. A., de Araujo, D. G. G. R., & dos Santos, L. O. (2019). Mineral and centesimal composition evaluation of conventional and organic cultivars sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) using chemometric tools. *Food Chemistry*, 273(August 2017), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.063>
- Dutta, S. (2015). Review Article Sweet potatoes for diabetes mellitus: a systematic review. *Pharmacophore*, 6(1), 60–72. Retrieved from <http://www.pharmacophorejournal.com/>
- Escalante-Sánchez, E., Rosas-Ramírez, D., Linares, E., Bye, R., & Pereda-Miranda, R. (2008). Batatinosides II–VI, Acylated Lipooligosaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9423–9428. <https://doi.org/10.1021/jf801973m>
- Firon, N., LaBonte, D., Villordon, A., Kfir, Y., Solis, J., Lapis, E., ... Nadir, L. (2013). Transcriptional profiling of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots indicates down-regulation of lignin biosynthesis and up-regulation of starch biosynthesis at an early stage of storage root formation. *BMC Genomics*, 14(1), 460. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-460>
- Frati, A., Antonini, E., & Ninfali, P. (2016). Industrial freezing, cooking, and storage differently affect antioxidant nutrients in vegetables. In *Fruits, Vegetables, and Herbs* (pp. 23–39). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802972-5.00002-0>
- Giner, J. (2019). Batatasenol, a Major Triterpenol from Sweet Potato Skins. *Chemistry & Biodiversity*, 16(3), e1800439. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800439>
- Giuliano, G. (2017). Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.02.001>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217–225. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)



- Harada, K., Kano, M., Takayanagi, T., Yamakawa, O., & Ishikawa, F. (2004). Absorption of Acylated Anthocyanins in Rats and Humans after Ingesting an Extract of Ipomoea batatas Purple Sweet Potato Tuber. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(7), 1500–1507. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1500>
- Herzig, S., & Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), 121–135. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.95>
- Hu, Y., Deng, L., Chen, J., Zhou, S., Liu, S., Fu, Y., ... Chen, M. (2016). An analytical pipeline to compare and characterise the anthocyanin antioxidant activities of purple sweet potato cultivars. *Food Chemistry*, 194, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.133>
- Huang, A. S., Tanudjaja, L., & Lum, D. (1999). Content of Alpha- , Beta-Carotene , and Dietary Fiber in 18 Sweetpotato Varieties Grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 147–151.
- Iese, V., Holland, E., Wairiu, M., Havea, R., Patolo, S., Nishi, M., ... Waqainabete, L. (2018). Facing food security risks: The rise and rise of the sweet potato in the Pacific Islands. *Global Food Security*, 18(12), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.07.004>
- Ishiguro, K. (2019). Sweet potato carotenoids. In *Sweet Potato* (pp. 223–241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813637-9.00008-9>
- Ishiguro, K., Yoshinaga, M., Kai, Y., Maoka, T., & Yoshimoto, M. (2010). Composition, content and antioxidative activity of the carotenoids in yellow-fleshed sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *Breeding Science*, 60(4), 324–329. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.60.324>
- Islam, S. (2014). *Nutritional and Medicinal Qualities of Sweetpotato Tops and Leaves*. Plant Science. Chicago, IL.
- Islam, S., Yoshimoto, M., Yahara, S., Okuno, S., Ishiguro, K., & Yamakawa, O. (2002). Identification and Characterization of Foliar Polyphenolic Composition in Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3718–3722. <https://doi.org/10.1021/jf0201201>
- Jackson, K. M. P., Rathinasabapathy, T., Esposito, D., & Komarnytsky, S. (2017). Structural constraints and importance of caffeic acid moiety for anti-hyperglycemic effects of caffeoylquinic acids from chicory. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(9), 1601118. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201601118>
- Jeng, T. L., Lai, C. C., Liao, T. C., Lin, S. Y., & Sung, J. M. (2015a). Effects of drying on caffeoylquinic acid derivative content and antioxidant capacity of sweet potato leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 701–708. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.07.002>
- Jeng, T. L., Lai, C. C., Liao, T. C., Lin, S. Y., & Sung, J. M. (2015b). Effects of drying on caffeoylquinic acid derivative content and antioxidant capacity of sweet potato leaves.



Journal of Food and Drug Analysis, 23(4), 701–708.
<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.07.002>

- Jiang, X.-W., Bai, J.-P., Zhang, Q., Hu, X.-L., Tian, X., Zhu, J., ... Zhao, Q.-C. (2017). Caffeoylquinic Acid Derivatives Protect SH-SY5Y Neuroblastoma Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Injury Through Modulating Oxidative Status. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(3), 499–509. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0387-7>
- Johnson, M., & Pace, R. D. (2010). Sweet potato leaves: properties and synergistic interactions that promote health and prevent disease. *Nutrition Reviews*, 68(10), 604–615. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00320.x>
- Jukanti, A. (2017a). Introduction. In *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants* (pp. 1–9). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5747-2_1
- Jukanti, A. (2017b). Physicochemical Properties of Polyphenol Oxidases. In *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants* (pp. 33–56). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5747-2_3
- Jung, J.-K., Lee, S.-U., Kozukue, N., Levin, C. E., & 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*, 24(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.025>
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., & Metche, M. (1997). Mechanism of Browning in Fresh Highbush Blueberry Fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Partial Purification and Characterisation of Blueberry Polyphenol Oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(4), 513–516. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199704\)73:4<513::AID-JSFA763>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199704)73:4<513::AID-JSFA763>3.0.CO;2-T)
- Kang, S. Y., Sung, S. H., Park, J. H., & Kim, Y. C. (1998). Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyratum*. *Archives of Pharmacal Research*, 21(6), 718–722. <https://doi.org/10.1007/BF02976764>
- Kim, H. W., Kim, J. B., Cho, S. M., Chung, M. N., Lee, Y. M., Chu, S. M., ... Lee, D. J. (2012a). Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. *Food Chemistry*, 130(4), 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.031>
- Kim, H. W., Kim, J. B., Cho, S. M., Chung, M. N., Lee, Y. M., Chu, S. M., ... Lee, D. J. (2012b). Anthocyanin changes in the Korean purple-fleshed sweet potato, Shinzami, as affected by steaming and baking. *Food Chemistry*, 130(4), 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.031>
- Kim, Y.-H., Park, S.-C., Ji, C. Y., Lee, J. J., Jeong, J. C., Lee, H.-S., & Kwak, S.-S. (2015). Diverse antioxidant enzyme levels in different sweetpotato root types during storage root formation. *Plant Growth Regulation*, 75(1), 155–164. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9940-x>
- Kita, A., Bąkowska-Barczak, A., Hamouz, K., Kułakowska, K., & Lisińska, G. (2013). The



- effect of frying on anthocyanin stability and antioxidant activity of crisps from red- and purple-fleshed potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.09.006>
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5(12), 1084–1090. <https://doi.org/10.1038/4193>
- Kumar, B. R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349–364. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.06.005>
- Kurata, R., Yahara, S., Yamakawa, O., & Yoshimoto, M. (2011). Simple High-yield Purification of 3,4,5-Tri-O-caffeoylquinic Acid from Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf and Its Inhibitory Effects on Aldose Reductase. *Food Science and Technology Research*, 17(2), 87–92. <https://doi.org/10.3136/fstr.17.87>
- Li, J., Li, X., Zhang, Y., Zheng, Z., Qu, Z., Liu, M., ... Qu, L. (2013). Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1429–1434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.054>
- Lim, T. K. (2016). *Ipomoea batatas*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (Vol. 10, pp. 92–171). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7276-1_5
- Liu, X. L., Zhang, L., Fu, X. L., Chen, K., & Qian, B. C. (2001). Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 22(10), 929–933. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749777>
- Loebenstein, G. (2009). Origin, Distribution and Economic Importance. In G. Loebenstein & G. Thottappilly (Eds.), *The Sweetpotato* (pp. 9–12). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9475-0_2
- Lourenco, E. J., Neves, V. A., & Da Silva, M. A. (1992). Polyphenol oxidase from sweet potato: purification and properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(12), 2369–2373. <https://doi.org/10.1021/jf00024a009>
- Mahmood, N., Moore, P. S., De Tommasi, N., De Simone, F., Colman, S., Hay, A. J., & Pizza, C. (1993). Inhibition of HIV Infection by Caffeoylquinic Acid Derivatives. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 4(4), 235–240. <https://doi.org/10.1177/095632029300400406>
- Mai, F., Mertens, N., & Glomb, M. A. (2019). Bräunungsmechanismen pflanzlicher Lebensmittel. *Chemie in Unserer Zeit*, 53(5), 330–341. <https://doi.org/10.1002/ciuz.201900831>
- Manohan, D., & Wai, W. C. (2012). Characterization of polyphenol oxidase in sweet potato (*Ipomoea Batatas* (L.)). *Journal for the Advancement of Science & Arts*, 3(1), 14–31. Retrieved from <http://www.ucsiuniversity.edu.my/cervie/pdf/ijasa/paperV3N1-2.pdf>
- McLarin, M.-A., & Leung, I. K. H. (2020). Substrate specificity of polyphenol oxidase.



Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 55(3), 274–308.
<https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1768209>

- Meira, M., Silva, E. P. da, David, J. M., & David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(3), 682–713. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000025>
- Meng, X., Tan, C., & Feng, Y. (2019). Solvent extraction and in vitro simulated gastrointestinal digestion of phenolic compounds from purple sweet potato. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(10), 2887–2896. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14153>
- Mirón-López, G., Herrera-Ruiz, M., Estrada-Soto, S., Aguirre-Crespo, F., Vázquez-Navarrete, L., & León-Rivera, I. (2007). Resin Glycosides from the Roots of *Ipomoea tyrianthina* and Their Biological Activity #. *Journal of Natural Products*, 70(4), 557–562. <https://doi.org/10.1021/np0604634>
- Mitra, S. (2012). Nutritional Status of Orange-Fleshed Sweet Potatoes in Alleviating Vitamin A Malnutrition through a Food-Based Approach. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 02(08), 1–3. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000160>
- Miyamae, Y., Kurisu, M., Han, J., Isoda, H., & Shigemori, H. (2011). Structure–Activity Relationship of Caffeoylquinic Acids on the Accelerating Activity on ATP Production. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 59(4), 502–507. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.502>
- Mohanraj, R., & Sivasankar, S. (2014). Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) - A Valuable Medicinal Food: A Review. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 733–741. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2818>
- Montilla, E. C., 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 of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 9899–9904. <https://doi.org/10.1021/jf101898j>
- Mu, T.-H., Zhang, M., Sun, H.-N., & Pérez, I. C. (2019). Sweet potato staple foods. In M. Tai-hua & J. Singh (Eds.), *Sweet Potato* (pp. 273–302). Chennia, India: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813637-9.00010-7>
- Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Cheng Wang. (2017). *Sweet Potato Processing Technology. Intraduction*. Chennia, India: Elsevier.
- Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Wang, C. (2017a). Chlorogenic Acids From Sweet Potato. In *Sweet Potato Processing Technology* (pp. 357–403). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812871-8.00007-6>
- Mu, T., Sun, H., Zhang, M., & Wang, C. (2017b). Sweet Potato Proteins. In *Sweet Potato Processing Technology* (pp. 49–119). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812871-8.00002-7>
- Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T., & Miyahara, K. (1992). Resin Glycosides. XV.



- Simonins I-V, Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapins) from the Roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 40(12), 3163–3168.
<https://doi.org/10.1248/cpb.40.3163>
- Nozue, M., Souri, M., Arakawa, D., & Kojima, M. (1998). Purification and characterization of two isoforms of chlorogenic acid oxidase from sweet potato cells in suspension culture. *Journal of Plant Physiology*, 153(5–6), 552–557.
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80203-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80203-4)
- Ojong, P. B., Njiti, V., Guo, Z., Gao, M., Besong, S., & Barnes, S. L. (2008). Variation of Flavonoid Content Among Sweetpotato Accessions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(6), 819–824.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.133.6.819>
- Padmaja, G. (2009). Uses and Nutritional Data of Sweetpotato. In *The Sweetpotato* (pp. 189–234). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9475-0_11
- Palacios-González, B., Zarain-Herzberg, A., Flores-Galicia, I., Noriega, L. G., Alemán-Escondrillas, G., Zariñan, T., ... Tovar, A. R. (2014). Genistein stimulates fatty acid oxidation in a leptin receptor-independent manner through the JAK2-mediated phosphorylation and activation of AMPK in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(1), 132–140.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.08.018>
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 06(01), 1–16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Pereda-Miranda, R., & Bah, M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(2), 111–131. <https://doi.org/10.2174/1568026033392534>
- Peterson, J. K., Harrison, H. F., Jackson, D. M., & Snook, M. E. (2003). Biological Activities and Contents of Scopolin and Scopoletin in Sweetpotato Clones. *HortScience*, 38(6), 1129–1133. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.6.1129>
- Pretzler, M., & Rompel, A. (2018). What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. *Inorganica Chimica Acta*, 481, 25–31.
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.04.041>
- Rector, R. S., Thyfault, J. P., Wei, Y., & Ibdah, J. A. (2008). Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World Journal of Gastroenterology*, 14(2), 185. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.185>
- Rescigno, A., Sollai, F., Rinaldi, A. C., Soddu, G., & Sanjust, E. (1997). Polyphenol oxidase activity staining in polyacrylamide electrophoresis gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 34(2), 155–159.
[https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(96\)01201-8](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(96)01201-8)



- Rosas-Ramírez, D., & Pereda-Miranda, R. (2015). Batatins VIII–XI, Glycolipid Ester-Type Dimers from *Ipomoea batatas*. *Journal of Natural Products*, 78(1), 26–33. <https://doi.org/10.1021/np500523w>
- Roullier, C., Kambouo, R., Paofa, J., McKey, D., & Lebot, V. (2013). On the origin of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) genetic diversity in New Guinea, a secondary centre of diversity. *Heredity*, 110(6), 594–604. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.14>
- Roullier, C., Rossel, G., Tay, D., McKey, D., & Lebot, V. (2011). Combining chloroplast and nuclear microsatellites to investigate origin and dispersal of New World sweet potato landraces. *Molecular Ecology*, 20(19), 3963–3977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05229.x>
- Salgado, P. R., Favarin, J. L., Leandro, R. A., & Lima Filho, O. F. de. (2008). Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Scientia Agricola*, 65(4), 354–359. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400005>
- Sikora, M., Świeca, M., Franczyk, M., Jakubczyk, A., Bochnak, J., & Złotek, U. (2019). Biochemical Properties of Polyphenol Oxidases from Ready-to-Eat Lentil (*Lens culinaris Medik.*) Sprouts and Factors Affecting Their Activities: A Search for Potent Tools Limiting Enzymatic Browning. *Foods*, 8(5), 154. <https://doi.org/10.3390/foods8050154>
- Son, K. C., Severson, R. F., Arrendale, R. F., & Kays, S. J. (1990). Isolation and characterization of pentacyclic triterpene ovipositional stimulant for the sweet potato weevil from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(1), 134–137. <https://doi.org/10.1021/jf00091a028>
- 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 & Emerging Technologies*, 12(3), 282–287. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.03.001>
- Srisuwan, S., Sihachakr, D., & Siljak-Yakovlev, S. (2006). The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science*, 171(3), 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.05.007>
- Su, X., Griffin, J., Xu, J., Ouyang, P., Zhao, Z., & Wang, W. (2019). Identification and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato leaves. *Heliyon*, 5(6), e01964. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01964>
- Suda, I., Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., & Furuta, S. (2003). Physiological Functionality of Purple-Fleshed Sweet Potatoes Containing Anthocyanins and Their Utilization in Foods. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 37(3), 167–173. <https://doi.org/10.6090/jarq.37.167>
- Sudhakar, K., Mishra, V., Hemani, V., Verma, A., Jain, A., Jain, S., & Charyulu, R. N. (2021). Reverse pharmacology of phytoconstituents of food and plant in the management of diabetes: Current status and perspectives. *Trends in Food Science &*



Technology, 110, 594–610. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.024>

- Sui, X., Zhang, Y., Jiang, L., & Zhou, W. (2018). Anthocyanins in Food. In *Encyclopedia of Food Chemistry. Volume 2* (pp. 1–8). Amsterdam, Netherlands: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21669-7>
- Sun, H., Mu, T., Xi, L., Zhang, M., & Chen, J. (2014). Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves as nutritional and functional foods. *Food Chemistry*, 156, 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.079>
- Taga, M. S., Miller, E. E., & Pratt, D. E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928–931. <https://doi.org/10.1007/BF02542169>
- Taira, J., Taira, K., Ohmine, W., & Nagata, J. (2013). Mineral determination and anti-LDL oxidation activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(2), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.10.007>
- Tang, C., Ameen, A., Fang, B., Liao, M., Chen, J.-Y., Huang, L.-F., ... Wang, Z.-Y. (2021). Nutritional composition and health benefits of leaf-vegetable sweet potato in South China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103714. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103714>
- Terahara, N. (2015). Flavonoids in Foods: A Review. *Natural Product Communications*, 10(3), 1934578X1501000. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000334>
- Thakur, N., Raigond, P., Singh, Y., Mishra, T., Singh, B., Lal, M. K., & Dutt, S. (2020). Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. *Trends in Food Science & Technology*, 97(August 2019), 366–380. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.019>
- Tominaga, K., Fujimoto, E., Suzuki, K., Hayashi, M., Ichikawa, M., & Inaba, Y. (2009). Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in children and relationship to metabolic syndrome, insulin resistance, and waist circumference. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 14(2), 142–149. <https://doi.org/10.1007/s12199-008-0074-5>
- Torres, A., & Navarro, A. (2013). *Extracción de antocianinas termoestables del camote morado (Ipomoea batatas (L.) Lam) y su aplicación como biocolorante en alimentos*. UNAM.
- Torres Alcalá, A., & Navarro Ocaña, A. (2016). *Caracterización y cuantificación de compuestos bioactivos en Ipomoea batatas (L.) Lam variedad morada y en un snack de camote*. UNAM.
- Toyama, E. Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T. L., Loson, O. C., Hellberg, K., ... Shaw, R. J. (2016). AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*, 351(6270), 275–281. <https://doi.org/10.1126/science.aab4138>
- Tribst, A. A. L., Leite Júnior, B. R. de C., de Oliveira, M. M., & Cristianini, M. (2016). High pressure processing of cocoyam, Peruvian carrot and sweet potato: Effect on oxidative enzymes and impact in the tuber color. *Innovative Food Science &*



Emerging Technologies, 34, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.02.010>

- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507>
- Truong, V. D., Avula, R. Y., Pecota, K. V., & Yencho, G. C. (2018). Sweetpotato production, processing and nutritional quality. In *Vegetables and Vegetable Processing* (pp. 811–838).
- Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2007). Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(3), 271–293. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6362-1>
- Van den Bossche, J., Baardman, J., & de Winther, M. P. J. (2015). Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(105), 1–7. <https://doi.org/10.3791/53424>
- Vishnu, V. R., Renjith, R. S., Mukherjee, A., Anil, S. R., Sreekumar, J., & Jyothi, A. N. (2019a). Comparative Study on the Chemical Structure and In Vitro Antiproliferative Activity of Anthocyanins in Purple Root Tubers and Leaves of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(9), 2467–2475. research-article. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05473>
- Vishnu, V. R., Renjith, R. S., Mukherjee, A., Anil, S. R., Sreekumar, J., & Jyothi, A. N. (2019b). Comparative Study on the Chemical Structure and In Vitro Antiproliferative Activity of Anthocyanins in Purple Root Tubers and Leaves of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(9), 2467–2475. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05473>
- Vissers, A., Kiskini, A., Hilgers, R., Marinea, M., Wierenga, P. A., Gruppen, H., & Vincken, J.-P. (2017). Enzymatic Browning in Sugar Beet Leaves (*Beta vulgaris* L.): Influence of Caffeic Acid Derivatives, Oxidative Coupling, and Coupled Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(24), 4911–4920. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01897>
- Wang, A., Li, R., Ren, L., Gao, X., Zhang, Y., Ma, Z., ... Luo, Y. (2018). A comparative metabolomics study of flavonoids in sweet potato with different flesh colors (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Food Chemistry*, 260, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.125>
- Wang, H., Yang, Q., Gao, L., Gong, X., Qu, Y., & Feng, B. (2020). Functional and physicochemical properties of flours and starches from different tuber crops. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.146>
- Wang, L., Zhao, Y., Zhou, Q., Luo, C.-L., Deng, A.-P., Zhang, Z.-C., & Zhang, J.-L. (2017). Characterization and hepatoprotective activity of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu No. 8). *Journal of Food and Drug*



Analysis, 25(3), 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.009>

- Wang, S., Pan, D., Lv, X., Song, X., Qiu, Z., Huang, C., ... Chen, W. (2016). Proteomic approach reveals that starch degradation contributes to anthocyanin accumulation in tuberous root of purple sweet potato. *Journal of Proteomics*, 143, 298–305. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.010>
- Wianowska, D., & Gil, M. (2019). Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochemistry Reviews*, 18(1), 273–302. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9592-y>
- Xi, L., Mu, T., & Sun, H. (2015). Preparative purification of polyphenols from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves by AB-8 macroporous resins. *Food Chemistry*, 172, 166–174. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.039>
- Xu, W., Liu, L., Hu, B., Sun, Y., Ye, H., Ma, D., & Zeng, X. (2010). TPC in the leaves of 116 sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties and Pushu 53 leaf extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 599–604. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.12.008>
- Yoshikawa, K., Yagi, C., Hama, H., Tanaka, M., Arihara, S., & Hashimoto, T. (2010). Ipomotaosides A–D, Resin Glycosides from the Aerial Parts of *Ipomoea batatas* and Their Inhibitory Activity against COX-1 and COX-2. *Journal of Natural Products*, 73(11), 1763–1766. <https://doi.org/10.1021/np100283t>
- Yoshimoto, M., Yahara, S., Okuno, S., Islam, M. S., Ishiguro, K., & Yamakawa, O. (2002). Antimutagenicity of Mono-, Di-, and Tricaffeoylquinic Acid Derivatives Isolated from Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(11), 2336–2341. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2336>
- Yuzhi Jiao. (2012). Studies on antioxidant capacity of anthocyanin extract from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *African Journal of Biotechnology*, 11(27), 7046–7054. <https://doi.org/10.5897/AJB11.3859>
- Zamora-López, K., Noriega, L. G., Estanes-Hernández, A., Escalona-Nández, I., Tobón-Cornejo, S., Tovar, A. R., ... Pérez-Monter, C. (2020). Punica granatum L.-derived omega-5 nanoemulsion improves hepatic steatosis in mice fed a high fat diet by increasing fatty acid utilization in hepatocytes. *Scientific Reports*, 10(1), 15229. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71878-y>
- Zamora-Ros, R., Knaze, V., Rothwell, J. A., Hémon, B., Moskal, A., Overvad, K., ... Scalbert, A. (2016). Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Nutrition*, 55(4), 1359–1375. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0950-x>
- Zhang, D., Cervantes, J., Huaman, Z., Carey, E., & Ghislain, M. (2000). Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 659–665. <https://doi.org/10.26520507223>
- Zhang, L., Tu, Z., Wang, H., Fu, Z., Wen, Q., Chang, H., & Huang, X. (2015). Comparison



of different methods for extracting polyphenols from *Ipomoea batatas* leaves, and identification of antioxidant constituents by HPLC-QTOF-MS2. *Food Research International*, 70, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.012>

Zhang, X., Wu, C., Wu, H., Sheng, L., Su, Y., Zhang, X., ... Xu, X. (2013). Anti-hyperlipidemic effects and potential mechanisms of action of the caffeoylquinic acid-rich *pandanus tectorius* fruit extract in hamsters fed a high fat-diet. *PLoS ONE*, 8(4), e61922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061922>

Zheng, W., & Clifford, M. N. (2008a). Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chemistry*, 106(1), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.053>

Zheng, W., & Clifford, M. N. (2008b). Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chemistry*, 106(1), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.053>



ANEXOS

ANEXO 1

DESPLAZAMIENTOS Y ESPECTROS DE RMN Y HPLC-EM DE LOS COMOPUESTOS AISLADOS

- DESPLAZAMIENTOS

- **3,4-diCQ (m/z 515 [M-H]). (400 MHz, CD₃OD).**

¹H-RMN: δ 2.13-2.27 (C2-C6 m); 4.35 (C4 dd, J=3.3, 7.2 Hz); 5.05 (C3 dd, J= 3.0, 9.0), 5.48 (C5, m); 2 ácidos cafeícos:6.18, 6.25 (C8, d J=15.9 Hz); 6.71,6.72 (C5, d J= 8.5 Hz), 6.9, 7.09 (C6, d J= 8.9 Hz), 7.48, 7.59(C7, d J=15.8 Hz).

- **3,5-diCQ (m/z 515 [M-H]). (600 MHz, CD₃OD).**

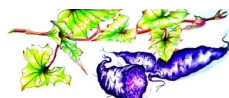
¹H-RMN: δ 2.28-2.36 (C2-C6 m); 4.03 (C4 dd, J=3.3, 7.3 Hz); 5.40 (C3, C5); 2 ácidos cafeícos: 6.30, 6.31 (C8, d J=14.4 Hz); 6.87, 6.88 (C5, d J= 8.1 Hz), 7.11, 7.12 (C6, d J= 5.0 Hz), 7.57, 7.59 (C7, d J=15.9 Hz).

¹³C-RMN: δ 34 (C1), 36 (C6), 37 (C2), 69 (C4), 75 (C3, C5); 2 ácidos cafeíco: 113-115 (C2), 117-118 (C1), 121(C6), 124 (C3), 126-127 (C7), 144 (C8), 145-146 (C5), 147-148 (C4), 166- 167 (C9), 177 (COO⁻).

- **4,5-diCQ (m/z 515 [M-H]). (600 MHz, CD₃OD).**

¹H-RMN: δ 2.13-2.25 (C2-C6 m); 4.42 (C4 dd, J=3.1, 7.1 Hz); 5.10 (C5 dd, J= 3.0, 9.7), 5.72 (C3, m); 2 ácidos cafeícos:6.24, 6.23 (C8, d J=15.9 Hz); 6.99,7.01 (C5, d J= 8.5 Hz), 7.16, 7.17 (C6, d J= 8.5 Hz), 7.51, 7.55 (C7, d J=15.8 Hz).

¹³C-RMN: δ 37 (C1, C6), 39 (C2), 70 (C3), 71 (C5), 78 (C4); 2 ácidos cafeíco: 113 (C2), 117 (C6, C8), 124 (C5), 129 (C1), 147 (C7), 148 (C3), 150 (C4), 168 (C9); 178 (COO⁻).



- **3,4,5-triCQ (m/z 677 [M-H]). (400 MHz, CD₃OD).**

¹H-RMN: δ 2.20-2.44 (C2-C6, m); 5.34 (C4, m), 5.67 (C3-C5, 2H, m); 3 ácidos cafeico: 6.21, 6.23, 6.30 (C8 HX3, d, J=15.9 Hz); 6.78-6.89 (C5, C6, m); 6.94 (C6, m); 6.99, 7.03, 7.05 (C2X3 H, s); 7.52, 7.54, 7.60 (C7 HX3, d, J=15.9 Hz).

- **4,5-FCQA (m/z 529 [M-H]). (400 MHz, CD₃OD):**

¹H-RMN: δ 5.30 (C3, m), 5.39 (C4, m), 5.40 (C5, m); ácido ferúlico: 3.72 (OCH₃, s), 6.22 (C8 d, J=15.9 Hz), 6.72 (C6, m); 6.95 (C5, m), 6.98 (C2, m), 7.55 (C7, d, J=15.9 Hz); ácido cafeico: 6.34 (C8 d, J=15.9 Hz), 6.75 (C6, m); 7.06 (C5, m), 7.08 (C2, m), 7.62 (C7, d, J=15.9 Hz).

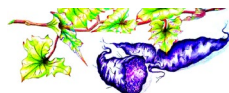
- **Peonidina 3-(cafeoil-*p*-hidroxibenzoil-soforósido)-5-glucósido (m/z 1069 [M+H]). (600 MHz, CD₃OD).**

¹H-RMN: δ aglucón (peonidina): 3.99 (-OCH₃, s), 6.95 (C6, d J=1.6 Hz), 6.97 (C8, d J=2.0 Hz), 7.01 (C5', d J= 8.7 Hz), 7.95 (C3', d J= 8.7 Hz), 8.26 (C6', dd J=2.10, 8.26 Hz), 8.87 (C4, s); Glucosa-a: 3.44-3.5 (C6 α/β, m), 3.60-3.92 (C2-C3-C4-C5, m), 5.25 (C1, d J=7.0 Hz); Glucosa-b: 3.41-3.4 (C6 α/β, m), 3.23-3.47 (C2-C3-C4-C5, m), 4.78 (C1, d J=7.1 Hz); Glucosa-c: 3.51-3.55 (C6 α/β, m), 3.27-3.88 (C2-C3-C4-C5, m), 5.25 (C1, d J=7.0 Hz); ácido cafeico: 6.72 (C5, d J=8.3 Hz), 6.77 (C6, d J= 4.4 Hz), 6.97 (C7, d J= 17.4 Hz), 7.21 (C8, d J= 15.8 Hz); ácido *p*-hidroxibenzoico: 7.36 (C2-C6, d J=8.6 Hz), 6.40 (C3-C5, d J=8.6 Hz).

¹³C-RMN: δ aglucón (peonidina): 55 (-OCH₃), 95 (C8), 104 (C6), 114 (C5'), 117 (C10-C2'), 121 (C1'), 129 (C6'), 139 (C4), 146 (C3), 147 (C3'), 148 (C4'), 158 (C9), 159 (C5), 167 (C2), 169 (C7); Glucosa-a: 66 (C6 α/β), 71-76 (C2-C3-C4-C5), 101 (C1); Glucosa-b: 83

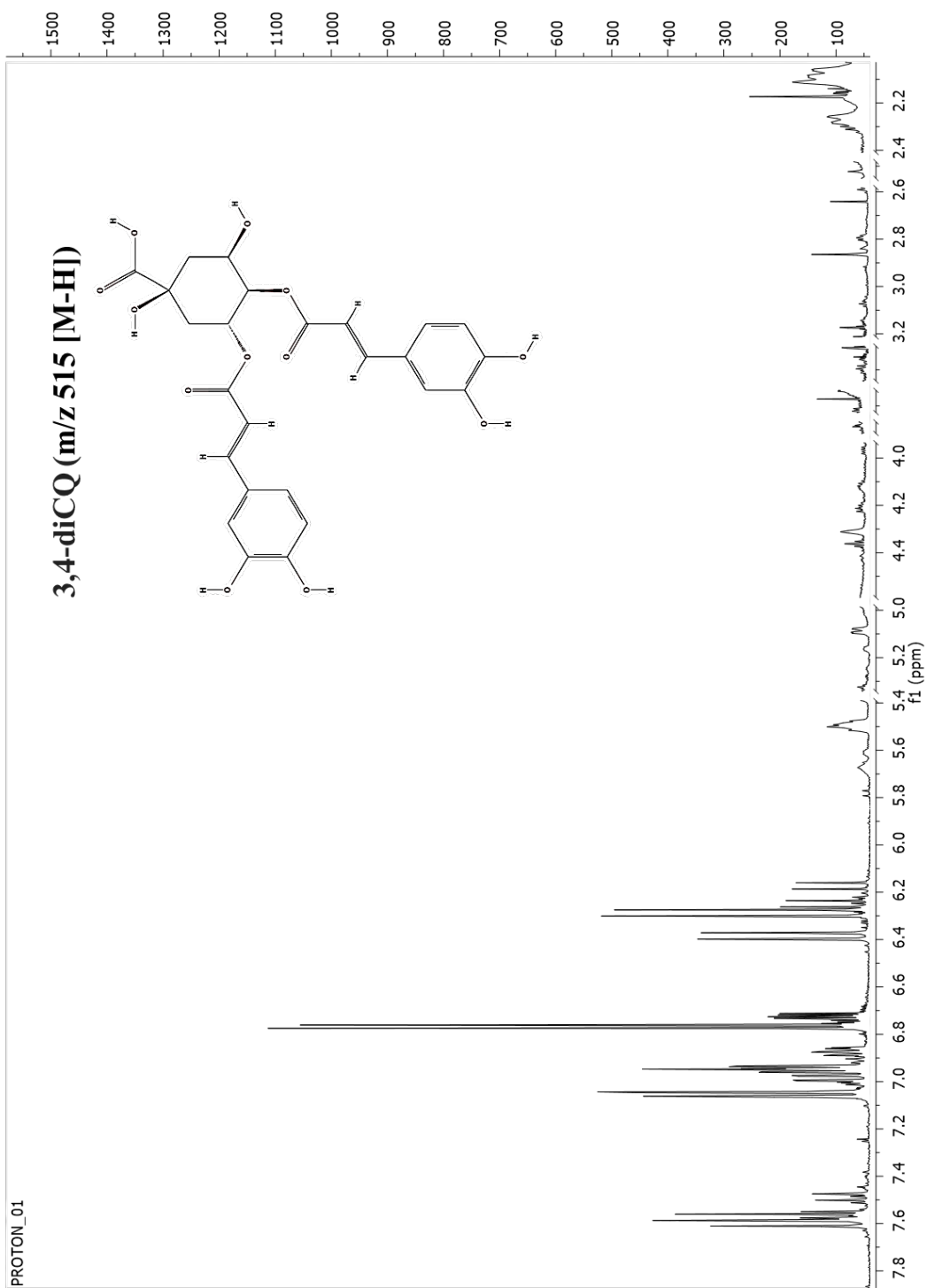


(C6 α/β), 72-79 (C2-C3-C4-C5), 104 (C1); Glucosa-c: 63 (C6 α/β), 74-78 (C2-C3-C4-C5), 104 (C1); ácido cafeico: 113 (C7), 114 (C2), 115 (C5), 122 (C6), 131 (C1), 146 (C8), 147 (C4), 173 (carboxil); ácido *p*-hidroxibenzoico: 115 (C3), 116 (C5), 126 (C1), 131 (C2-C6), 162 (C4), 169 (carboxil).

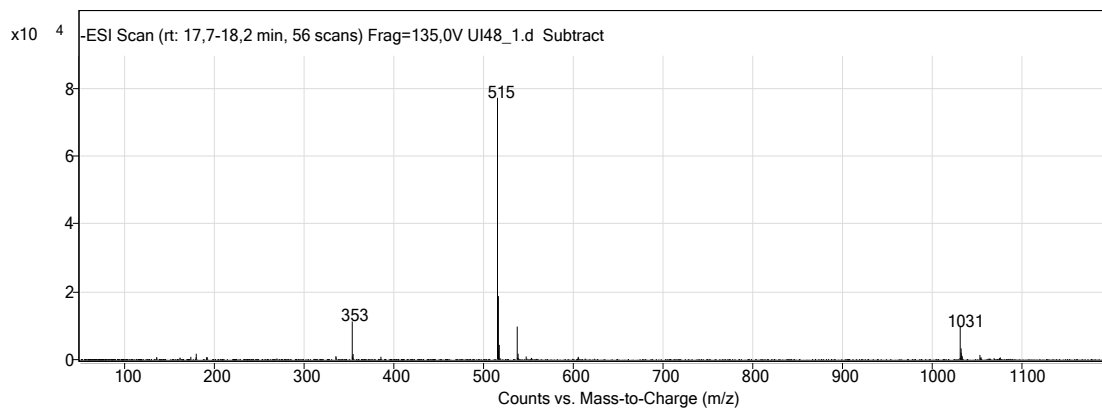


- Espectros de Resonancia y HPLC-EM de los compuestos aislados

• ^1H -RMN: Ácido 3,4-diCQ (m/z 515 [M-H])



- HPLC-EC (m/z 515 [M-H])

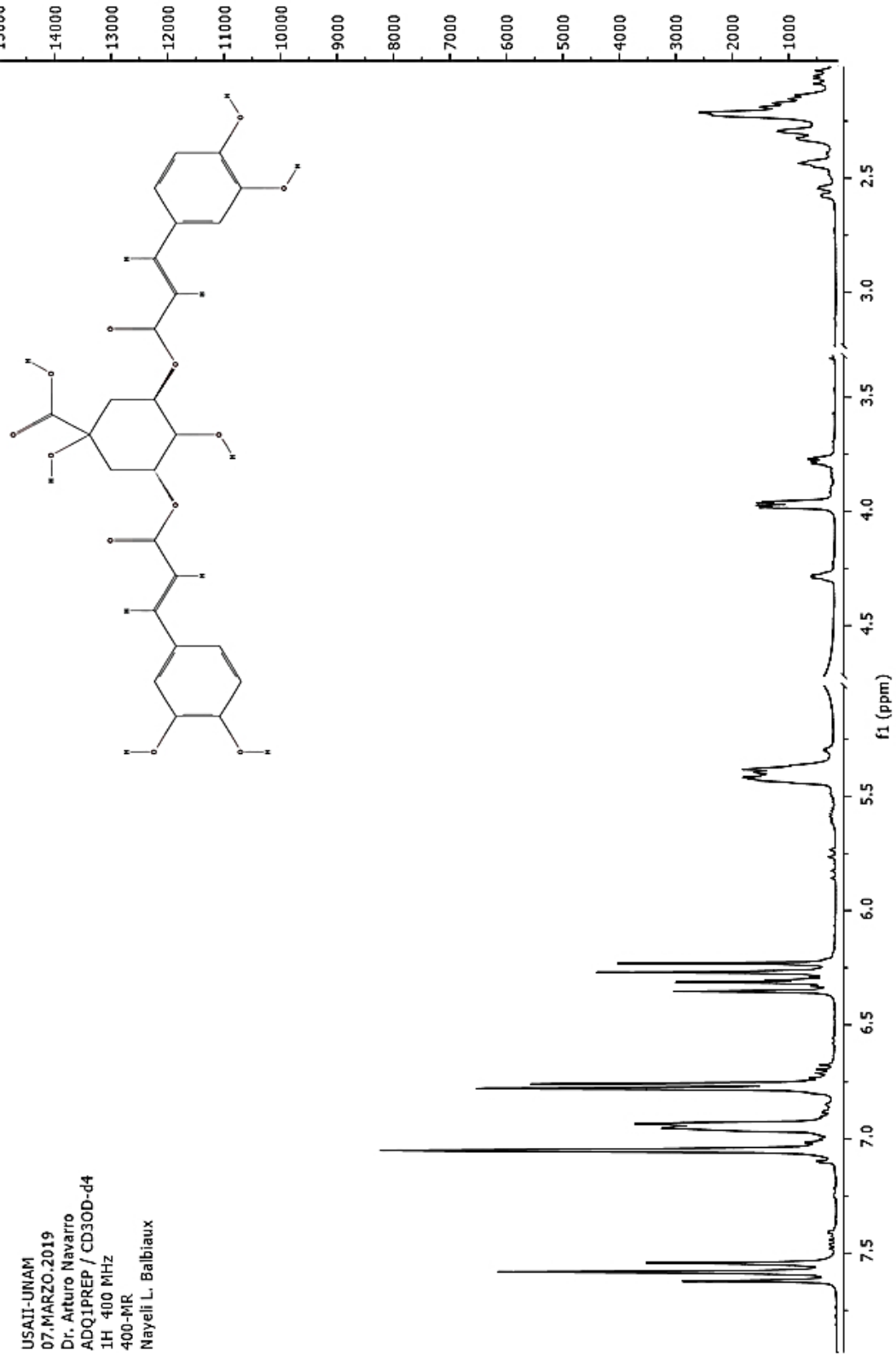


- ¹H-RMN: Ácido 3,5-diCQ (m/z 515 [M-H])

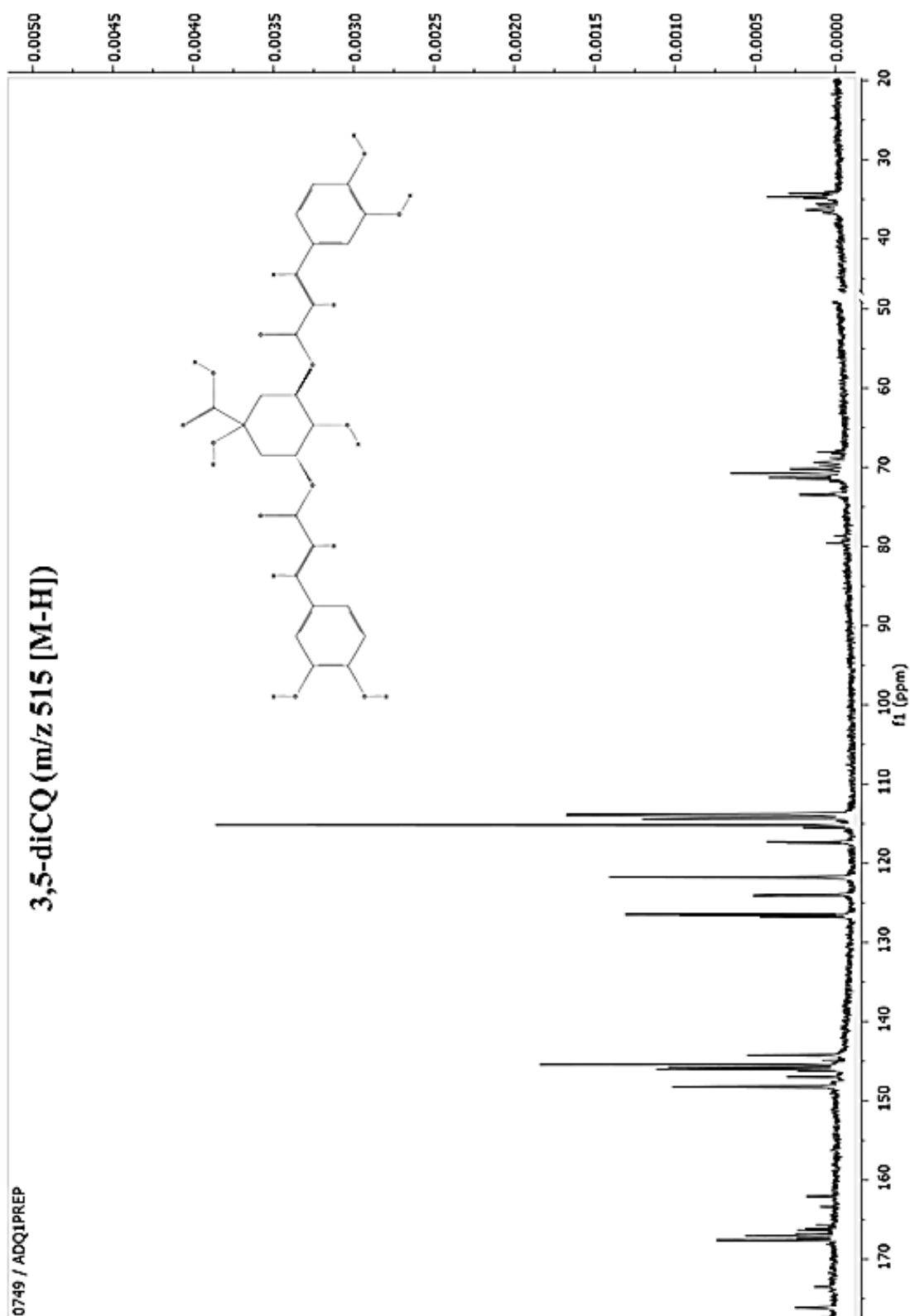
3,5-diCQ (m/z 515 [M-H])

0749-1H_ADQ1PREP
0749

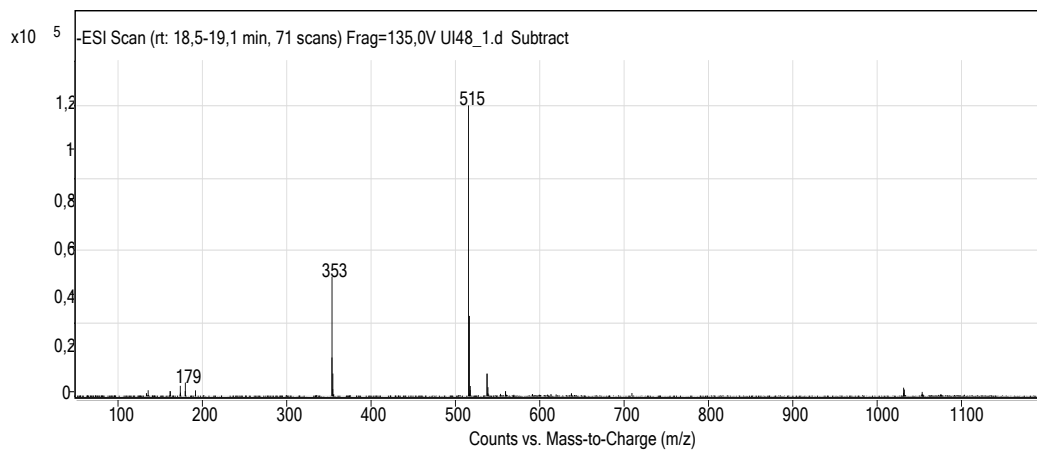
USAI-UNAM
07.MARZO.2019
Dr. Arturo Navarro
ADQ1PREP / CD30D-d4
1H 400 MHz
400-MR
Nayeli L. Balbiaux



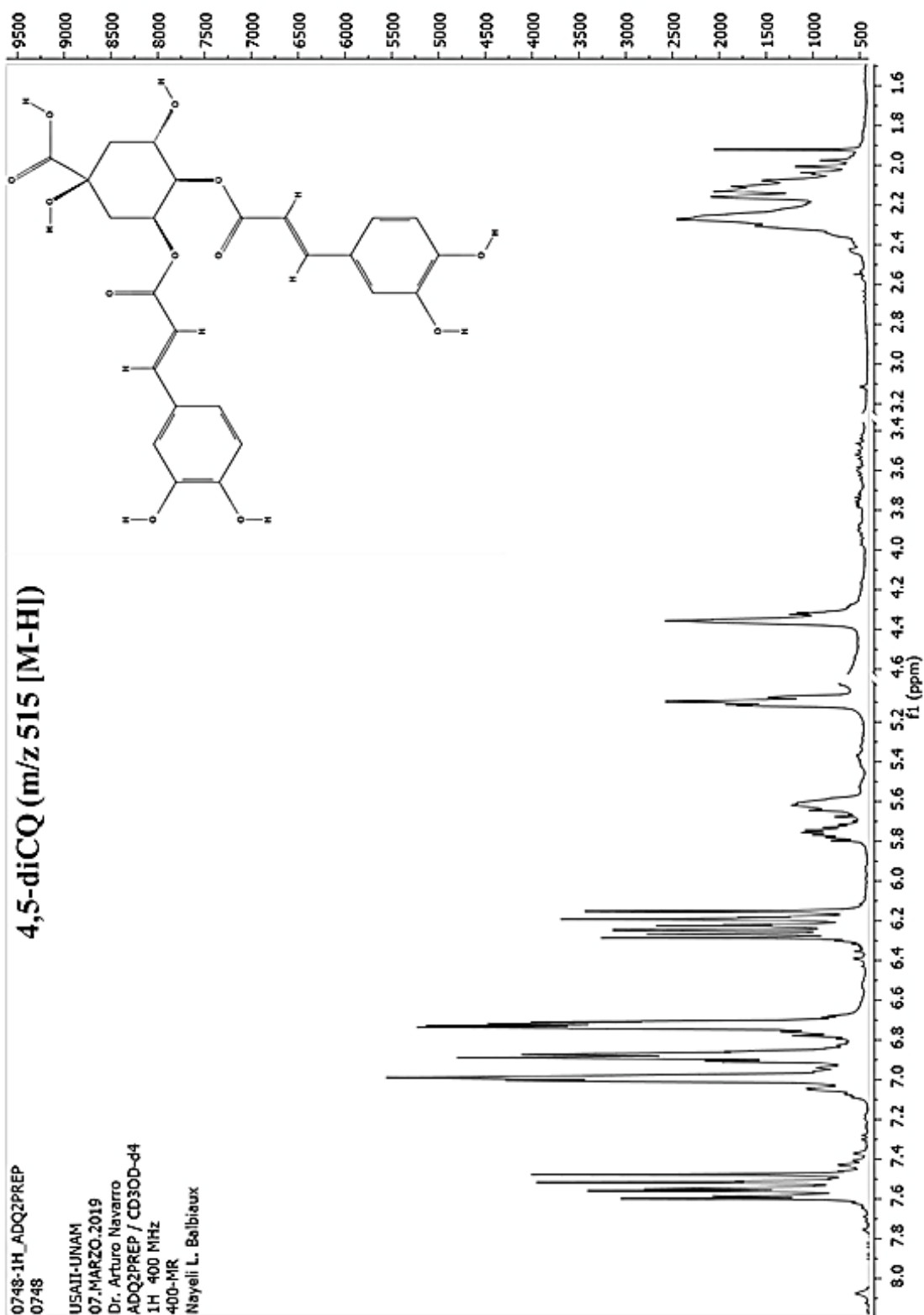
- ¹³C-RMN: Ácido 3,5-diCQ (m/z 515 [M-H])



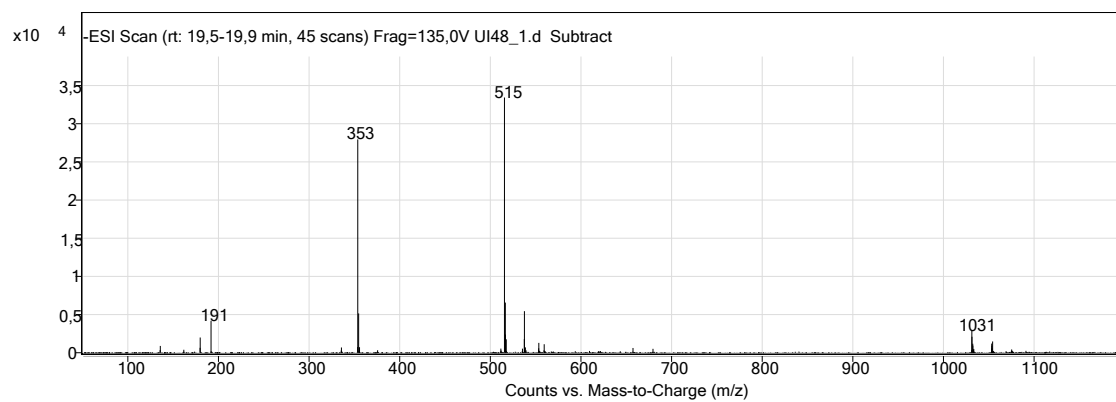
- HPLC-EC (m/z 515 [M-H])



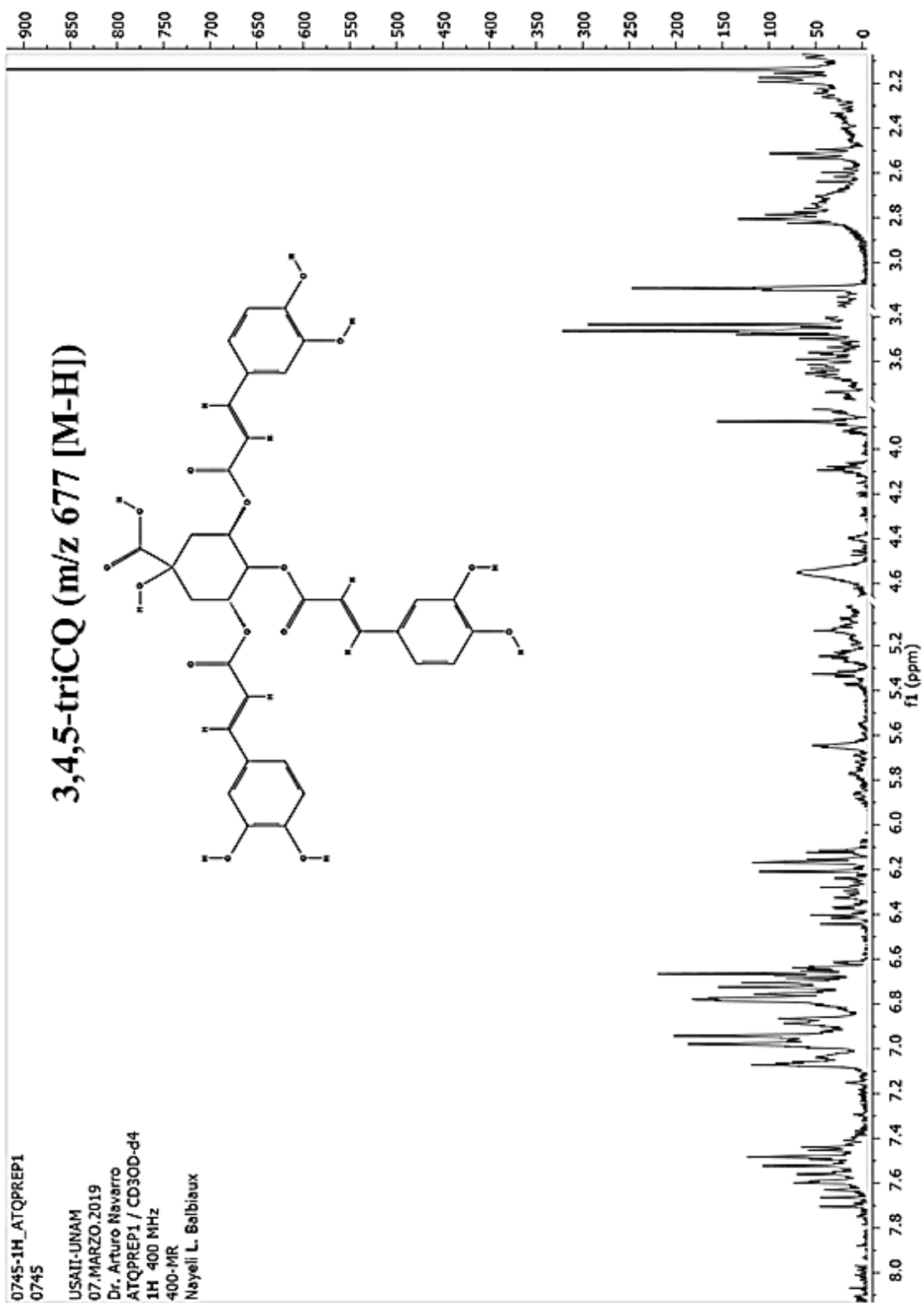
- $^1\text{H-RMN}$: Ácido 4,5-diCQ (m/z 515 [M-H])



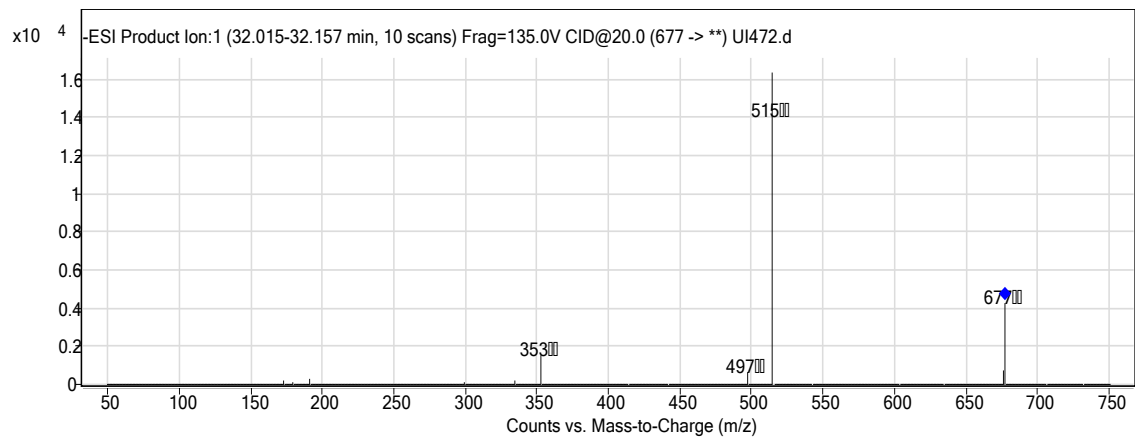
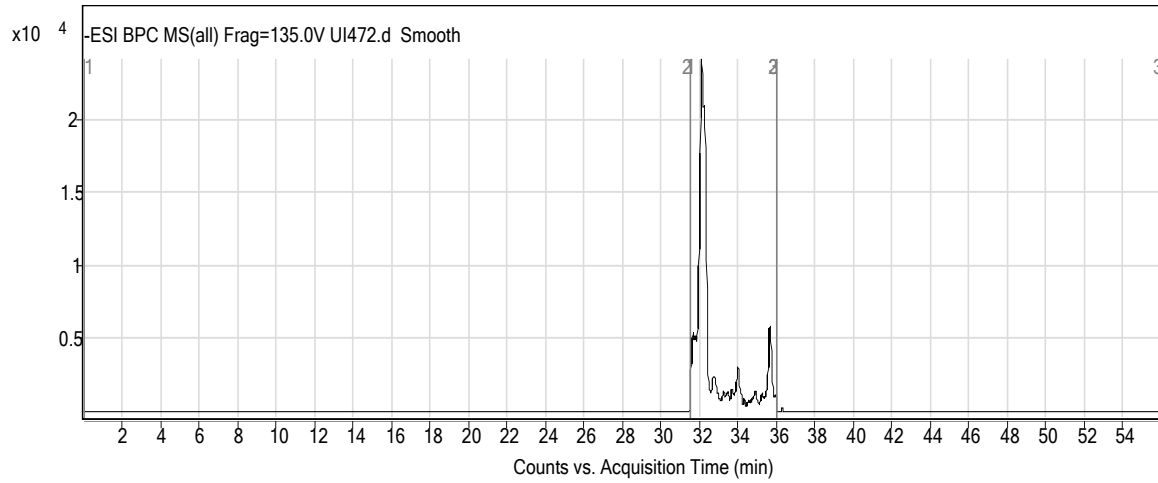
- HPLC-EC (m/z 515 [M-H])



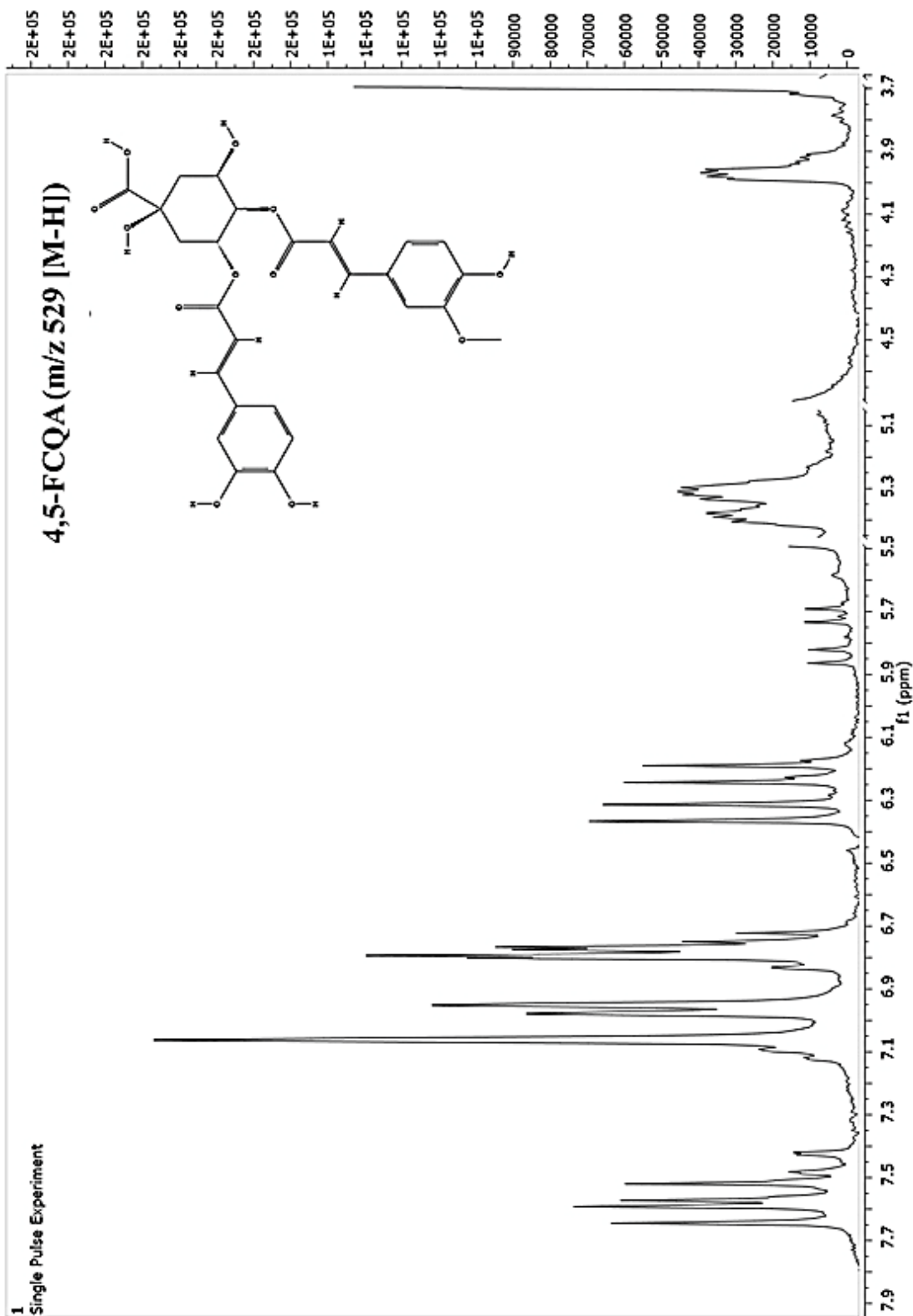
- ¹H-RMN: Ácido 3,4,5-triCQ (m/z 677 [M-H])



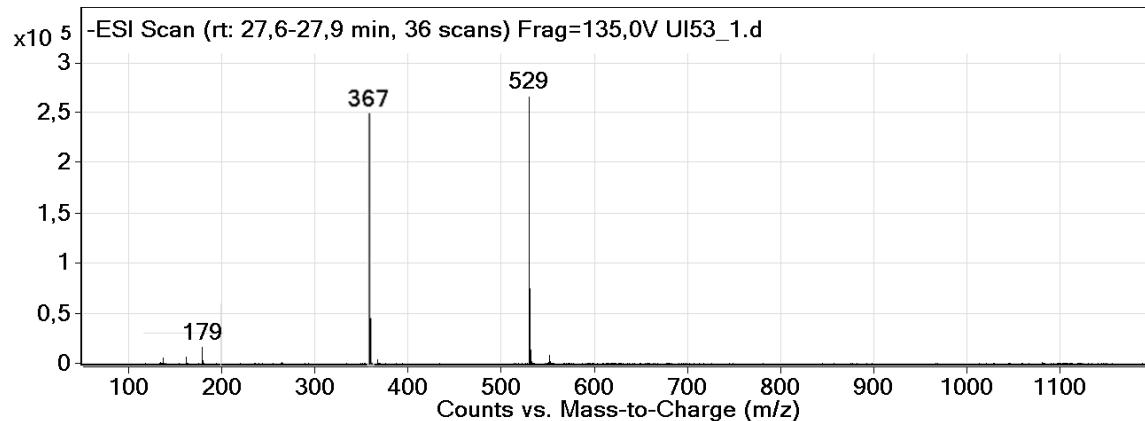
HPLC-EM: m/z 677 [M-H]



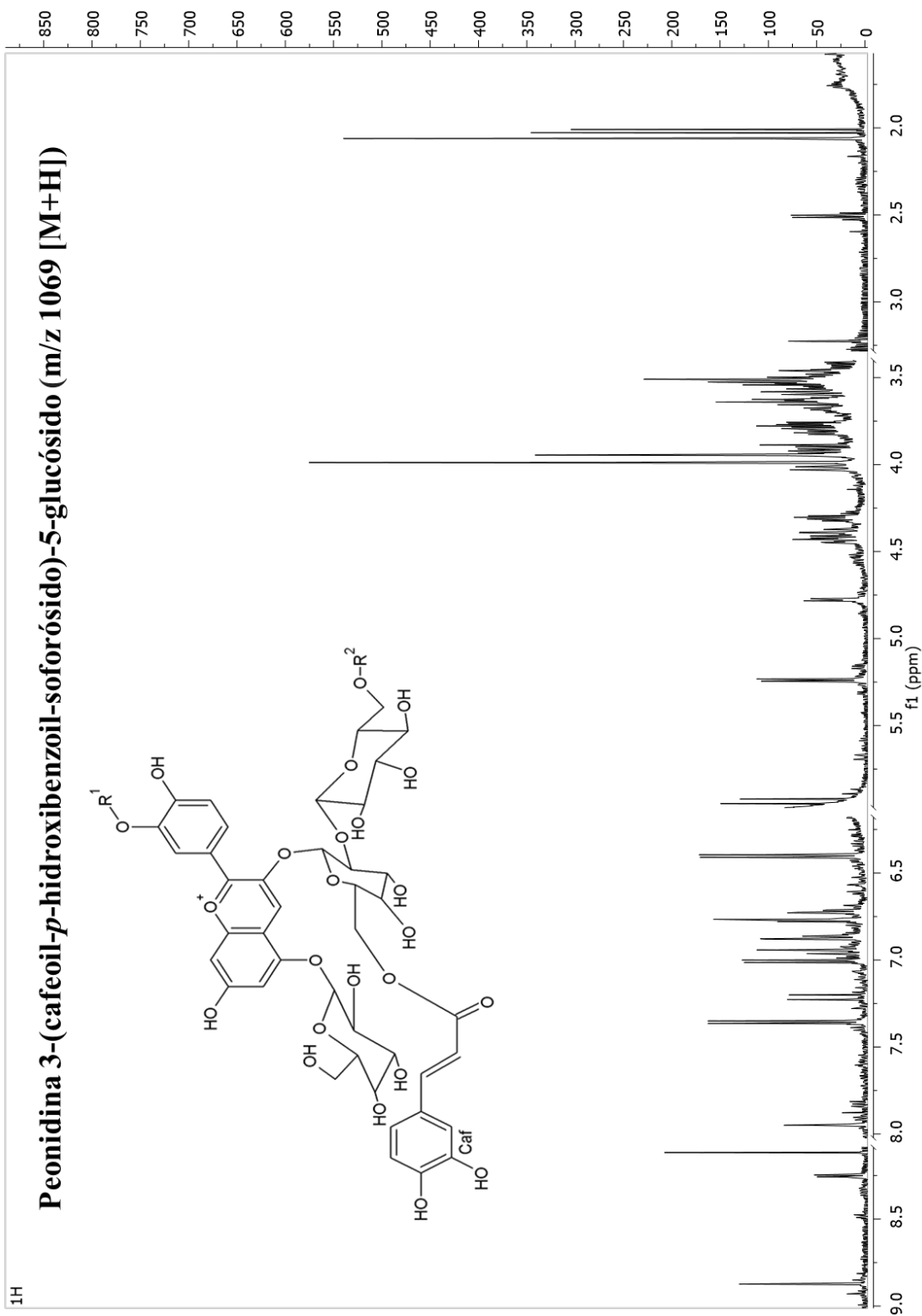
- $^1\text{H-RMN}$: Ácido 4,5-FCCQ (m/z 529[M-H])



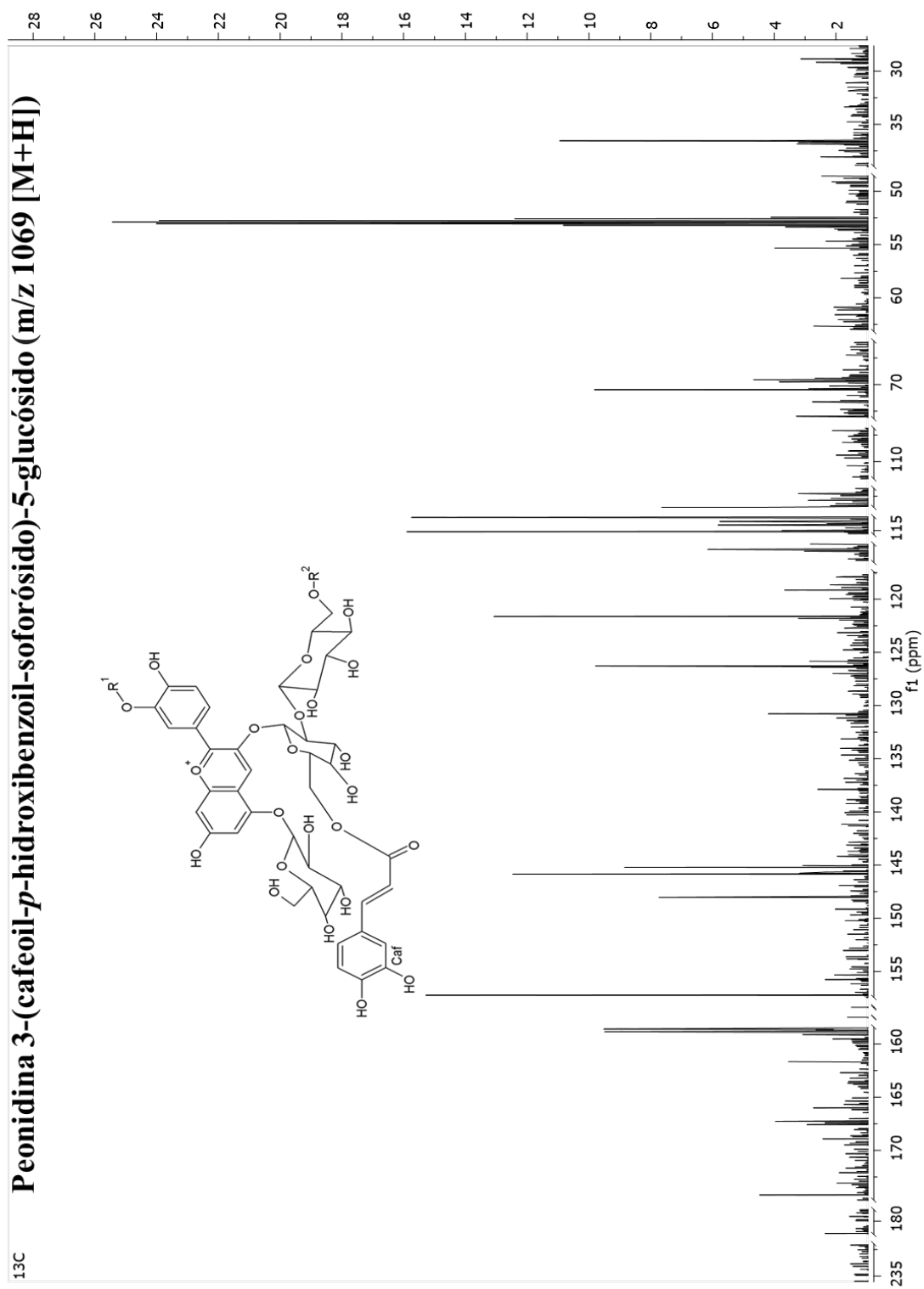
- HPLC-EM: m/z 529 [M-H]



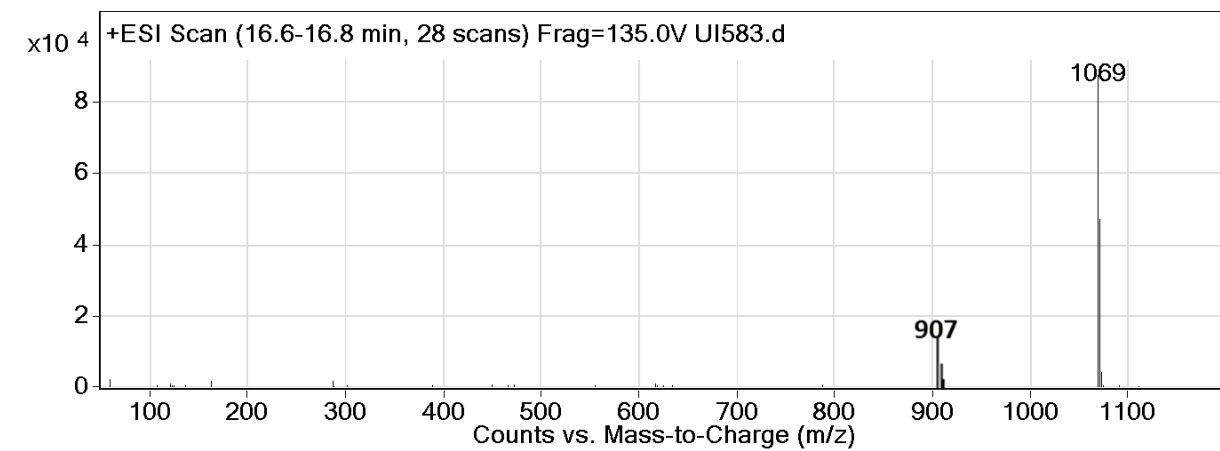
- $^1\text{H-RMN}$: Peonidina 3-(cafeoil-*p*-hidroxibenzoil-soforósido)-5-glucósido (m/z 1069 [M+H])



- ^{13}C -RMN: Peonidina 3-(cafeoil-*p*-hidroxibenzoil-soforósido)-5-glucósido (m/z 1069 [M+H])



HPLC-EM (m/z 1069 [M+H])



ANEXO 2

Ecuaciones de los compuestos que fueron aislados y cuantificados

La ecuación de la curva y el error estándar de regresión correspondiente a cada uno de los derivados del ácido cafeoilquínico y de las antocianinas, se presenta a continuación:

Cuadro A1. Ecuación de la curva y error estándar de los derivados -ACQ purificados de la planta de camote morado.

Num	Derivados -ACQ	Ecuación	R ²
1	5-cafeoilquínico	$3E+07x + 327936$	0.999
2	Ácido cafeico	$1E+08x + 805320$	0.999
3	Feruloil-quínico	$8E+06x - 57968$	0.996
4	3,4-dicafeoilquínico	$2E+07x - 586036$	0.999
5	3,5-dicafeoilquínico	$2E+07x + 2E+06$	0.999
6	4,5-dicafeoilquínico	$3E+07x - 408366$	0.999
7	4,5-feruloil cafeoilquínico	$3E+07x + 1E+06$	0.997
8	3,5-feruloil cafeoilquínico	$2E+08x - 455618$	0.996
9	3,4,5-tricafeoilquínico	$2E+07x - 566434$	0.998



Cuadro A2. Ecuación de la curva y error estándar de las antocianinas purificados de la planta de camote morado.

Num	Antocianina	Ecuación	R ²
2	Peonidina 3- <i>p</i> -hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido	4E+07x - 9236.2	0.998
4	Cianidina 3-cafeoil-feruloil-soforósido-5-glucósido	5E+07x - 33966	0.999
6	Peonidina 3-(6',6''-di-cafeoil-soforósido)-5-glucósido	5E+07x + 284836	0.995
7	Peonidina 3-cafeoil- <i>p</i> -hidroxibenzoil-soforósido-5-glucósido	7E+07x + 553446	0.999
8	Peonidina 3-cafeoil-feruloil-soforósido-5-glucósido	5E+07x - 99012	0.998
9	Cianidina 3-di-feruloil-soforósido-5-glucósido	9E+06x + 15784	0.994



ANEXO 3

Zimogramas de la PFO y POD

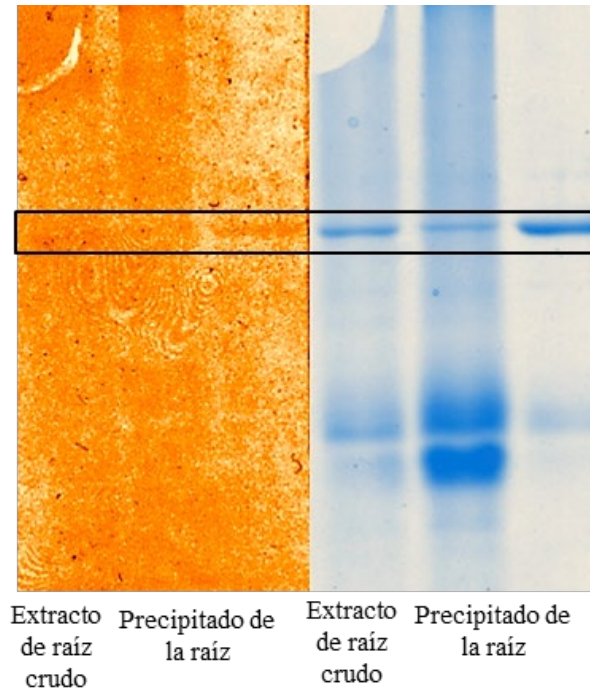
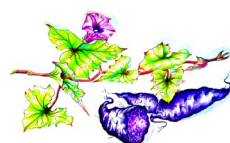


Figura A.1. PFO- Izquierda: zimograma con catecol 50 mM y 8 horas en agitación, derecha, gel sin reacción. Se señala la banda que dieron un ligero cambio de coloración más oscura. En este gel solo se presentaron los datos de las muestras de raíz morada, porque los otros órganos no dieron reacción.



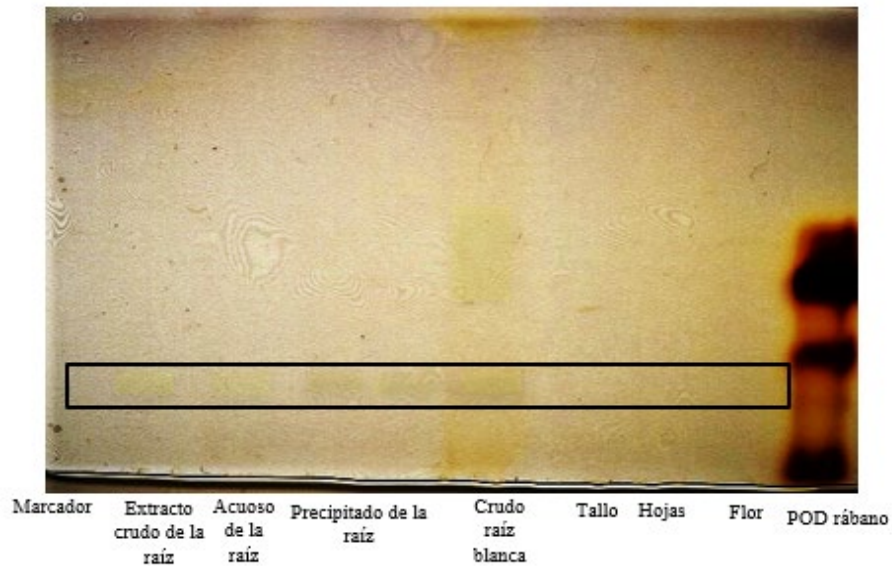
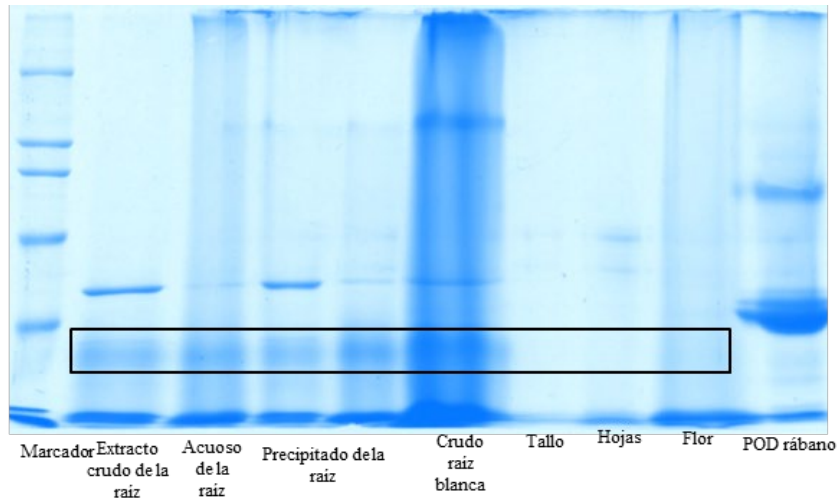
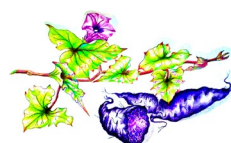


Figura A2. POD- Primer gel (arriba) sin reacción, segundo gel (abajo): zimograma de cada órgano de la planta de camote con guayaco 70 mM + H₂O₂, reacción instantánea, se utilizó como reacción control la POD comercial de rábano, se tomaron como reacción positiva a las bandas que se tiñeron de marrón-marrón claro.



ANEXO 4

Cuadro A3. Pasos de purificación de la PFO de camote morado

Pasos de extracción	Actividad enzimática/mL	Proteína $\mu\text{g/mL}$	Actividad específica (U/ μg)	Factor de Purificación (%)
Extracto crudo	11.25 \pm 1.76	134.12 \pm 15.32	0.084	1
Acuoso-Amberlita	20.36 \pm 2.16	117.36 \pm 10.45	0.173	2.07
Filtrado del carbón activado	22.59 \pm 2.57	99.28 \pm 9.36	0.228	2.72
Precipitado con carbón activado	27.53 \pm 2.89	88.06 \pm 8.98	0.323	3.72

Los datos se muestran como media \pm DE (desviación estándar) n = 3

Cuadro A4. Pasos de purificación de la POD de camote morado

Pasos de extracción	Actividad enzimática/mL	Proteína $\mu\text{g/mL}$	Actividad específica (U/ μg)	Factor de Purificación (%)
Extracto crudo	38.96 \pm 4.11	135.74 \pm 14.85	0.287	1
Acuoso-Amberlita	40.11 \pm 3.96	125.14 \pm 11.98	0.320	1.11
Filtrado del carbón activado	46.23 \pm 5.03	90.68 \pm 8.91	0.509	1.77
Precipitado por punto isoelectrico	51.26 \pm 5.62	75.85 \pm 6.99	0.675	2.35



ANEXO 5

- Artículos publicados derivados de esta investigación

Plant Foods for Human Nutrition (2019) 74:531–537
<https://doi.org/10.1007/s11130-019-00774-2>

ORIGINAL PAPER



Quantitative Analysis of the Biologically Active Compounds Present in Leaves of Mexican Sweet Potato Accessions: Phenols, Flavonoids, Anthocyanins, 3,4,5-Tri-Caffeoylquinic Acid and 4-Feruloyl-5-Caffeoylquinic Acid

Andrea Torres¹ & Francisco Basurto² & Arturo Navarro-Ocana¹

Published online: 11 November 2019.
Springer Science Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Sweet potato is one of the oldest crops cultivated in Mexico, and Mesoamerica is considered as a region with the greatest diversity of this species. Therefore, the present study focused on the evaluation of biologically active compounds, such as caffeoylquinic acid derivatives and flavonoid compounds, in sweet potato leaves of 200 accessions of the main producing regions of Mexico. The analysis of total phenol content (TPC) showed a great variability of concentrations among the examined accessions (54.41 to 284.64 mgTPC/g DW). Likewise, total flavonoid content (TFC) was determined and ranged from 10.01 to 40.17 mgTFC/g DW. Finally, total anthocyanin content (TAC) was evaluated, and concentrations obtained varied from 0.05 to 0.98 mgTAC/g DW. Additionally, HPLC analysis of all 200 accessions demonstrated the presence of caffeic acid (CA), 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), three isomers of di-caffeoylquinic acid (di-CCA) and 4-feruloyl-5-caffeoylquinic acid (4F-5CQA) in all test samples. Only 21 accessions tested showed the quantitative amount of 3,4,5-tri-caffeoylquinic acid (3,4,5-tri-CQA) with concentrations ranging from 44.73 to 193.22 mg/100 g DW and high content of 4F-5CQA (139.46 to 419.99 mg/100 g DW). The gathered data indicate that leaves of Mexican sweet potatoes are a promising source of phenolic compounds with remarkable nutraceutical potential.

Keywords Sweet potato leaves, Phenolic compounds · 3,4,5-tri-caffeoylquinic acid · 4-feruloyl-5-caffeoylquinic acid

Abbreviations

CA	Caffeic acid
4,5-Di-CQA	4,5-di-caffeoylquinic acid
3,4-Di-CQA	3,4-di-caffeoylquinic acid
3,5-Di-CQA	3,5-di-caffeoylquinic acid
4F-5CQA	4-feruloyl-5-caffeoylquinic acid
<i>I. batatas</i>	<i>Ipomoea batatas</i>
5-CQA	5-caffeoylquinic acid

3,4,5-Tri-CQA	3,4,5-tri-caffeoylquinic acid
TAC	Total anthocyanin content
TFC	Total flavonoid content
TPC	Total phenol content

Introduction

Sweet potato is one of the oldest crops cultivated in Mexico, and Mesoamerica has been recognized as a region with the highest genetic diversity of this species.

The tuberous roots are a natural source of bioactive compounds like alkaloids, phenols, coumarins, anthocyanins, glycolipids and triterpenes [1]. These compounds are distributed throughout the plant. Sweet potato leaves contain significant amounts of phenolic compounds, of which 70% are caffeoylquinic acid derivatives and up to 20% are made up by flavonoid compounds [2]. Among caffeoylquinic acid derivatives isolated from the sweet potato leaves can be found

Electronic supplementary material the online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11130-019-00774-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Arturo Navarro-Ocana
arturono@unam.mx

¹ Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, C.P., 04510 Mexico City, Mexico

² Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, C.P., 04510 Mexico City, Mexico



chlorogenic acid, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA, 3,4,5-tri-CQA and CA [3]. Another compound of interest present in the leaves of sweet potato is F-CQA [4] but only in qualitative amounts [5]. Importantly, the caffeoylquinic acid derivatives possess a wide range of pharmacological properties including hepatoprotective, antibacterial, antihistaminic, hypoglycemic and antimutagenic activities, besides, effects as inhibitors of HIV replication and radical uptake have been reported for these compound [6–8]. Gathered results indicate that the caffeoylquinic derivatives play an important role in the prevention of diseases associated with oxidative stress such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases, and the delay of aging [9]. However, specific studies of biological activity of each of the caffeoylquinic acid derivatives indicate that 3,4,5-tri-CQA exhibits the most pronounced bioactive properties; for example, antimutagenic potential of 3,4,5-tri-CQA is higher than that of mono- or di-CQA derivatives [10]. Additionally, 3,4,5-tri-CQA is a better inhibitor of aldose reductase [11]; as it shows a high degree of inhibitory selectivity of HIV replication [7]. In other studies, 3,4,5-tri-CQA has shown the highest acceleration activity in the production of ATP compared to other caffeoylquinic acid derivatives [12]. Nevertheless, 3,4,5-tri-CQA is present at low concentrations in limited plant sources, such as in *Aconitum coreanum* [13] and in *Securidaca longipedunculata* [7]. In contrast, the leaves of sweet potato were reported to contain 155 [14] and 76.6 mg/100 DW [11] of 3,4,5-tri-CQA depending on the variety.

Also, there exist varieties with purple-colored leaves, suggesting that these leaves contain high contents of anthocyanins [15], these have antioxidative activity *in vivo* as well as *in vitro* [16], also have the potential against multiple cancer cell types [17] and anti-hyperuricemic effect [18].

Hence, the objective of this work was to screen leaves extracts of 200 accessions from the main production regions of sweet potato in Mexico in terms of their total phenol content (TPC), total flavonoid content (TFC) and total anthocyanin content (TAC). Additionally, it was aimed to identify accessions with the highest 3,4,5-tri-CQA and 4F-5CQA concentrations using HPLC analysis.

Materials and Methods

Plant Material and Sample Preparation

The leaves of 200 accessions of *I. batatas* (L.) Lam (sweet potato), which were grown under the same conditions, were provided by the Conservation Center of subtropical species National System of Phylogenetic Resources (SINAREFI) SNICS-SAGARPA; located in Harinas de Coatepec in the State of Mexico.

The leaves of the 200 accessions analyzed were collected from 18 states of Mexico and each sample contained between 20 to 30 leaves of approximately 5 cm long that were stored in paper bags at -80°C in an ultra-freezer (Model ELT-13 V-85 A 30) for later use (FreeZone lyophilized 4.5).

Extraction

The phenol compounds were extracted by sonication [Cole-Parmer 8892 (100 W)] at 40°C for 20 min using 1 g of lyophilized powder of sweet potato leaves resuspended in 20 mL of solvent mixture that contained acetone: water: lactic acid (40:60:1). The results were expressed as mg of bioactive compounds/g dry weight (DW). All tests were performed in triplicate.

Quantification of Total Phenol Content

In order to determine the amount of phenolic compounds in the samples, the method previously described by Taga et al [19] was used. In brief, 100 μL of the filtered extract were mixed with 2 mL of 2% Na_2CO_3 (*w/v*) and left to stand for 2 min. Following that time, 100 μL of Folin-Ciocalten reagent (diluted with H_2O 1:1) was added and left to stand for 30 min. Next, the absorbance at 750 nm was measured using Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies spectrophotometer. For calibration curve, a set of tannic acid standard solutions was prepared at concentrations ranging from 0.03 to 1.0 mg/mL. The phenolics content was determined by comparison with the standard calibration curve. The results were expressed as mgTPC/g DW.

Quantification of Total Flavonoid Content

The assay was carried out following the modified method described by Chang et al. [20]. 1 mL of extract was mixed with 1.4 mL of H_2O and 300 μL of 5% NaNO_3 (*w/v*) and left for 5 min. After that time, 300 μL of 10% AlCl_3 (*w/v*), 2 mL of 1 M NaOH and 5 mL of H_2O were added. The absorbance was measured at 415 nm using Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies spectrophotometer. For calibration curve, a set of catechin standard solutions was prepared in a range concentration from 0.01 to 0.3 mg/mL. The flavonoids content was determined by comparison with the standard calibration curve. The results were expressed as mg TFC/g DW.

Quantification of Total Anthocyanin Content

For this purpose, the pH-differential methodology described by Giusti and Wroslta [21] was followed. In brief, to a test tube containing 200 μL of the extract were added 1800 μL of chloride buffer (0.025 M, pH 1) and mixed.



Another 200 μL of extract were transferred to a test tube containing 800 μL of acetates buffer (0.4 M, pH 4.5) and mixed. The difference in absorbance of both samples was measured at 510 and 700 nm using Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies spectrophotometer. Total anthocyanin content was calculated using the equations proposed by Giusti and Wrolstad [21]. The molecular weight and molar absorptivity used in this formula correspond to that of cyanidin-3-glucoside. The results were expressed as mgTAC/g DW.

Identification of 3,4,5-Tri-CQA and 4F-5CQA

HPLC Analysis

The identification and quantification of 3,4,5-tri-CQA and of 4F-5CQA was determined using HPLC. For the rest of the caffeoylquinic acid derivatives, commercial standards were used: caffeic acid and chlorogenic acid were purchased from SIGMA-ALDRICH, 3,4-di-CQA; 3,5-di-CQA and 4,5-di-CQA were supplied by Chendu Biopurify Phytochemicals Ltd.; likewise, their presence was confirmed by an analysis of MS-HPLC (SM1) and compared with the data reported in the literatura [22]. The HPLC analysis was performed on the Hypersil Gold C18 selectivity column (250 \times 4.6 mm; 5 μm) using Waters system equipped with autosampler and UV-Visible detector (320 nm). The binary mobile phase consisted of (A) water/acetonitrile/formic acid with volume ratio of 89:10:1 and (B) acetonitrile; that was delivered at flow rate of 1.0 mL/min and the gradient of 3–25% B in 45 min, 30% B at 47 min, and 3% B at 56 min.

Purification of the 3,4,5-Tri-CQA and 4F-5CQA

For purifications of 3,4,5-tri-CQA and 4F-5CQA, 500 g of lyophilized leaves of *I. batatas* L. Lam. of the accession that contained 3,4,5-tri-CQA were used. Extraction was carried out adding 5 L of the solvent mixture of acetone: water: lactic acid with a volume ratio of 40:60:1. The crude extract was concentrated under reduced pressure (Rotavapor Buchi) and subsequently dissolved in 500 mL of H_2O . Next, 6 L of hexane were added, and the aqueous fraction was recovered. Following this, 6 L of ethyl acetate were added, and the organic fraction was recovered (fraction enriched in caffeoylquinic acid derivatives). Each of the caffeoylquinic acid derivatives were isolated using silica gel column chromatography with gradient elution of 50% hexane-methylene chloride, 100% methylene chloride, 50% methylene chloride-ethyl acetate and 100% ethyl acetate. The characterization of 3,4,5-tri-CQA and 4F-5CQA was performed by HPLC-MS and ^1H NMR are described in SM1. The purity of

3,4,5-tri-CQA and 4F-5CQA was of 93% and 90%, respectively, calculated by HPLC.

Quantification of 3,4,5-Tri-CQA and 4F-5CQA

In order to prepare standard curves for the HPLC, 3,4,5-tri-CQA and 4F-5CQA were weighed out accurately and dissolved in 80% methanol (v/v) to prepare a stock solution for each test compound at concentration of 1 mg/ml. A set of standard solutions was prepared by serial dilution and the following concentration was obtained: 0.75, 0.50, 0.30 and 0.10 mg/mL in 80% methanol (v/v). The standard curves equations and standard error of regression corresponding to each of the caffeoylquinic acid derivatives are described in SM2.

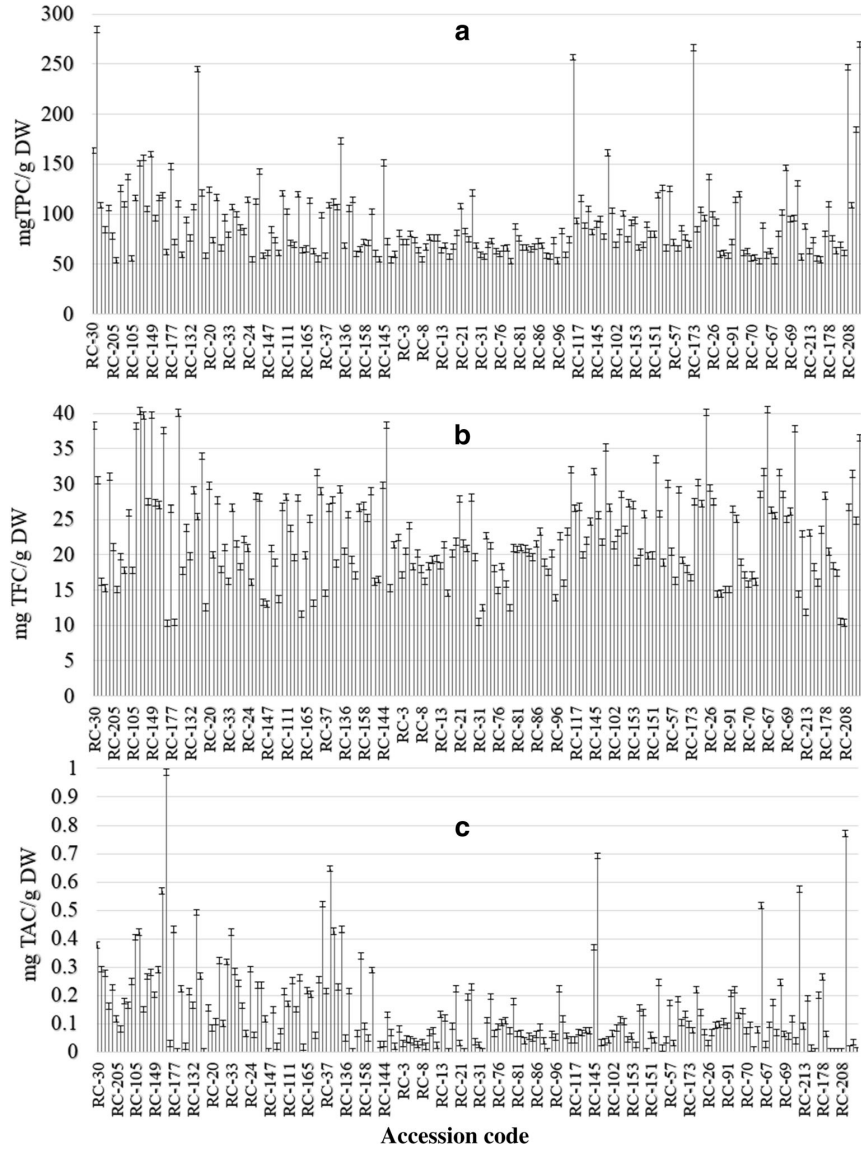
Results and Discussion

Total Phenol Content

Figure 1a shows the total phenol content in leaves of 200 sweet potato accessions, which exhibit a great variability of TPC concentration ranging from 54.41 to 284.64 mgTPC/g DW. However, only 28% of the recorded values were higher than 100 mg of total phenol content *per dry leaf mass*. These TPC values were higher than those reported by Song et al. [23]. In his work, Chinese varieties of sweet potato leaves were studied and their total phenols content was determined using microwave assisted extraction that after optimization allowed to obtain 61.14 mg GAE/g DW. In other work, total chlorogenic acids content reported for SM-2 variety of sweetpotato leaves from Wufeng, Taichung City, Taiwan, varied from 39.34 to 154.05 mg/g DW [14]. In the present study only 13 Mexican accessions exceeded concentration of 150 mg/g D.W. It is also noteworthy that values of total phenolic content of the sweet potato leaves are superior to those obtained for other vegetables more commonly consumed in the world, such as spinach [24]. In addition, TPC in sweet potato leaves is equivalent or superior to other commercially available leaves, such as coffee (*Coffea*) leaves with up to 212.4 mg/g DW [25]. Interestingly; a main source of polyphenols in the diet of European populations is comprised by coffee, tea and fruits with an average total intake of 584 to 1783 mg/day. Leafy vegetables account for just 1.5% of the total intake of polyphenols in the United Kingdom while majority of the consumed phenolic compounds belong to the family of caffeoylquinic acids [26]. In this context, 1 g/DW of sweet potato leaves included into the diet in Europe could increase that proportion to 10% of the total polyphenols consumed.



Fig. 1 a Total phenol content ($n=3$), b total flavonoid content ($n=3$) (c) total anthocyanin content ($n=3$) in 200 accessions of Mexican *I. batatas*



Total Flavonoid Content

In general, total flavonoid content in leaves of 200 sweet potato accessions analyzed in this study varied from 10.01 to 40.17 mg TFC/g DW, as shown in Fig. 1b. The accessions of *I. batatas* leaves, that presented the highest content of phenols, were also rich in flavonoids with concentrations ranging from 25 to 40.17 mg TFC/g DW. The obtained values were higher than those reported in another study in China with values varying from 3.14 to 16.51 mg RE/g DW [4].

Total Anthocyanin Content

Due to the reddish coloration shown by some leaves of the studied accessions, their TAC was quantified, as set out in Fig. 1c. For certain accessions the TAC could not be quantifiable but most of the samples studied contained anthocyanins at a concentration below 0.15 mgTAC/g DW. On the other hand, accessions containing the highest amounts of phenols and flavonoids also showed the most notable total anthocyanin content with values greater than 0.2 mg TAC/g DW. The obtained values are higher than those reported for the leaves of the purple-



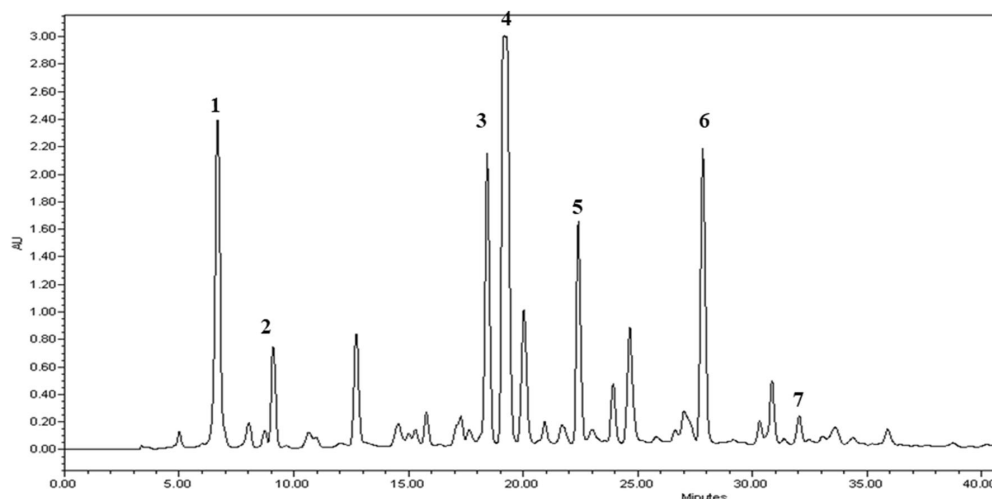


Fig. 2 HPLC chromatogram: (1) 5-CQA, (2) CA, (3) 3,4-di-CQA, (4) 3,5-di-CQA, (5) 4,5-di-CQA, (6) 4F-5CQA acid and (7) 3,4,5-tri-CQA detected from leaves of sweet potato

fleshed sweet potato P40 cultivar with 0.038 mgPN3GE/g DM, and are similar to the TAC determined for the orange-fleshed

Beauregard cultivars and white-fleshed Bonita with concentrations of 0.24 and 0.45 mgPN3GE/g DM, respectively [27].

Table 1 3,4,5-tri-CQA and 4F-5CQA concentrations measured in 21 accessions of the Mexican sweet potato plant (each value is represented as mean \pm SD (n = 3))^a

Accession number	States of Mexico	3,4,5-tri-CQA (mg/100 g I)
RC-30	Michoacan	193.22 \pm 7.99 ^a
RC-163	Oaxaca	185.43 \pm 7.70 ^{ab}
RC-172	Puebla	184.40 \pm 9.54 ^{ab}
RC-131	Morelos	181.02 \pm 14.48 ^b
RC-170	Oaxaca	174.56 \pm 9.99 ^{bc}
RC-145	Michoacan	167.48 \pm 10.18 ^{cd}
RC-167	Oaxaca	167.15 \pm 8.17 ^{cd}
RC-144	Michoacan	156.56 \pm 10.52 ^d
RC-101	Guanajuato	143.20 \pm 6.25 ^e
RC-125	Michoacan	140.48 \pm 6.81 ^e
RC-178	Morelos	140.42 \pm 7.42 ^e
RC-139	Guerrero	132.93 \pm 6.06 ^{ef}
RC-162	Queretaro	123.45 \pm 5.18 ^{fg}
RC-141	Guerrero	116.40 \pm 4.02 ^{gh}
RC-29	Puebla	114.21 \pm 4.23 ^{gh}
RC-140	Guerrero	107.18 \pm 3.95 ^{hi}
RC-67	Puebla	97.94 \pm 3.98 ⁱ
RC-188	Hidalgo	95.36 \pm 2.95 ⁱ
RC-21	Mexico State	82.69 \pm 2.83 ^j
RC-143	Michoacan	79.27 \pm 1.93 ^j
RC-53	Chiapas	44.73 \pm 1.45 ^k

^a Data are shown as mean \pm SD (standard deviation)

^b Alphabetical superscript lower-case letters indicates significant statistical difference between accessions regarding the quantification of 3,4,5-tri-CQA

^c Alphabetical superscript lower-case letters indicates significant statistical difference between accessions regarding the quantification



HPLC Identification of 3,4,5-Tri-CQA and 4F-5CQA

Furthermore, leaves of the 200 sweet potato accessions were analyzed by HPLC (Figure SM1) and according to the elution order shown in Fig. 2 and Table SM1, it was shown that all the samples had the same profile in regard to the presence of caffeic acid, 5-CQA, di-CQA and 4F-5CQA though varying in their total concentration. In addition, the prevailed tendency observed among the test samples was to possess more di-CQA than 5-CQA, CA and 4F-5CQA. Concentrations of 3,4,5-tri-CQA were recorded the lowest, and only 21 accessions exhibited quantifiable amounts of this compound under the experimental conditions established for this work. Similarly, in the study carried out by Jung [28] on the profile of the caffeoylquinic acid derivatives in different varieties of Korean sweet potato leaves; higher concentration of di-CQAs was observed in comparison to 5-CQA, however, no report was available on presence of 3,4,5-tri-CQA and 4F-5CQA. The 21 accessions of *I. batatas* leaves with quantifiable concentrations of 3,4,5-tri-CQA were found among 28% of the 200 accessions with higher values recorded for TPC (105.06 at 284.5 mg/g DW), TFC (25.09 mg at 38.29 mg/g DW), and they were also observed to possess TAC higher than 0.65 mg/g DW.

Quantification of the 3,4,5-Tri-CQA and 4F-5CQA

Once the accessions containing quantifiable amounts of 3,4,5-tri-CQA were identified by HPLC, their concentrations were measured and varied from 44.73 to 193.22 mg/100 g DW, as shown in Table 1. With respect to other studies, 3,4,5-tri-CQA concentrations obtained in this work were comparable to those reported by Islam et al [29] who analyzed 1389 sweet potato genotypes provided by gene bank of the NARCKO; these concentrations were in the range of 15.84 to 220.95 mg/100 g DW. Likewise, Jeng et al. [14] studied Taiwan's SM-2 sweet potato variety and obtained 3,4,5-tri-CQA concentrations between 53 and 155 mg/100 g DW. On the other hand, in the studies carried out by Kurata et al. [11] on the sweet potato genotypes also provided by the NARCKO the 3,4,5-tri-CQA concentration was found at 76 mg/100 DW. It is remarkable that the accessions with the highest 3,4,5-tri-CQA acid in content are cultivated on the land belonging to the states (Table 1), located geographically in Southern Mexico (Figure SM2), culturally known as Mesoamerica, where originally sweet potato was domesticated and cultivated and cultivation.

With respect to the 4F-5CQA content in the sweet potato leaves of 21 accessions, the concentration of this compound was found to varied from 139.46 to 419.99 mg/100 g DW (Table 1). Nevertheless; in another study [5] the presence of 4F-5CQA in sweet potato cultivars of Tanzania and China was determined only qualitatively and it was suggested that the presence of the F-CQA varied according to the country of origin.

Conclusion

The evaluated accessions of Mexican sweet potatoes leaves proved to be an important source of total phenols, flavonoids, and anthocyanins, as well as of CA, 5-CQA, three isomers of di-CQA, and 4F-5CQA. Thanks to this, sweet potato leaves could provide up to 10% of the daily intake of polyphenols in the diets of health-conscious population. Additionally, the quantifiable amounts of 3,4,5-tri-CQA were detected only in 21 test accessions from the southern region of Mexico. In this study, they were also presented to sweet potato leaves as an important source of 4F-5CQA. Therefore, leaves of the Mexican sweet potatoes are a promising source of phenolic compounds with remarkable nutraceutical potential.

Acknowledgments The CONACYT doctoral scholarship of Andrea Torres (scholarship number: 308249); the technical support of Margarita Guzman; project PAPIIT-UNAM-IT202318.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mohanraj R, Sivasankar S (2014) Sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) - a valuable medicinal food: a review. *J Med Food* 17: 733–741. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2818>
2. Mu T, Sun H, Zhang M, Wang C (2017) Chlorogenic acids from sweet potato. *Sweet Potato Processing Technology*. Elsevier, pp 357–403
3. Islam I, Shaikh AU, Shahidul IM (2009) Antioxidative and antimutagenic potentials of phytochemicals from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. *Int J Cancer Res* 5:83–94. <https://doi.org/10.3923/ijcr.2009.83.94>
4. Zhang L, Tu Z, Wang H et al (2015) Comparison of different methods for extracting polyphenols from *Ipomoea batatas* leaves, and identification of antioxidant constituents by HPLC-QTOF-MS2. *Food Res Int* 70:101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.012>
5. Zheng W, Clifford MN (2008) Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. *Food Chem* 106:147–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.053>
6. Pereira A dos Santos, Pereira AF de M, Trugo L, Neto FR de A (2003) Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforsch C58*: 590–593. <https://doi.org/10.1515/znc-2003-7-824>
7. Mahmood N, Moore PS, De Tommasi N et al (1993) Inhibition of HIV infection by caffeoylquinic acid derivatives. *Antivir Chem Chemother* 4:235–240. <https://doi.org/10.1177/095632029300400406>
8. Heyman HM, Senejoux F, Seibert I, Klimkait T, Maharaj VJ, Meyer JJ (2015) Identification of anti-HIV active dicaffeoylquinic- and tricaffeoylquinic acids in *Helichrysum populifolium* by NMR-based metabolomic guided fractionation. *Fitoterapia* 103:155–164. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.03.024>
9. Garg SK (2016) Green coffee bean. *Nutraceuticals Effic Saf Toxic*: 653–667. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00047-4>




10. Yoshimoto M, Yahara S, Okuno S et al (2002) Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:2336–2341. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2336>
11. Kurata R, Yahara S, Yamakawa O, Yoshimoto M (2011) Simple high-yield purification of 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf and its inhibitory effects on aldose reductase. *Food Sci Technol Res* 17:87–92. <https://doi.org/10.3136/fstr.17.87>
12. Miyamae Y, Kurisu M, Han J, Isoda H, Shigemori H (2011) Structure–activity relationship of caffeoylquinic acids on the accelerating activity on ATP production. *Chem Pharm Bull* 59:502–507. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.502>
13. Lee CS, Lee SA, Kim YJ et al (2011) 3,4,5-Tricaffeoylquinic acid inhibits tumor necrosis factor- α -stimulated production of inflammatory mediators in keratinocytes via suppression of Akt- and NF- κ B-pathways. *Int Immunopharmacol* 11:1715–1723. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.06.003>
14. Jeng TL, Lai CC, Liao TC et al (2015) Effects of drying on caffeoylquinic acid derivative content and antioxidant capacity of sweet potato leaves. *J Food Drug Anal* 23:701–708. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.07.002>
15. Islam MS, Yoshimoto M, Terahara N, Yamakawa O (2002) Anthocyanin compositions in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:2483–2486. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2483>
16. Kano M, Takayanagi T, Harada K et al (2005) Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:979–988. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.979>
17. Vishnu VR, Renjith RS, Mukherjee A, et al (2019) Comparative study on the chemical structure and *In vitro* antiproliferative activity of anthocyanins in purple root tubers and leaves of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *J Agric Food Chem* 67:2467–2475. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05473>
18. Zhang ZC, Su GH, Luo CL et al (2015) Effects of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. cultivar Eshu no. 8) on the serum uric acid level and xanthine oxidase activity in hyperuricemic mice. *Food Funct* 6:3045–3055. <https://doi.org/10.1039/c5fo00499c>
19. Taga MS, Miller EE, Pratt DE (1984) Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 61:928–931. <https://doi.org/10.1007/BF02542169>
20. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chen J-C (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10:178–182
21. Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Curr Protoc Food Anal Chem* 00:F1.2.1–F1.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
22. Wianowska D, Gil M (2019) Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochem Rev* 18:273–302. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9592-y>
23. 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. *Innov Food Sci Emerg Technol* 12:282–287. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.03.001>
24. Frati A, Antonini E, Ninfali P (2016) Industrial freezing, cooking, and storage differently affect antioxidant nutrients in vegetables, Fruits, Vegetables, and Herbs. Elsevier, pp 23–39
25. Salgado P, Favarin J, Leandro R, Filho O (2008) Total phenol concentrations in coffee tree. *Sci Agric (Piracicaba, Braz)* 65:354–359. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400005>
26. Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell JA, et al (2016) Dietary polyphenol intake in Europe: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *Eur J Nutr* 55:1359–1375. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0950-x>
27. Su X, Griffin J, Xu J, Ouyang P, Zhao Z, Wang W (2019) Identification and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato leaves. *Heliyon* 5:e01964. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01964>
28. Jung JK, Lee SU, Kozukue N et al (2011) Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots. *J Food Compos Anal* 24:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.025>
29. Islam S, Yoshimoto M, Yahara S et al (2002) Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *J Agric Food Chem* 50:3718–3722. <https://doi.org/10.1021/jf020120l>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Article

Caffeoylquinic Acid Derivatives of Purple Sweet Potato as Modulators of Mitochondrial Function in Mouse Primary Hepatocytes

Andrea Torres ^{1,†}, Lilia G. Noriega ^{2,†}, Claudia Delgadillo-Puga ³, Armando R. Tovar ² and Arturo Navarro-Ocaña ^{1,*} 

¹ Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México 04529, Mexico; andrea_ta5@hotmail.com

² Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, Mexico; lgnoriegal@gmail.com (L.G.N.); armando.tovar@incmnsz.mx (A.R.T.)

³ Departamento de Nutrición Animal Dr. Fernando Pérez-Gil Romo, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, Mexico; claudia.delgadillo@incmnsz.mx

* Correspondence: arturono@unam.mx; Tel.: +52-55556225345

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Torres, A.; Noriega, L.G.; Delgadillo-Puga, C.; Tovar, A.R.; Navarro-Ocaña, A. Caffeoylquinic Acid Derivatives of Purple Sweet Potato as Modulators of Mitochondrial Function in Mouse Primary Hepatocytes. *Molecules* **2021**, *26*, 319. <https://doi.org/10.3390/molecules26020319>

Academic Editor: Farid Chemat

Received: 1 December 2020

Accepted: 7 January 2021

Published: 9 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Owing to their antioxidant properties, caffeoylquinic acid (CQA)-derivatives could potentially improve the impaired metabolism in hepatic cells, however, their effect on mitochondrial function has not been demonstrated yet. Here, we evaluated the impact of three CQA-derivatives extracted from purple sweet potato, namely 5-CQA, 3,4- and 4,5-diCQA, on mitochondrial activity in primary hepatocytes using an extracellular flux analyzer. Notably, an increase of maximal respiration and spare respiratory capacity were observed when 5-CQA and 3,4-diCQA were added to the system indicating the improved mitochondrial function. Moreover, 3,4-diCQA was shown to considerably increase glycolytic reserve which is a measure of cell capability to respond to an energy demand through glycolysis. Conversely, 4,5-diCQA did not modify mitochondrial activity but increased glycolysis at low concentration in primary hepatocytes. All compounds tested improved cellular capacity to oxidize fatty acids. Overall, our results demonstrated the potential of test CQA-derivatives to modify mitochondrial function in hepatic cells. It is especially relevant in case of dysfunctional mitochondria in hepatocytes linked to hepatic steatosis during obesity, diabetes, and metabolic syndrome.

Keywords: purple sweet potato; CQA-derivatives; maximal respiration; glycolysis; hepatic steatosis

1. Introduction

Sweet potato (*Ipomoea batatas* L. (Lam)) was originally domesticated in tropical America, most probably in a region between the Yucatan Peninsula in Mexico and the Orinoco river in Venezuela, as demonstrated by morphological analysis [1]. Sweet potatoes are naturally rich in phenolic compounds which content varies according to the pulp color (yellow, white, or purple). The purple pulp sweet potato (PSP) has the highest total phenolic content (TPC) concentration [2]. Some researchers point out that caffeoylquinic acid derivatives (CQA-derivatives) comprise 70% of the total phenols while approximately 20% are made up by flavonoids [3]. Among major CQA structures found in PSP are 5-CQA, and three diCQA, namely 3,5-, 3,4-, and 4,5-diCQA [4]. These compounds have been known for their protective role against oxidative stress in human body preventing in this way many diseases [5].

The beneficial effects of CQA-derivatives have been widely studied and include hepatoprotective, antihistamine, and hypoglycemic activities, as well as inhibitory effects on free radicals and HIV replication, and antimutagenic properties [6–8]. Many biological



functions played by these compounds have already been well described while others still require investigation and are currently under scrutiny [9]. Furthermore, the potential role of CQA-derivatives in metabolic diseases, such as obesity, diabetes, and metabolic syndrome, has been reviewed recently [10]. In these works, the effects of supplementation with 5-CQA [11] or extracts containing CQA-derivatives [12,13] were studied using animal models with diet-induced obesity or hyperglycemia. It was demonstrated a decreased body weight gain and a hypoglycemic effect induced by these compounds.

Several mechanisms have been proposed to explain the beneficial effect of CQA-derivatives. For example, activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) [14] and modulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) [15] have been frequently associated with an improvement of mitochondrial function [16–18]. Regulation of mitochondrial activity represents a main target in the treatment of metabolic diseases, such as obesity, diabetes, or metabolic syndrome, with the aim to re-establish metabolic alterations. To our knowledge, the effect of CQA-derivatives on mitochondrial performance has not been evaluated yet. The use of extracellular flux analyzer technology represents an excellent and reliable tool to evaluate the effect of bioactive compounds on mitochondrial function, through an accurate and real time measurement of oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of live cells. Specifically, the measurement of OCR and ECAR in basal conditions and after the sequential administration of oligomycin, carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), rotenone and antimycin A, and 2-deoxyglucose, allows us to determine basal and maximal respiration, respiration associated to ATP synthase, spare respiratory capacity, proton leak, non-mitochondrial respiration and the glycolytic capacity of a cell [16]. Notably, measurements of the above parameters provide valuable insight into the mode of action of a test compound and its modulatory properties on the mitochondrial activity.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of three CQA-derivatives, namely 5-CQA, 3,4-diCQA and 4,5-diCQA, isolated from PSP on mitochondrial function in primary hepatocytes. For that purpose, the extracellular flux analyzer technology was used to determine whether these compounds have a potential to improve impaired mitochondrial function, which is a common characteristic of hepatic steatosis during obesity, diabetes, and metabolic syndrome.

1. Results

1.1. Identification and Quantification of CQA-Derivatives

Purple sweet potatoes were evaluated for total phenolic content (TPC) and the presence of CQA-derivatives according to the root size classified as PSP-L (>1 kg), PSP-M (0.2 ~ 1 kg), and PSP-S (<0.2 kg) as shown in Figure 1. TPC ranged from 19.36 to 28.26 mg/g DW among test tubers and it was the highest in PSP-S roots followed by PSP-M and PSP-L with TPC levels 27.4% and 46% lower than that found in PSP-S, respectively. Subsequently, CQA-derivatives were extracted from the PSP crude extract by means of hydrophobic affinity extraction and separated using silica gel column chromatography. Three CQA-derivatives, namely 5-CQA, 3,4-diCQA and 4,5-diCQA, were quantitatively analyzed, and characterized by HPLC-ESI-MS (Table 1 and Figure 2) as shown in Figure 2, the test CQA-derivatives accounted for 32.4%, 36.8% and 43.24% of TPC in large, medium and small-size PSP tuberous roots; respectively. Of the three structures, the most abundant polyphenol was 5-CQA followed by 3,4- and 4,5-diCQA.



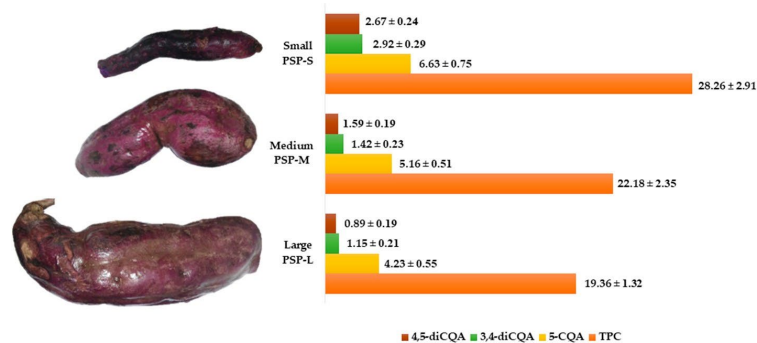


Figure 1. Total polyphenolic content (TPC), 5-CQA, 3,4-diCQA and 4,5-diCQA concentrations measured in 3 size of Mexican PSP: large (PSP-L), medium (PSP-M), and small (PSP-S). Each bar is the mean accompanied of the mean value \pm SD of three independent experiments.

Table 1. CQA-derivatives in PSP identified by mass spectrometry (HPLC-MS).

t_R (Min)	Compound	Molecular Formula	Molecular Ion (M-H) (m/z)	Fragments (m/z)	% of Purity
6.2	5-CQA	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353	191	97
17.7	3,4-diCQA	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515	353	95
21.5	4,5-diCQA	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515	353	96

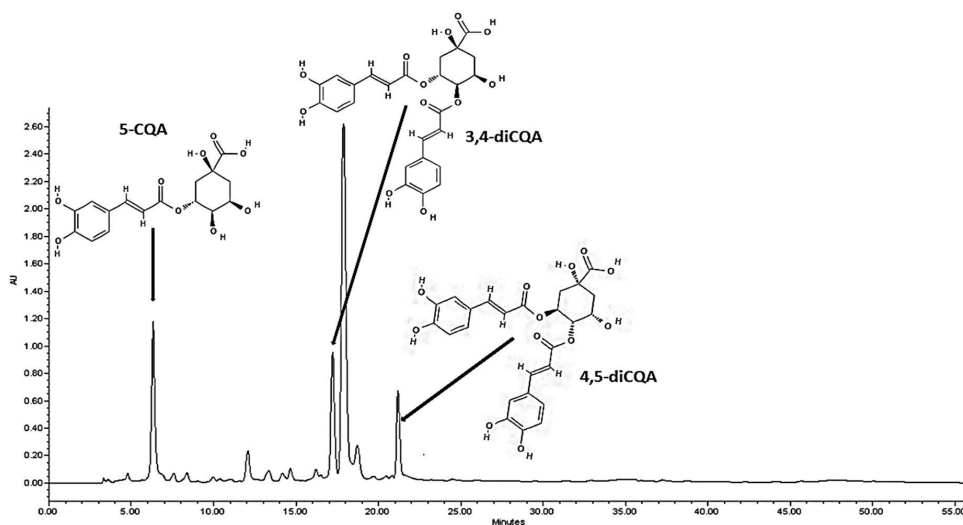


Figure 2. Chromatogram of CQA-derivatives from PSP and detected 320 nm.

1.1. Effect of 5-CQA, 3,4-diCQA or 4,5-diCQA on Mitochondrial Function on Primary Hepatocytes

To evaluate the effects of CQA-derivatives on mitochondrial function in mouse primary hepatocytes, mitochondrial stress tests were carried out using increasing concentrations of test compounds. It was observed that 5-CQA did not modify basal and non-mitochondrial respiration (Figure 3A,B) as well as oxygen consumption associated with ATP production. Interestingly, 5-CQA significantly increased the maximal respiration and



spare respiratory capacity of primary hepatocytes which was indicative of the enhanced oxidative capacity in mitochondria (Figure 3B). However, this compound did not affect any glycolysis-related parameters, except for the glycolytic capacity that dropped in the presence of a 5 $\mu\text{g/L}$ 5-CQA (Figure 3C,D). Overall, the obtained results indicated that 5-CQA had a potential to increase mitochondrial activity in primary hepatocytes.

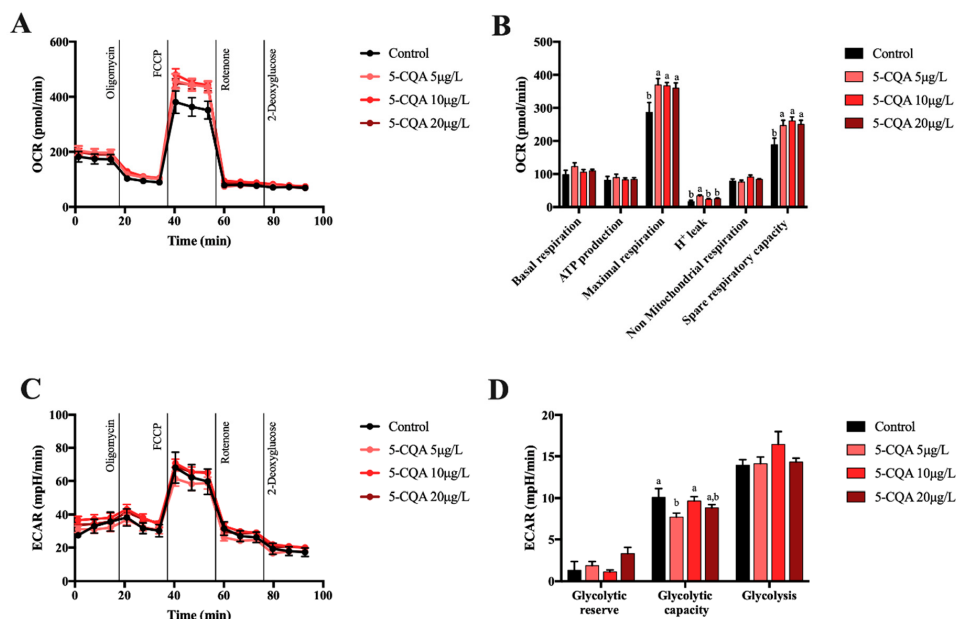


Figure 3. Oxygen consumption rate (OCR) (A), mitochondrial function parameters (B), extracellular acidification rate (ECAR) (C), and glycolytic parameters (D) in mouse primary hepatocytes incubated for 18 h with different concentrations of 5-CQA. Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post hoc test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Mean values with different lowercase letters show statistical differences between each other.

In case of 3,4-diCQA, OCR measurements showed no effect of this compound on basal and non-mitochondrial respiration as well as oxygen consumption associated with ATP production. However, values of the maximal respiration and spare respiratory capacity of primary hepatocytes significantly improved in the presence of 3,4-diCQA at all concentrations tested. The latter results demonstrated that mitochondrial oxidative capacity was enhanced in a similar manner to that exerted by 5-CQA (Figure 4A,B). Interestingly, 3,4-diCQA considerably increased glycolytic reserve (Figure 4C,D) which is a measure of cell capability to respond to an energy demand through glycolysis. In general, the data produced for 3,4-diCQA proved its positive effect on mitochondrial function in primary hepatocytes.

The last CQA-derivative tested, namely 4,5-diCQA, was shown to have less effects on mitochondrial respiration and glycolysis than the other two compounds. Of the five mitochondrial parameters examined, it only affected oxygen consumption associated with ATP production and non-mitochondrial respiration at the lowest concentration tested (5 $\mu\text{g/L}$), as seen in Figure 5A,B. Similarly, 4,5-diCQA hardly modified glycolytic parameters, except for a slight increase of glycolysis at 5 $\mu\text{g/L}$ (Figure 5C,D). In conclusion, the gathered results implied that 4,5-diCQA had little impact on mitochondrial function and could increase glycolysis at 5 $\mu\text{g/L}$ concentration in primary hepatocytes.



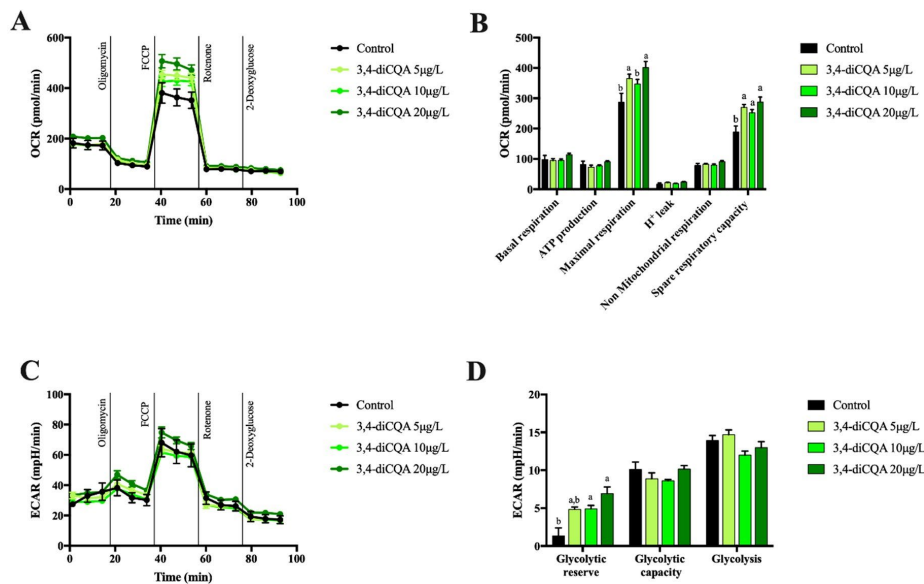


Figure 4. Oxygen consumption rate (OCR) (A), mitochondrial function parameters (B), extracellular acidification rate (ECAR) (C), and glycolytic parameters (D) in mouse primary hepatocytes incubated for 18 h with different concentrations of 3,4-diCQA. Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post hoc test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Mean values with different lowercase letters show statistical differences between each other.

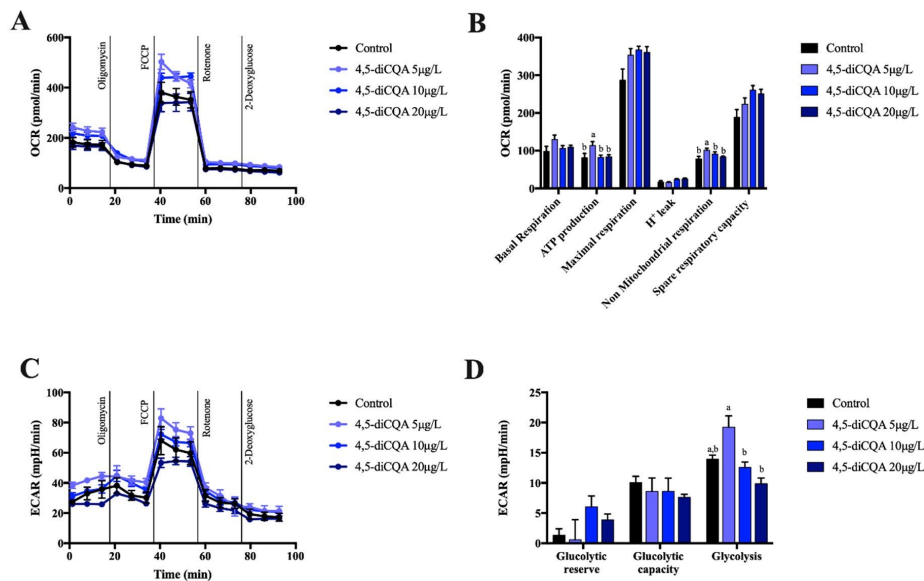


Figure 5. Oxygen consumption rate (OCR) (A), mitochondrial function parameters (B), extracellular acidification rate (ECAR) (C), and glycolytic parameters (D) in mouse primary hepatocytes incubated for 18 h with different concentrations of 4,5-diCQA. Each bar is the mean \pm SEM of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post hoc test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Mean values with different lowercase letters show statistical differences between each other.



1.1. Effect of 5-CQA, 3,4-diCQA or 4,5-diCQA on Fatty Acid Oxidation on Primary Hepatocytes

To evaluate the effect of test CQA-derivatives on fatty acid oxidation in primary hepatocytes, mitochondrial stress tests were performed in presence of BSA-conjugated palmitate, as the only substrate for oxidation, and increasing concentration of each compound. The most pronounced effects were observed for 3,4-diCQA that enhanced fatty acid oxidation both under basal and maximal respiration conditions at all concentrations tested (Figure 6B). 5-CQA was demonstrated to affect fatty acid oxidation under basal respiration conditions, as can be seen in Figure 6A. 4,5-diCQA was effective only at 20 µg/L concentration for which a rise of fatty acid oxidation was observed under both experimental conditions (Figure 6C). Altogether, the obtained results indicated that CQA-derivatives had different capacity to increase fatty acid oxidation in hepatocytes.

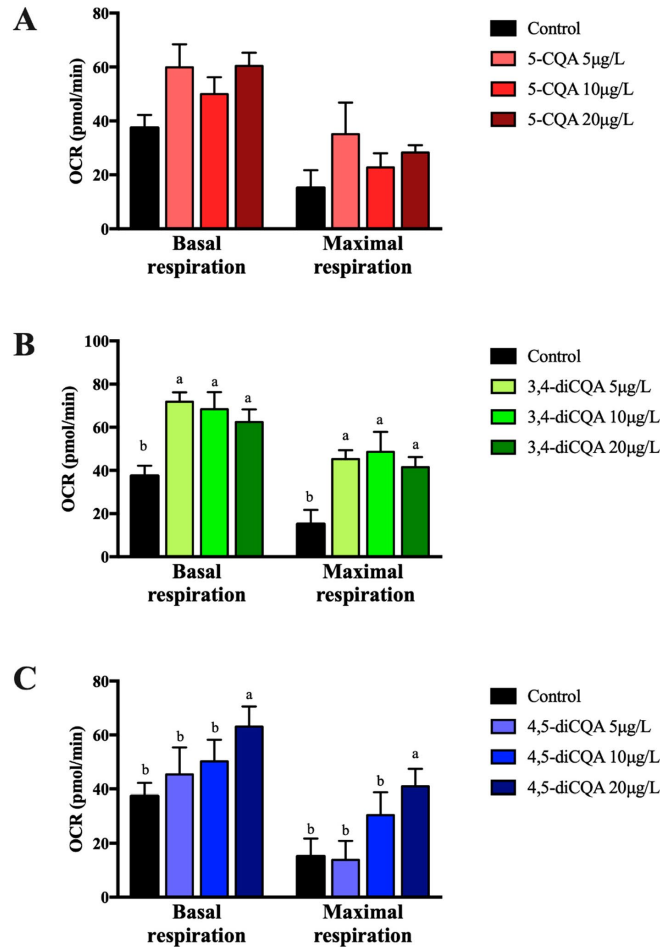


Figure 6. Oxygen consumption rate (OCR) using BSA-conjugated palmitate as a main substrate for oxidation to estimate fatty acid oxidation in mouse primary hepatocytes incubated for 18 h with the indicated concentrations of 5-CQA (A), 3,4-diCQA (B), and 4,5-diCQA (C). Each bar is the mean \pm SEM of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post hoc test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Mean values with different lowercase letters show statistical differences between each other.



1. Discussion

Purple sweet potatoes are known to be an excellent source of phenolic compounds that act as antioxidants. According to the root size classification applied in this work, PSP-L was found to have TPC levels comparable with those reported by Meng et al. [19] and Wang et al. [20] who determined the maximum phenolic concentration at 14.16 and 15.25 mg TPC/g DW (in S-3 variety), respectively. Interestingly, Mexican variety PSP-S not only had higher TPC than the values previously reported [21], but also it exceeded phenolic content of other edible roots and tubers, such as purple carrots (3.94 mg/g DW), Vitelotte-variety of purple potatoes (8.45 mg/g DW) [22], and P-3 variety of purple potatoes (10.02 mg TPC/g DW) [20].

As for CQA-derivatives content, our results indicated that their concentrations in PSP were higher than those found, for example, in purple-yellow carrot. Tiggiano carrots contained 5-CQA at 2.6 mg/g DW [23] while purple potatoes were reported to have 5-CQA at concentrations up to 12.5 mg/g DW [24]. Besides, the latter had low diversity of CQA-derivatives since approximately 90% of their phenolic content were represented by 5-CQA. Noteworthy, diverse structures of CQA-derivatives were present in PSP used in this study, and their concentrations were higher than that found in similar types of tubers. In consequence, the Mexican PSP-S variety seems to be a good source of TPC, in particular CQA-derivatives.

Since CQA-derivatives have been implied to play a role in many biological processes due to their antioxidant properties, our work focused on evaluation of their capacity to affect disturbed mitochondrial functions. This is especially relevant problem in a treatment of metabolic diseases such as obesity. Extracellular flux analysis allowed thorough measurements of mitochondrial oxidation parameters as well as cell glycolytic activity under basal and stressed conditions. We demonstrated that addition of 5-CQA or 3,4-diCQA increased the maximal respiration and the spare respiratory capacity in primary hepatocytes. Both parameters are indicative of the improved mitochondrial function. Another test compound, namely 3,4-diCQA, had a positive effect on hepatic capability to respond to an energy demand through glycolysis. On the other hand, 4,5-diCQA did not modify mitochondrial respiration and only increased glycolysis at the lowest concentration tested. Our data are consistent with those reported for CQA-derivatives and their metabolites extracted from chicory (*Cichorium intybus* L.), which were shown to promote increased mitochondrial respiration and cellular metabolism in rat hepatoma cells [25].

Based on these encouraging results of the current study, we propose the potential use of CQA-derivatives as auxiliary agents in the treatment of diseases involving mitochondrial dysfunction. The latter is caused partially by alterations in the electron transport chain, defects of electrical and chemical transmembrane potential, or reduction of critical metabolites [26].

The obtained data suggested that the presence of 5-CQA, and 3,4-diCQA could overcome disruptions in the electron transport chain, since it induced a higher increase on OCR with the use of FCCP, a potent uncoupling agent, that would be only possible with a functional electron transport chain. Besides, our results suggest that CQA-derivatives may not modify the function of the ATP synthase, also known as complex V, since CQA-derivatives did not modify the response in the presence of oligomycin, a well-known inhibitor of complex V, which remains to be evaluated in permeabilized and fully substrate-saturated cells. In addition, a limitation of our study, and a lack of information in the literature are regarding the moiety of CQA-derivatives, and the cellular proteins involved in the response. With this regard, Jackson et al. provided evidence that the caffeic acid moiety was important to maintain the effects on mitochondrial function [25].

As for proteins involved in the cellular response, we can speculate that AMPK may be implicated in this process. Zhang et al. [27] reported the activation of AMPK in the liver of hamsters following the addition of an extract rich in CQA-derivatives from *Pandanus tectorius*. Notably, AMPK modulates mitochondrial function at two levels. In the first place, AMPK activates peroxisome proliferator-activated receptor- γ co-activator 1 α (PGC1- α),



which in turn increases the activity of transcription factors involved in mitochondrial biogenesis [28]. Secondly, AMPK phosphorylates the mitochondrial fission factor (MFF) that regulates mitochondrial fission [29], i.e., a process that increases number of mitochondria. On the other hand, during stress insults such as nutrient deprivation, AMPK activation allows mitophagy of mitochondrial fragments without proper membrane potential [30]. Furthermore, other phenolic compound such as isoflavone genistein can activate AMPK leading to an increase in fatty acid oxidation [18]. Our results demonstrated that CQA-derivatives significantly increased hepatocytes capacity to oxidize fatty acids. We have previously observed that a rise in fatty acid oxidation improves hepatic steatosis in mice fed a high fat diet [31]. Therefore, further studies are required to fully address the role of CQA-derivatives in the improvement of this condition.

Due to their metabolic activity, mitochondria are the mayor source of reactive oxygen species (ROS) produced in the living cells. However, elevated levels of ROS can contribute to oxidative stress [32], which is the cause of lipid peroxidation, protein damage, and other pathological tissue changes associated with metabolic diseases, such as obesity, type 2 diabetes, as well as neurological disorders such as Alzheimer's and Parkinson, s diseases [33,34]. Recently, Jiang at al. have observed the protective role of CQA against H₂O₂-induced injury in SH-SY5 neuroblast cells through a mechanism that involved activation of endogenous antioxidant enzymes [35]. Thus, it is possible that the observed improvements of mitochondrial performance in our study could be attributed to the antioxidant properties of CQA-derivatives. In fact, a caffeoylquinic acid-rich fraction (CQAF) of *Periploca forrestii* decreased malondialdehyde (MDA) levels, a reactive aldehyde produced by lipid peroxidation, in rats treated with 125 to 500 mg/kg of CQAF [36]. Moreover, moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acid decreased MDA levels in healthy and Hypercholesterolemic subjects [37], highlighting the therapeutic potential of CQA-derivatives.

Mitochondrial dysfunction plays a significant role in the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) that includes hepatic steatosis, and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), which can progress to fibrosis and cirrhosis [38]. NAFLD is a common comorbidity of obesity, type 2 diabetes and metabolic syndrome. In fact, 53% of obese children and 65% of adults suffering from class I and II obesity are diagnosed with NAFLD [39,40]. Therefore, it could be speculated that CQA-derivatives, that we proved they acted on primary hepatocytes, have a potential to be used as nutritional supplements in NAFLD treatment. This hypothesis can be supported by the results reported for animal model of diet-induced obesity. Huang et al. [11] demonstrated that 5-CQA contributed to a decrease of free fatty acids levels in hepatocytes of rats fed a high-fat diet through modulation of transcription factors, such as PPAR α and liver X receptor α (LXR α), known for their involvement in lipid oxidation.

Finally, numerous studies have shown a scope of biological effects of CQA-derivatives extracts obtained from different sources, such as Asteraceae plants, blueberry, Kuding tea, Korean mountainous vegetables [41], to name a few. Among reported activities were inhibition of digestive enzymes [13], hypoglycemic effect through GLUT2 regulation in hepatic cells [12], reduction of body weight and blood lipids levels [42,43], modulation of lipid metabolism and intestinal microbiota in high-fat fed mice [44]. Our findings add to the list of biological roles played by CQA-derivatives in living cells, i.e., modulation of hepatic mitochondrial functions. Moreover, our in vitro study of hepatic cells is relevant to an organism as a whole, since absorption of CQA-derivatives by human organism has been already demonstrated [45]. Since each of the CQA-derivative tested in the present work demonstrated different effect on mitochondrial performance in a dose-dependent manner, it can be envisaged that the cumulative impact of several CQA-derivatives could enhance therapeutic effectiveness. Therefore, further research will focus on determining the dosage-effect relationship of a single CQA structure as well as a mixture of CQA-derivatives to achieve the desired biological response.



1. Materials and Methods

1.1. Plant Purchase, Processing, and Extraction of Phenolic Content

PSP were obtained from a commercial sample acquired at the main wholesale market in Mexico City (Central de Abastos, CDMX, Mexico) from the second winter harvest. The PSP lot was classified according to the size: large (PSP-L) those that weighed more than 1.0 kg, medium (PSP-M) those that weighed in a range 0.2–1.0 kg, and small (PSP-S) those that weighed less than 0.20 kg. Each tuberous root was cut into 0.5 cm thick pieces that were stored in paper bags at 80 °C in an ultra-freezer ELT-13V-85 A 30 (Thermo Scientific Revco, Waltham, MA, USA) prior usage. PSP slices were lyophilized using FreeZone lyophilizer 4.5 (Labconco, Kansas City, MO, USA), pulverized and sieved through 60 mesh size. The powder was stored for further use. The phenolic compounds were extracted by sonication in a model 8892 ultrasonic cleaner (100 W, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) at 40 °C for 20 min using 15 g of lyophilized PSP powder resuspended in 250 mL of solvent mixture consisting of acetone:water:lactic acid (40:60:1). The extract was then filtered through Whatman filter paper grade 4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

1.2. Quantification of Total Content of Phenolic Content

To determine the total phenolic content (TPC) in the samples, the method previously described by Taga et al. [46] was followed. In brief, 100 µL of the filtered extract were mixed with 2 mL of 2% Na₂CO₃ (*w/v*) and left to stand for 2 min. Following that time, 100 µL of Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reagent diluted with H₂O 1:1 was added and left to stand for 30 min. Next, the absorbance at 750 nm was measured using Cary 60 UV-Vis Agilent Technologies spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For calibration curve, a set of tannic acid standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) solutions was prepared at concentrations ranging from 0.03 mg/mL to 1.0 mg/mL. The phenolic compound content was determined by comparison with the standard calibration curve. The results were expressed as mg of TPC/g of PSP per DW. All tests were performed in triplicate.

1.3. Separation and Purification of CQA-Derivatives

To purify 5-CQA, 3,4- and 4,5-diCQA, firstly, the crude extract was concentrated under reduced pressure on a Rotavapor (Buchi, Flawil, Switzerland); secondly, dissolved in 50 mL of H₂O; thirdly, 150 mL of hexane was added, and the aqueous fraction was recovered; and finally, 150 mL of ethyl acetate was added, and the organic fraction (fraction enriched in CQA-derivatives) was recovered. Each of the CQA-derivatives was isolated by column chromatography using high-purity grade silica gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with a gradient elution of 50% hexane-methylene chloride, 100% methylene chloride, 50% methylene chloride-ethyl acetate, and 100% ethyl acetate. The characterization of the CQA-derivatives was carried out by HPLC-MS. The purity of the 5-CQA, 3,4- and 4,5-diCQA, was calculated by HPLC.

1.4. Identification of CQA-Derivatives

Identification of 5-CQA, 3,4- and 4,5-diCQA was determined using HPLC. Likewise, its presence was confirmed by an analysis of MS-HPLC, and they were compared with the retention time of commercial standards (5-CQA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 3,4- and 4,5-diCQA (Chengdu Biopurify Phytochemicals Lt, Chengdu, China). The HPLC analysis was performed on a Hypersil Gold C18 selectivity column 250 mm × 6 mm; 5 µm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using Waters system 1525 (Waters, Mildford, MA, USA) equipped with an autosampler Waters 2707 and dual UV-VIS detector Waters 2487 (320 nm). The binary mobile phase consisted of (A) water:acetonitrile:formic acid with a volume ratio of 89:10:1 and (B) acetonitrile delivered at a flow rate of 1.0 mL/min. The gradient of 3–25% B in 45 min, 30% B in 2 min (at 47 min) and 3% B in 9 min (at 56 min) was applied.



The characterization of CQA-derivatives (Table 1) was carried out using HPLC-MS. An Agilent 6410 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) Triple Quad LC/MS system was used, equipped with a G1311A binary pump, a G1316A thermostat column, and a G1367E auto-sampler with an electrospray ionization source (ESI). Separation was achieved using Hypersil-Gold column 250 mm×4.6 mm, 5 μm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 25 °C. The binary mobile phase consisted of (A) water:acetonitrile:formic acid at volume ratio of 89:10:1 and (B) acetonitrile delivered at a flow rate of 1.0 mL/min and gradient of 97–75% A in 45 min, 70% A in 1 min, and 97% A in 9 min. MS detection was performed using the negative ion mode, and spectra was registered for m/z between 200 and 2000. Other MS acquisition parameters were as follows: capillary voltage = 4000 V; nebulizer gas (nitrogen) = 50 psi; dry gas flow rate = 12 L/min; source heater dry gas temperature = 350 °C. The mass spectrometer was programmed to perform a full scan (MS), and zoom scans of the 353 and 515 m/z ions in the first scan (MS²). The ions were monitored with collision energy of 15 eV.

1.1. Quantification of 5-CQA, 3,4- and 4,5-diCQA

To prepare HPLC standard curves of each test compounds, 5-CQA, 3,4- and 4,5-diCQA were weighed out accurately and dissolved in 80% methanol (v/v) at concentration of 1 mg/mL. Standard solutions were prepared by a serial dilution of the stock solution in 80% methanol (v/v) to obtain the following concentrations: 0.20, 0.10, 0.05, 0.025 and 0.012 mg/mL. Standard curve equation and standard error of the regression corresponding to each CQA derivative were as follows:

$$y_{5\text{-CQA}} = 3E + 07x + 92229, R^2 = 0.997 \quad (1)$$

$$y_{3,4\text{-diCQA}} = 2E + 07x + 7745.2, R^2 = 0.998 \quad (2)$$

$$y_{4,5\text{-diCQA}} = 2E + 07x + 44069, R^2 = 0.998 \quad (3)$$

1.2. Primary Hepatocyte Cell Culture

To set up cell culture of mouse primary hepatocytes, male C57BL/6 mice in the 8–12 weeks age range were obtained from the Experimental Research Department and Animal Care Facility at the National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán (INCMNSZ). The Animal Care and Ethics Committee of the INCMNSZ approved all the procedures (approval number CICUAL-FNU-2002-20-22-1). Mouse primary hepatocytes were collected by in situ perfusion of the liver according to the method by Berry and Friend [47]. The procedure consisted of cannulating and exsanguinating the liver in vivo followed by a continuous perfusion with collagenase. Then, liver was isolated and placed in Hanks balanced salt solution (HBSS) to disaggregate the tissue. Cell suspension was filtered through a 70 μm mesh. Next, filtered cells were washed twice with HBSS and finally re-suspended in M199 medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% FBS, 1 μg/mL antibiotic, 0.1% BSA, 1 nM insulin, 100 nM dexamethasone and 100 nM triiodothyronine.

1.3. Mitochondria Function Evaluation

Primary hepatocytes were seeded into a XFe96 microplate at a density of 4000 cells/well. The medium was changed after 4 h to remove unattached cells. Cells were then incubated with 5-CQA, 3,4-diCQA, or 4,5-diCQA at a concentration of 5, 10 or 20 μg/L for 18 h. Mitochondrial function was evaluated by carrying out a mitochondrial stress test and using an extracellular flux analyzer XFe96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Briefly, cells were washed and incubated for 1 h in a non-CO₂ incubator with XF basal medium supplemented with 10 mM glucose, 1 mM pyruvate and 2 mM glutamine. For the experiment, 2 μM oligomycin, 1 μM FCCP, 1 μM rotenone/antimycin A and 50 mM of 2-deoxyglucose were sequentially injected, and three measurements were performed in basal conditions and after the addition of each compound. The experimental control were



basal medium-treated cells. OCR and ECAR measurements were obtained and analyzed following the recommendations of the manufacturer. Basal mitochondrial respiration, ATP-linked respiration, proton leak, maximal respiration, non-mitochondrial respiration, and spare respiratory capacity were then calculated based on the OCR values. Glycolysis, glycolytic reserve, and glycolytic capacity were calculated based on the ECAR values as previously described [16]. Briefly, basal mitochondrial respiration is calculated by subtracting the average OCR after rotenone/antimycin A injection from the average basal OCR; ATP-linked respiration is calculated by subtracting the average OCR after oligomycin injection from the average basal OCR; proton leak is calculated by subtracting the average OCR after rotenone/antimycin A injection from the average OCR after oligomycin injection; maximal respiration is calculated by subtracting the average OCR after rotenone/antimycin A injection from the average OCR after FCCP injection; non-mitochondrial respiration is the average OCR after rotenone/antimycin A injection, and spare respiratory capacity is calculated by subtracting the average basal OCR from the average OCR after FCCP injection. Glycolysis was calculated by subtracting the average ECAR after 2-deoxyglucose injection from the average basal ECAR; glycolytic reserve was calculated by subtracting the average basal ECAR from the average ECAR after oligomycin injection, and glycolytic capacity was calculated by subtracting the average ECAR after 2-deoxyglucose injection from the average ECAR after rotenone/antimycin A injection. To evaluate fatty acid oxidation (FAO), the mitochondrial stress test was performed in basal medium containing minimal concentration of glucose (0.5 mM), and carnitine (0.5 mM) and BSA-conjugate palmitate (170 μ M) as main substrate for oxidation. Basal and maximal respiration were calculated as described above. BSA-conjugated palmitate was prepared by dissolving sodium palmitate in a NaCl solution in a water bath at 60 °C, and the transferred to a BSA solution at 37 °C with constant agitation for 30 min to a final concentration of 1 mM of palmitate and 0.17 mM of BSA.

1.1. Statistical Analysis

The results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM), all the experiments were performed in triplicate and analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post hoc test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2. Conclusions

The present study demonstrated the inverse relationship between the size of purple sweet potato and CQA-derivatives content, with the highest concentration of these compounds found in PSP-S. In addition, caffeoylquinic acid derivatives, namely 5-CQA and 3,4-diCQA, were shown to modulate mitochondrial activity while 3,4-diCQA and 4,5-diCQA increased the hepatic cells capacity to perform glycolysis in response to energy demand. Finally, our results indicate that the test CQA have a potential to improve impaired mitochondrial function in hepatocytes and to increase fatty acid oxidation. Such alternations in mitochondrial activity typically led to hepatic steatosis during obesity, diabetes, and metabolic syndrome.

Author Contributions: Conceptualization, A.T., L.G.N., C.D.-P., A.R.T. and A.N.-O.; methodology, A.T., L.G.N. and A.N.-O.; software, A.T., L.G.N. and C.D.-P.; validation, L.G.N. and C.D.-P. and formal analysis, A.T., L.G.N. and A.N.-O.; investigation, A.T. and L.G.N.; resources, C.D.-P. and A.N.-O.; data curation, A.T., L.G.N., C.D.-P., A.R.T. and A.N.-O.; writing—original draft preparation, A.T. and L.G.N.; writing—review & editing, C.D.-P., A.R.T. and A.N.-O.; visualization, A.T., L.G.N. and A.N.-O.; supervision, C.D.-P. and A.N.-O.; project administration, C.D.-P., A.R.T. and A.N.-O.; funding acquisition, A.N.-O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by the CONACYT doctoral scholarship of Andrea Torres (scholarship number: 308249) and the project PAPIIT-UNAM-IT202318.



Declaration of Helsinki, and approved by the Animal Care and Ethics Committee of the INCMNSZ (approval number CICUAL-FNU-2002-20-22-1).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the CONACYT doctoral scholarship of Andrea Torres (scholarship number: 308249), the project PAPIIT-UNAM-IT202318, the members of the Fisiología de la Nutrición department for discussion and the technical support of Margarita Guzman and Sandra Tobón-Cornejo.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Loebenstein, G. Origin, distribution and economic importance. In *The Sweetpotato*, 1st ed.; Loebenstein, G., Thottappilly, G., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2009; pp. 9–12.
2. Wang, A.; Li, R.; Ren, L.; Gao, X.; Zhang, Y.; Ma, Z.; Ma, D.; Luo, Y. A comparative metabolomics study of flavonoids in sweet potato with different flesh colors (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *Food Chem.* **2018**, *260*, 124–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mu, T.; Sun, H.; Zhang, M.; Wang, C. Chapter 7-Chlorogenic acids from sweet potato. In *Sweet Potato Processing Technology*, 1st ed.; Mu, T., Sun, H., Zhang, M., Wang, C., Eds.; Academic Press: Cambridge MA, USA, 2017; pp. 357–403.
4. Zhao, J.G.; Yan, Q.Q.; Xue, R.Y.; Zhang, J.; Zhang, Y.Q. Isolation and identification of colourless caffeoyl compounds in purple sweet potato by HPLC-DAD-ESI/MS and their antioxidant activities. *Food Chem.* **2014**, *161*, 22–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Yoshimoto, M.; Yahara, S.; Okuno, S.; Islam, M.S.; Ishiguro, K.; Yamakawa, O. Antimutagenicity of mono, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 2336–2341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Clifford, M.N.; Jaganath, I.B.; Ludwig, I.A.; Crozier, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 1391–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Mahmood, N.; Moore, P.S.; De Tommasi, N.; De Simone, F.; Colman, S.; Hay, A.J.; Pizza, C. Inhibition of HIV infection by caffeoylquinic acid derivatives. *Antivir. Chem. Chemother.* **1993**, *4*, 235–240. [[CrossRef](#)]
8. dos Santos Pereira, A.; de Miranda Pereira, A.F.; Trugo, L.C.; de Aquino Neto, F.R. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian Propolis. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* **2015**, *58*, 590–593. [[CrossRef](#)]
9. Wianowska, D.; Gil, M. Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochem. Rev.* **2019**, *18*, 273–302. [[CrossRef](#)]
10. Santana-Gálvez, J.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. Chlorogenic Acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules* **2017**, *22*, 358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Huang, K.; Liang, X.; Zhong, Y.; He, W.; Wang, Z. 5-Caffeoylquinic acid decreases diet-induced obesity in rats by modulating PPAR α and LXR α transcription. *J. Sci. Food. Agric.* **2015**, *95*, 1903–1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Huang, W.; Yao, L.; He, X.; Wang, L.; Li, M.; Yang, Y.; Wan, C. Hypoglycemic activity and constituents analysis of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit extracts. *Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2018**, *11*, 357–366. [[CrossRef](#)]
13. Spínola, V.; Castilho, P.C. Evaluation of *Asteraceae* herbal extracts in the management of diabetes and obesity. Contribution of caffeoylquinic acids on the inhibition of digestive enzymes activity and formation of advanced glycation end-products (*in vitro*). *Phytochemistry* **2017**, *143*, 29–35. [[CrossRef](#)]
14. Ong, K.W.; Hsu, A.; Tan, B.K.H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by AMPK activation. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1341–1351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wan, C.W.; Wong, C.N.Y.; Pin, W.K.; Wong, M.H.Y.; Kwok, C.Y.; Chan, R.Y.K.; Yu, P.H.F.; Chan, S.W. Chlorogenic acid exhibits cholesterol lowering and fatty liver attenuating properties by up-regulating the gene expression of PPAR- α in hypercholesterolemic rats induced with a high-cholesterol diet. *Phytother. Res.* **2013**, *27*, 545–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Van den Bossche, J.; Baardman, J.; de Winther, M.P. Metabolic characterization of polarized M1 and M2 bone marrow-derived macrophages using real-time extracellular flux analysis. *J. Vis. Exp.* **2015**, *28*, 53424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Leal-Díaz, A.M.; Noriega, L.G.; Torre-Villalvazo, I.; Torres, N.; Alemán-Escondrillas, G.; López-Romero, P.; Sánchez-Tapia, M.; Aguilar-López, M.; Furuzawa-Carballeda, J.; Velázquez-Villegas, L.A.; et al. Aguamiel concentrate from *Agave salmiana* and its extracted saponins attenuated obesity and hepatic steatosis and increased *Akkermansia muciniphila* in C57BL6 mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34242. [[CrossRef](#)]
18. Palacios-González, B.; Vargas-Castillo, A.; Velázquez-Villegas, L.A.; Vasquez-Reyes, S.; López, P.; Noriega, L.G.; Aleman, G.; Tovar-Palacio, C.; Torre-Villalvazo, I.; Yang, L.J.; et al. Genistein increases the thermogenic program of subcutaneous WAT and increases energy expenditure in mice. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *68*, 59–68. [[CrossRef](#)]
19. Meng, X.-j.; Tan, C.; Feng, Y. Solvent extraction and *in vitro* simulated gastrointestinal digestion of phenolic compounds from purple sweet potato. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2019**, *54*, 2887–2896. [[CrossRef](#)]



20. Wang, H.; Yang, Q.; Gao, L.; Gong, X.; Qu, Y.; Feng, B. Functional and physicochemical properties of flours and starches from different tuber crops. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *148*, 324–332. [\[CrossRef\]](#)
21. Zhang, H.; Liu, R.; Tsao, R. Anthocyanin-rich phenolic extracts of purple root vegetables inhibit pro-inflammatory cytokines induced by H₂O₂ and enhance antioxidant enzyme activities in Caco-2 cells. *J. Funct. Foods* **2016**, *22*, 363–375. [\[CrossRef\]](#)
22. Kita, A.; Bakowska-Barczak, A.; Hamouz, K.; Kulakowska, K.; Lisńska, G. The effect of frying on anthocyanin stability and antioxidant activity of crisps from red- and purple-fleshed potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *32*, 169–175. [\[CrossRef\]](#)
23. Scaramo, A.; Gerardi, C.; D'Amico, L.; Accogli, R.; Santino, A. Phytochemical analysis and antioxidant properties in colored Tiggiano carrots. *Agricoltura* **2018**, *8*, 102. [\[CrossRef\]](#)
24. Burgos, G.; Amorós, W.; Muñoz, L.; Sosa, P.; Cayhualla, E.; Sánchez, C.; Díaz, C.; Bonierbale, M. Total phenolic, total anthocyanin and phenolic acid concentrations and antioxidant activity of purple-fleshed potatoes as affected by boiling. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *30*, 6–12. [\[CrossRef\]](#)
25. Jackson, K.M.F.; Rathinasubapathy, T.; Esposito, D.; Komaromyky, S. Structural constraints and importance of caffeic acid moiety for anti-hyperglycemic effects of caffeoylquinic acids from chicory. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1601118. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Nicolson, G.L. Mitochondrial dysfunction and chronic disease: Treatment with natural supplements. *Integr. Med.* **2014**, *13*, 29–43.
27. Zhang, X.; Wu, C.; Wu, H.; Sheng, L.; Su, Y.; Zhang, X.; Luin, H.; Sun, G.; Sun, X.; Tian, Y.; et al. Anti-hyperlipidemic effects and potential mechanisms of action of the caffeoylquinic acid-rich *Passiflora tectorius* fruit extract in hamsters fed a high fat-diet. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e69022. [\[CrossRef\]](#)
28. Cantó, C.; Carlier-Hiras, Z.; Feige, J.N.; Lagarde, M.; Noriega, L.; Milne, J.C.; Elliott, P.; Puigserver, P.; Auwerx, J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **2009**, *458*, 1056–1060. [\[CrossRef\]](#)
29. Toyama, E.Q.; Hertzog, S.; Croucher, J.; Lewis, T.L., Jr.; Losin, O.C.; Hellberg, K.; Young, N.R.; Chen, H.; Pothous, P.; Chan, D.C.; et al. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission. *Science* **2016**, *351*, 275–281. [\[CrossRef\]](#)
30. Hertzog, S.; Shaw, R.J. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 121–135. [\[CrossRef\]](#)
31. Zamora-López, K.; Noriega, L.G.; Estanes-Herrández, A.; Escalona-Núñez, I.; Tubón-Cornejo, S.; Tovar, A.R.; Barbero-Becerra, V.; Pérez-Monter, C. *Perilla frutescens* L.-derived omega-5 nanoemulsion improves hepatic steatosis in mice fed a high fat diet by increasing fatty acid utilization in hepatocytes. *Sel. Rep.* **2020**, *10*, 15229. [\[CrossRef\]](#)
32. Betteridge, D.J. What is oxidative stress? *Metab. Clin. Exp.* **2008**, *48*, 3–8. [\[CrossRef\]](#)
33. Bhatti, J.S.; Bhatti, G.K.; Reddy, P.H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 1066–1077. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Simon, H.U.; Haj-Yehia, A.; Levi-Straucher, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **2002**, *5*, 415–418. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Jiang, X.W.; Bai, J.P.; Zhang, Q.; Hu, X.L.; Tian, X.; Zhu, J.; Liu, J.; Meng, W.H.; Zhao, Q.C. Caffeoylquinic Acid Derivatives Protect SH-SY5Y Neuroblastoma Cells from Hydrogen Peroxide-Induced Injury Through Modulating Oxidative Status. *Crit. Mol. Neurobiol.* **2017**, *37*, 489–509. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Liu, T.; Wang, X.; He, Y.L.; Wang, Y.; Deng, L.; Ma, X.; Zheng, L.; Liu, C.H.; Wang, G.C.; Zheng, J.; et al. In Vivo and In Vitro anti-arthritis effects of cardenolide-rich and caffeoylquinic acid-rich fractions of *Periplaneta formosii*. *Molecules* **2018**, *23*, 1988. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Martínez-López, S.; Sorriá, B.; Mateos, R.; Bravo-Clemente, L. Moderate consumption of a soluble green/roasted coffee rich in caffeoylquinic acids reduces cardiovascular risk markers: Results from a randomized, cross-over, controlled trial in healthy and hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 865–878. [\[CrossRef\]](#)
38. Reetor, R.S.; Thyfault, J.P.; Wei, Y.; Ibdah, J.A. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: An update. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14*, 185–192. [\[CrossRef\]](#)
39. Fabbrini, E.; Sullivan, S.; Klein, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **2010**, *51*, 679–689. [\[CrossRef\]](#)
40. Tomiyama, K.; Fujimoto, E.; Suzuki, K.; Hayashi, M.; Ichikawa, M.; Inaba, Y. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in children and relationship to metabolic syndrome, insulin resistance, and waist circumference. *Environ. Health Prev. Med.* **2009**, *14*, 142–149. [\[CrossRef\]](#)
41. Nagubo, A.; Kim, K.H.; Lee, K.R.; Alan, M.B.; Choi, J.S.; Kim, W.B.; Park, H.J. Qualitative and quantitative determination of the caffeoylquinic acids on the Korean mountainous vegetables used for Chwinamal and their peroxynitrite-scavenging effect. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 1361–1367. [\[CrossRef\]](#)
42. Che, Y.; Wang, Z.; Zhu, Z.; Ma, Y.; Zhang, Y.; Gu, W.; Zhang, J.; Rao, G. Simultaneous qualification and quantitation of chlorogenic acids in Kuding tea using ultra-high-performance liquid chromatography-diode array detection coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometer. *Molecules* **2016**, *21*, 1728. [\[CrossRef\]](#)
43. Fan, S.; Zhang, Y.; Hu, N.; Sun, Q.; Ding, X.; Li, G.; Zheng, B.; Gu, M.; Huang, F.; Sun, Y.Q.; et al. Extract of kuding tea prevents high-fat diet-induced metabolic disorders in C57bl/6 mice via liver x receptor (LXR) β antagonism. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31007. [\[CrossRef\]](#)
44. Xie, M.; Chen, G.; Wan, P.; Dai, Z.; Zeng, X.; Sun, Y. Effects of Dicafeoylquinic Acids from Ilex kudingcha on Lipid Metabolism and Intestinal Microbiota in High-Fat-Diet-Fed Mice. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 171–183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



45. Erk, T.; Renoul, M.; Williamson, G.; Mekber, B.; Stelling, H.; Richling, E. Absorption and isomerization of caffeoylquinic acids from different foods using ileostomist volunteers. *Eur. J. Nutr.* **2004**, *33*, 179–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tago, M.S.; Miller, E.E.; Pratt, D.E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61*, 928–931. [[CrossRef](#)]
47. Berry, M.N.; Friend, D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.* **1969**, *43*, 506–520. [[CrossRef](#)]

