



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
FENOLES Y ANTOCIANINAS TOTALES
PRESENTES EN HOJAS MORADAS DE *IPOMOEA*
BATATAS, ASÍ COMO SU DETERMINACIÓN DE
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

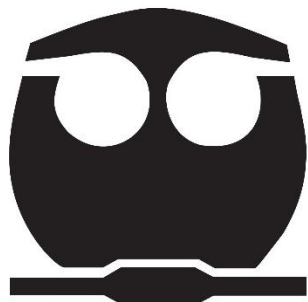
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

DÍAZ LUNA TANIA



CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Hugo Rubén Carreño Ortiz

VOCAL: Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

SECRETARIO: Profesor: Arturo Navarro Ocaña

1er. SUPLENTE: Profesor: Eva Patricia Bermúdez García

2° SUPLENTE: Profesor: Tania Gómez Sierra

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA CONJUNTO E,
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, LABORATORIO 321.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Arturo Navarro Ocaña

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C. Andrea Torres Alcalá

SUSTENTANTE

Tania Díaz Luna

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de química.

Al apoyo económico del proyecto PAPIIT-UNAM IN220015.

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	4
3.1 Historia del camote (<i>Ipomoea batatas</i>) y su extensión por el mundo.....	4
3.2 Planta de camote (<i>Ipomoea batatas</i>).....	5
3.3 Cultivo y producción de <i>Ipomoea batatas</i>	7
3.4 Valor nutricional de raíz tuberosa y hojas.....	10
3.5 Principales compuestos bioactivos presentes en hojas moradas de <i>Ipomoea batatas</i>	13
3.5.1 Compuestos fenólicos.....	13
3.5.1.1 Ácidos fenólicos presentes en hojas moradas de <i>Ipomoea batatas</i>	14
3.5.1.2 Flavonoides presentes en hojas moradas de <i>Ipomoea batatas</i>	17
3.5.1.3 Antocianinas presentes en hojas moradas de <i>Ipomoea batatas</i>	18
3.6 Actividad antioxidante	22
3.6.1 Métodos asociados a la medición de actividad antioxidante.....	23
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	25
5.1 Objetivo general	
5.2 Objetivos particulares	
6. Procedimiento experimental	26
6.1 Reactivos y equipo	26
6.2 Etapa 1. Selección de hojas moradas por regiones productoras de camote en México y su método de secado.....	28

6.3 Etapa 2. Cuantificación de fenoles, antocianinas totales y determinación de actividad antioxidante.....	29
6.3.1 Método Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales.....	29
6.3.2 Método pH-diferencial para la cuantificación de antocianinas totales.....	30
6.3.3 Método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH).....	31
6.3.4 Método 2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS).....	32
6.4 Etapa 3. Identificación de ácidos fenólicos y antocianinas en hojas moradas de <i>Ipomoea batatas</i>	33
6.5 Análisis estadístico.....	34
7. Resultados y discusión	35
7.1 Etapa 1. Selección de hojas moradas por región productora de camote en México y estandarización del método e secado.....	35
7.2 Etapa 2. Cuantificación de fenoles, antocianinas totales y determinación de actividad antioxidante.....	37
7.2.1 Cuantificación de fenoles totales	37
7.2.2 Cuantificación de antocianinas totales.....	40
7.2.3 Determinación de actividad antioxidante por DPPH y ABTS.....	45
7.2.3.1 Medición del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH).....	45
7.2.3.2 Medición del radical 2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico](ABTS).....	49
7.3 Etapa 3. Identificación de ácidos fenólicos y antocianinas en hojas moradas de <i>Ipomoea batatas</i>	52
7.3.1 Identificación de ácidos fenólicos por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	52
7.3.2 Identificación de antocianinas por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	56

8. Conclusiones	62
9. Bibliografía	63
10. Anexos	71
Anexo I. Fundamento Folin-Ciocalteu para la medición de fenoles totales	
Anexo II. Fundamento pH-diferencial para la medición de antocianinas totales	
Anexo III. Fundamento DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil)	
Anexo IV. Fundamento ABTS (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico])	
Anexo V. Análisis estadístico para el método de secado	
Anexo VI. Curva de ácido tánico y análisis estadístico de fenoles	
Anexo VII. Análisis estadístico de antocianinas	
Anexo VIII. Curva de Trolox para DPPH	
Anexo IX. Curva de Trolox para ABTS	

1. RESUMEN

Ipomoea batatas Lam es una planta la cual se ha utilizado como alimento desde la antigüedad ya que sus raíces son engrosadas (camote) y comestibles, pertenece a la familia Convolvulacea [León, 1989].

El camote es un alimento de alto valor nutricional, contiene grandes cantidades de carbohidratos en forma de almidón así como vitaminas y minerales. También son utilizadas las hojas de esta planta y en diversas partes del mundo como China y Japón son consumidas como quelites o como infusión debido a su alto valor nutricional [Taira J, 2013].

Ciertos estudios enfocados a la raíz tuberosa han demostrado la presencia de compuestos bioactivos tales como fenoles, alcaloides, cumarinas, flavonoides, β -caroteno, ácido ascórbico, triterpenos y antocianinas [Emejule V, 2013]. Estos compuestos también se encuentran en toda la planta de *Ipomoea batatas*, tal es el caso de las hojas las cuales presentan principalmente compuestos fenólicos y antocianinas con excelentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo cual ofrece beneficios a la salud al prevenir enfermedades cardiovasculares, pues combaten la generación de radicales libres, ya que estos son capaces de atraparlos [Benzie, 2014].

El presente trabajo tuvo como finalidad analizar hojas moradas de diferentes regiones productoras de camote en México, se cuantificó por espectrofotometría fenoles y antocianinas totales, así como la identificación de estos compuestos por cromatografía en capa fina y por tiempos de retención en el HPLC y se determinó la actividad antioxidante.

Para alcanzar los objetivos se seleccionaron 22 muestras de hojas de *Ipomoea batatas* en función de la presencia de una coloración morada, de estas se eligieron

cinco con la mayor concentración de fenoles y antocianinas, para la identificación y perfil de los fenoles coloridos y no coloridos así como la determinación de actividad antioxidante por métodos in vitro (DPPH y ABTS).

Las hojas JC149, JC177, JC 172, JC83 y PRF123 fueron las que presentaron la cuantificación de antocianinas y fenoles totales más alta de las 22 muestras. La muestra FPR123 presento el valor más alto en antocianinas totales (3.12 mg AT/g muestra BS y 118.78 mg FT/g muestra BS) y la JC172 en fenoles totales (157.09 mg FT/g muestra BS y 1.60 mg AT/ g muestra BS).

Se identificó la presencia de antocianinas aciladas como Peonidina3-(cafeoil-p-hidroxibenzoil soforosido)-5-glucosido y algunos ácidos fenólicos como 3,5-di-O-cafeoil-quínico (VI).

Las muestras presentaron una alta actividad antioxidante al compararla con el Trolox, por el método de DPPH el extracto de la muestra JC177 tuvo un IC_{50} de 0.0030mg/g inferior al trolox, mientras que por el método ABTS el extracto PRF123 fue la muestra que obtuvo el IC_{50} bajo con 0.0232mg/g, estas muestras presentaron valores inferiores a la muestra de referencia (Trolox) lo cual indica una buena actividad.

2. INTRODUCCIÓN

Se sabe que América central y México son el centro de origen del camote (*Ipomoea batatas*) ya que existe una mayor diversidad genética, su extensión por el mundo fue posible debido al comercio; que llegó a África por comerciantes portugueses en el siglo XVI, luego se extendió hacia la India y China [Stathers *et al.* 2013].

Es uno de los cultivos más antiguos y valiosos, de gran importancia económica, es de fácil propagación ya que requiere de pocos insumos, como agua, fertilizantes y su habilidad de crecer a temperaturas altas. En México se siembran diversas variedades de camote en dos ciclos: el de primavera- verano y el de otoño- invierno. Las variedades sembradas son los de pulpa blanca, amarilla, naranja, rojiza o purpura [González *et al.* 2001], con gran contenido de compuestos bioactivos.

Tanto la raíz como las hojas en su variedad morada son una fuente natural de compuestos bioactivos, como son los fenoles, alcaloides cumarinas, flavonoides, ácido ascórbico, triterpenos y antocianinas aciladas [Mohanraj, 2014].



Figura 1. Hojas de camote

Los compuestos fenólicos así como las antocianinas son beneficiosas en la prevención de enfermedades cardiovasculares, ya que presentan una actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinógenas, antidiabéticas y hepatoprotectoras [Cipriano *et al.* 2015]. El alto índice de enfermedades cardiovasculares en ocasiones se debe al estrés oxidativo, proceso en el cual hay una gran generación de radicales libres [Benzie, 2014]. Una manera de combatir los radicales libres es consumiendo compuestos bioactivos que sean capaces de atraparlos, como son la vitamina C, vitamina E, los carotenoides, flavonoides y antocianinas, siendo estas últimas encontradas en el camote y hojas moradas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Historia del camote (*Ipomoea batatas*) y su extensión por el mundo

El nombre de camote (*Ipomoea batatas*), es una palabra de origen nahuatl que designa en especial a una planta rastrera y sus raíces tuberosas voluminosas y feculentas, llamada también “camotli” por los aztecas [Munguía, 2001].

Es una de las raíces que más usaron los indígenas de América desde la más lejana antigüedad por haber sido artículo de primera necesidad y constituyó uno de los alimentos base para la población indígena de México y otros países de Sudamérica. [Martínez, 2006].

Se sabe que es nativo de los bosques tropicales y que ya se cultivaba en América Central, México y Sudamérica hace más 5,000 años.

A la llegada de los españoles a América, el camote era cultivado ampliamente y fue llevado por los incas al triángulo polinésico (Nueva Zelanda, Isla Pascua y Hawái) desde tiempos precortesianos. [Martínez, 2006].

No era conocido en Europa, África y Asia. Los españoles lo llevaron de México a Filipinas. Los portugueses lo introdujeron a sus colonias de África y Asia. Los chinos lo obtuvieron de Filipinas en 1594. El camote entro a Japón en 1698 y ahora es un cultivo que ocupa el segundo lugar en producción [Contreras, 2001]

Estudios realizados por Dapeng Zhang y colaboradores mostró un patrón geográfico, revelando la mayor diversidad genética en América Central y menor diversidad en Perú y Ecuador. Estos resultados apoyan la hipótesis de que Centroamérica es el centro primario de diversidad del camote y la región sudamericana debería considerarse un centro secundario [Linares, 2008].

A nivel mundial hay más de 600 especies del género *Ipomoea*: 13 de ellas se encuentran en la sección de batatas. De estas especies el camote es el único que se cultiva y todas son nativas de América [Stathers *et al.* 2013]. Existen numerosas variedades criollas, mejoradas y nombradas, cuyo germoplasma no está representado en los diversos bancos nacionales.

3.2 Planta de camote (*Ipomoea batatas*)

Es una planta perenne que al cultivarse se comporta como anual, produce guías con tallos rastreros o trepadores que al alcanzar una longitud de unos cinco metros con látex en todos sus órganos. La raíz tuberosa se engruesa como órgano de almacenamiento de reserva, se forman de los nódulos de los tallos como raíces. Por lo general una planta puede producir 10 camotes aproximadamente que se localizan en los primeros 20 cm de profundidad del suelo [Leon, 1989]

Tabla 1. Clasificación científica de *Ipomoea batatas*

Clasificación científica	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Convolvaceae
Genero	<i>Ipomoea</i>
Especie	<i>Ipomoea batatas</i>

La planta es por lo general de hábito rastrero con tallos que se extienden horizontalmente sobre el suelo desarrollando un follaje relativamente bajo. Se pueden diferenciar cuatro tipos generales de plantas: erectas, semierectas, extendidas y muy extendidas.

- **Partes de la planta:**

Raíz tuberosa: Puede ser fusiforme o globulares con cascara lisa de 12 a 20 cm de largo, con el color del peridérmo o cascara blanco, amarillo, naranja, rojo o morado y la pulpa de color blanco amarillo, anaranjado, rojizo o morado [Cook, 2009].



Figura 2. Diferentes variedades de camote

Tallos: Los tallos aéreos varían en cuanto a coloración y forma pues pueden ser cilíndricos o aristados, largos de tres a diez centímetros de diámetro y pueden ser de color verde claro o morado [Contreras, 2001].

Hojas: Son muy variables, incluso en la misma planta dependiendo de la edad de estas, son alternas acorzadas, onduladas, enteras o divididas de 3 a 7 lóbulos [Contreras, 2001].

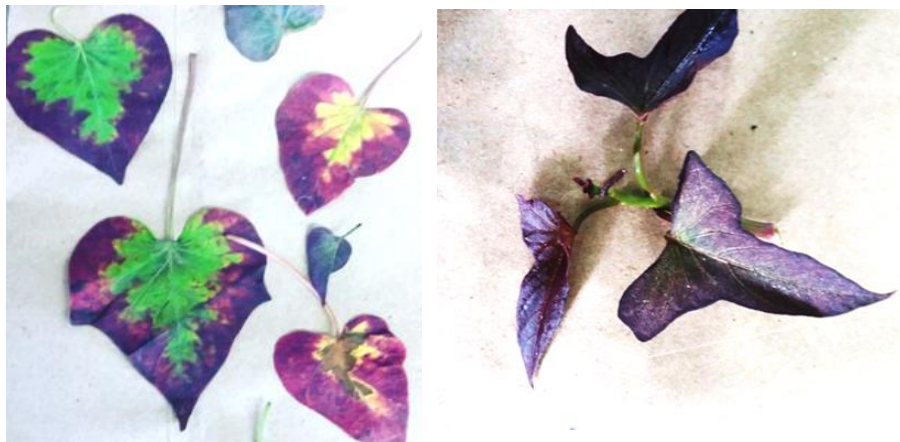


Figura 3. Hojas moradas de camote, en sus diferentes formas

Flores: Se producen en pedúnculos axilares en grupos umbeliformes, el cáliz tiene cinco divisiones y una longitud de 1 a 1.5 cm; la corola es campanulada de 2.5 a 5 cm, y con un diámetro de 2.5 a 4 cm, y color purpura, siendo este más intenso en la base y más claro en los márgenes [Contreras, 2001].



Figura 4. Flor de camote

Fruto: Es una capsula de 5 a 8 mm de diámetro, que puede contener más de cuatro semillas pero que solamente una o dos llegan a desarrollarse. Las semillas son negras, lisas de 3 mm de largo, y de cubierta muy dura [Campbel, 2003].



Figura 5. Fruto de la planta *Ipomoea batatas*

3.3 Cultivo y producción de *Ipomoea batatas*

El camote (*Ipomoea batatas*) tiene escasas exigencias ambientales es de simple manejo, agronómico y puede dar buenos rendimientos, de entre 20 y 30 toneladas por hectárea, aun en terrenos de mediana calidad [Linares, 2008]. Como es una

planta tropical, no tolera las heladas, pero es sumamente rustica, resistente a las sequias. Las hojas de camote pueden ser cosechadas varias veces al año, su rendimiento es mucho más alto que otros vegetales de hojas verde [An, 2003], las hojas de camote son más tolerantes a enfermedades, pestes y altas condiciones de húmeda; constituyen una fuente alternativa de vegetales de hojas verde durante y fuera de temporada [Taira, 2013].

La importancia económica del cultivo de *Ipomoea batatas* en el mundo puede compararse con la de arroz, trigo o maíz [Shekhar *et al*, 2015].

El camote es el séptimo cultivo más importante en el mundo [Montilla, 2010]. Con una producción mundial de unos 150 millones de toneladas cultivadas en 15 millones de hectáreas. China es el principal productor; responsable de alrededor del 80% de ese volumen, registrando cosechas de hasta 13 millones de toneladas al año en el sureste asiático y de 6 millones de toneladas en África y Oceanía. En Japón el camote es el segundo cultivo en importancia. En México se siembran cerca de 3000 hectáreas y se cosechan alrededor de 50 000 toneladas por año [Basurto, 2015].

Tabla 2. Países y regiones productoras de *Ipomoea batatas* [Basurto, 2015].

Países y regiones productoras de <i>Ipomoea batatas</i>	
País	Producción (millones t año ⁻¹)
China	120
Sureste asiático	13.0
África	6.0
Oceanía	6.0
América	2.9
EUA	0.7
Japón	1.5
Nueva Zelanda	0.6
México	0.05

En México el camote se planta prácticamente en todos los estados de la república con una producción aproximada de 61 098 toneladas en 2 908 hectáreas [SAGARPA, 2010]. Se siembran variedades con pulpa blanca, amarilla, naranja, rojiza o purpura.

Se produce principalmente en la zona centro-sur de la costa del Golfo de México, en algunos puntos de la costa occidental del Pacífico, en la península de Yucatán, en la región del bajo y en los estados de Oaxaca y Chiapas.

Los estados de Michoacán y Guanajuato ubicados en la región del bajo, son los principales productores con 10 756 y 27 328 toneladas por hectárea.



Figura 6. Estados productores de camote en México

3.4 Valor nutricional de la raíz tuberosa y hojas

En general los nutrientes de las variedades del camote son similares, es un alimento que aporta energía gracias a su alto contenido de almidón (alrededor del 80% en base seca). La amilosa representa el 34.16% del almidón y tiene un 3.8% de azúcar total. Tienen poca proteína (1.3% aproximadamente) y bajo contenido graso, contiene una cantidad apreciable de agua cerca del 69% del camote es agua [Wang, Nie and Zhu, 2016]. El contenido de aminoácidos esta balanceado, con un mayor porcentaje de lisina pero un contenido limitado de leucina.

El camote naranja y amarillo tiene un alto contenido de beta carotenoides. Además de ser energético, el camote amarillo es especialmente importante por la cantidad de vitamina A y C, así como potasio y hierro.

El camote de pulpa morada es rico en antocianinas, sustancia de gran capacidad antioxidante, valor vitamínico y proteico superior al de la papa, contiene vitamina B6 y vitamina E.

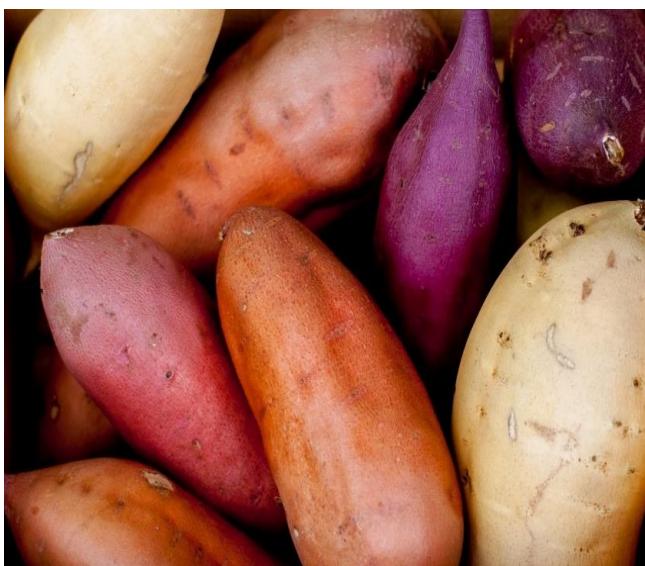


Figura 7. Camote naranja, morado y blanco [https://godshealingplants.files.wordpress.com/2013/11/dsc_0117-2.jpg]

Mientras que el camote blanco es la variedad que menor cantidad de proteína (0.80 g), sin embargo aporta un mayor contenido de carbohidratos (77.3 g) en comparación al naranja y morado.

A continuación en la tabla 3 se mostrara el valor nutricional de tres variedades de camote.

Tabla 3. Valor nutricional del camote morado, anaranjado y blanco, por cada 100g en base seca.

Parámetro	Camote morado	Camote anaranjado	Camote blanco
Calorías	114Kcal	105 Kcal	109Kcal
Carbohidratos	63.10 g	61.45 g	77.3 g
Proteína	1.10 g	1.20 g	0.80 g
Fibra	0.67 g	1.20 g	0.80 g
Lípidos	0.52 g	0.20 g	0.10 g
Fosforo	45.50 mg	55 mg	40.0 mg
Calcio	73.30 mg	68.0 mg	60.0 mg
Magnesio	27.20 mg	26.60 mg	25.50
Sodio	26.20 mg	22.30 mg	21.40
Hierro	0.60 mg	1.70 mg	2.10 mg
Zinc	308 mg	270 mg	245 mg
Potasio	457mg	337mg	353mg
Vitamina K	1.80 mg	-	-
Vitamina C	2.40 mg	25 mg	29 mg
Vitamina A	0.71 mg	667 UI	10 mg
Vitamina B3	0.60 mg	52 mg	-
Vitamina B6	0.30 mg	-	-
Vitamina E	2.89 mg	1.39 mg	1.20 mg
Vitamina B1	88 µg	128 µg	53 µg
Vitamina B2	248 µg	254 µg	238 µg

[Olayiwola, 2009; Linares, 2008; Wang, Nie and Zhu, 2016 y
<http://www.composicionnutricional.com/alimentos/CAMOTE-MORADO-5>]

Las hojas del camote son consumidas en muchas partes del mundo, en especial en países asiáticos [Chunying *et al*, 2013] siendo estas muy nutritivas. Contiene cantidades apreciables de proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda, ceniza y carbohidratos.

Además, las hojas pueden ser transformadas en una gran variedad de comidas, bebidas y alimentos funcionales. Se sabe que las hojas son ricas en nutrientes y micronutrientes [Islam, 2014]. Tiene una mayor cantidad de vitaminas, minerales y nutrientes que otras hojas comestibles como las espinacas.

Tabla 4. Valor nutricional de hojas de camote en base seca.

<i>Parámetro</i>	<i>Contenido por cada 100 g</i>
<i>Carbohidratos</i>	51.95 g
<i>Fibra</i>	11.75 g
<i>Proteína</i>	17.40 g
<i>Lípidos</i>	3.70 g
<i>Magnesio</i>	220.20 mg
<i>Fósforo</i>	131.10 mg
<i>Calcio</i>	229.70 mg
<i>Hierro</i>	21.80 mg
<i>Magnesio</i>	10.90 mg
<i>Potasio</i>	479.30 mg
<i>Zinc</i>	3.2 mg
<i>Vitamina C</i>	62.7 mg
<i>Vitamina A</i>	0.67 mg
<i>Vitamina B1</i>	53 mg
<i>Vitamina B2</i>	248 µg
<i>Vitamina E</i>	1.38 mg
<i>Niacina</i>	856 µg

[Wang, Nie and Zhu, 2016]

3.5 Principales compuestos bioactivos presentes en hojas moradas de *Ipomoea batatas*

Se ha reportado que las hojas de *Ipomoea batatas* posee compuestos bioactivos como antocianinas, ácidos clorogénicos, triterpenos, cumarinas y alcaloides, que son metabolitos secundarios responsables de proteger y prevenir enfermedades a largo plazo si su ingesta es frecuente. Por lo cual las hojas de camote pueden entrar en la categoría de alimento funcional al aportar no solo nutrientes sino también compuestos bioactivos los cuales tienen efectos farmacológicos que modulan funciones terapéuticas [Roberfroid, 1999].

3.5.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas de *Ipomoea batatas*, pueden ser clasificadas en varios grupos. Los principales compuestos presentes en la planta de camote son los ácidos fenólicos y flavonoides.

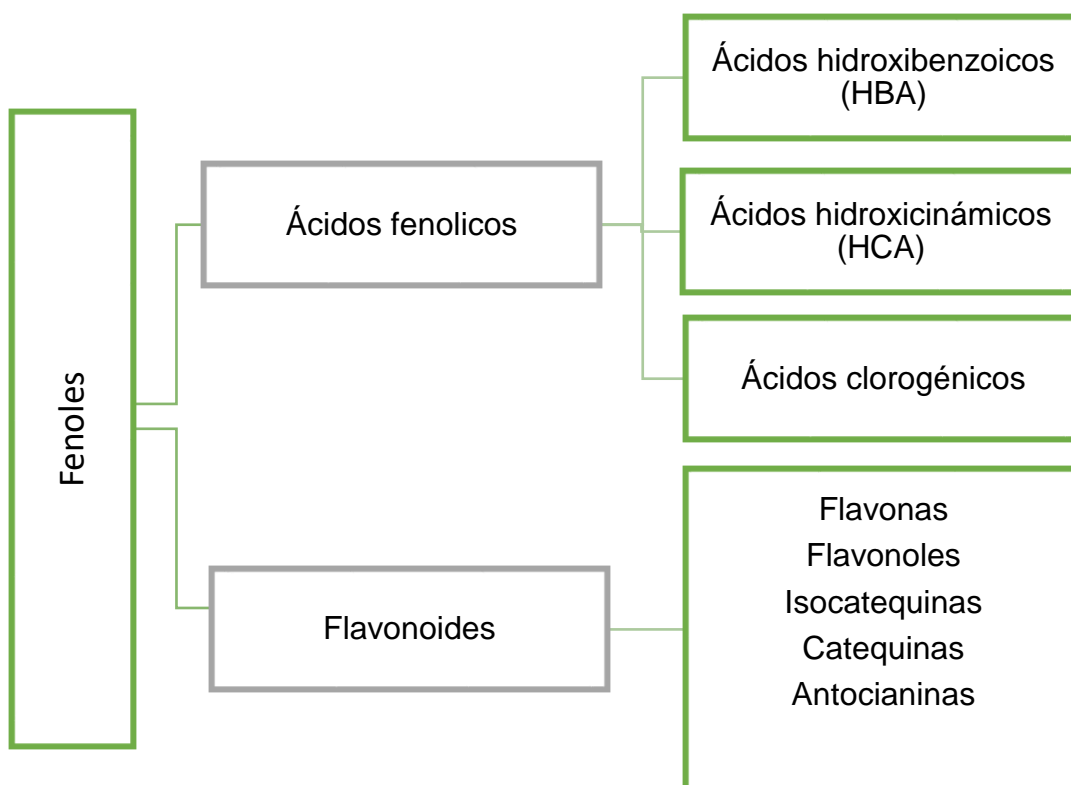


Figura 8. Clasificación de los fenoles [Robbins, 2003] y [Carvalho, 2008]

Los fenoles poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. La presencia del anillo aromático hace que los ácidos débiles, generando un efecto inductivo en el hidrógeno del grupo hidroxilo. El anillo aromático juega un papel importante en las propiedades antioxidantes [Peñarrieta, 2014].

3.5.1.1 Ácidos Fenólicos presentes en hojas moradas de *Ipomoea batatas*

Los ácidos fenólicos consisten en dos grupos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos. Es importante recalcar que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumentan la capacidad antioxidante de estos compuestos. Por ejemplo, los ácidos hidroxicinámicos son más efectivos en términos de la actividad antioxidante que los ácidos hidroxibenzoicos [Dziedzic, 2002].

- *Ácidos hidroxibenzóicos*

Los ácidos hidroxibenzóicos son compuestos que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y grupos hidroxilo (uno o más) en un anillo aromático, figura 3.8.

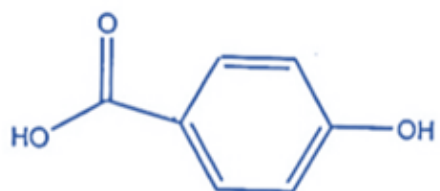


Figura 9. Ácido *p*-hidroxibenzóico

- *Ácidos hidroxicinámicos*

Esta clase de ácidos fenólicos se caracteriza por la presencia del grupo $\text{CH} = \text{CH}-\text{COOH}$ en remplazo del grupo COOH presente en los ácidos hidroxibenzóicos. El

doble enlace carbono (C = C) de la cadena aumenta la resonancia química, que puede ser descrita como una deslocalización de los electrones en la desestabilización de los radicales libres y por lo tanto incrementa la capacidad antioxidante de la molécula [Peñarrieta, 2014].

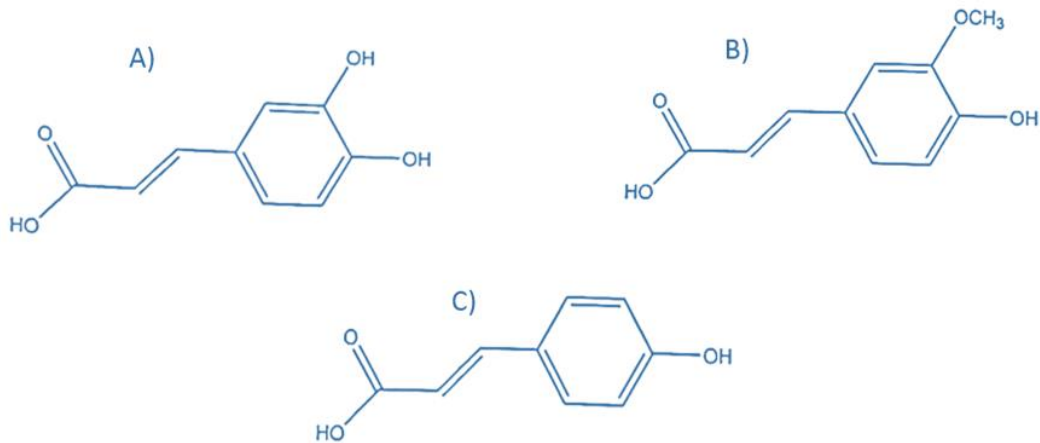


Figura 10. Distintos ácidos hidroxicinámicos. A) Ácido cafeico, B) Ácido ferúlico, C) Ácido cumárico

- *Ácido clorogénico*

Dentro del grupo de los ácidos hidroxicinámicos se encuentran los ácidos clorogénicos los cuales son el producto de la unión de un ácido químico y un derivado cinámico (ácido cafeico, ferúlico o *p*-cumárico)

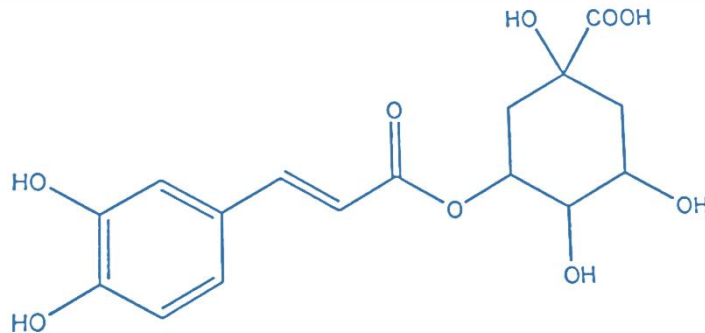


Figura 11. Estructura del ácido clorogénico

Diversos estudios realizados a hoja de camote han demostrado una gran presencia de compuestos fenólicos, en donde se han identificado hasta 29 compuestos como son (3-CQA) ácido 3-O-cafeoilquínico, (CHA) ácidos hidroxicinámicos, (4-CQA) ácido 4-O-cafeoilquínico, (CA) ácido cafeico, (p-CoA) ácido p-cumarico, (FA) ácido ferulico, (3,4-di-CQA) ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, (3,5-di CQA) ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, (4,5-di-CQA) ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico y (3,4,5-tri-CQA) ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquínico; siendo el 3,5-di CQA el que ha mostrado una mayor concentración en las hojas [Chunying *et al*, 2013]. Estos compuestos poseen propiedades farmacológicas como son anti-bacteriana, antihistamínico, hepatoprotector, también pueden prevenir la proliferación de las células cancerosas así como prevención de enfermedades cardiovasculares o incluso de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [Jung, 2011] y [Dos Santos, 2003].

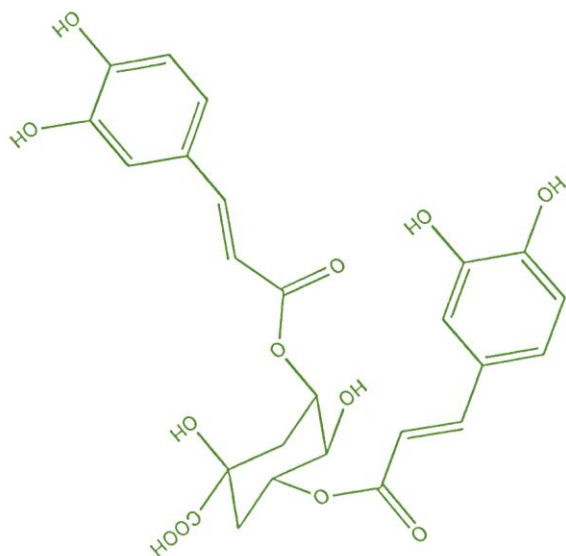


Figura 12. Estructura del Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico,

3.5.1.2 Flavonoides presentes en hojas moradas de *Ipomoea batatas*

Los flavonoides constituyen una de las subfamilias de polifenoles.

Los flavonoides tienen dos anillos bencénicos unidos a través de tres átomos de carbono. La estructura química típica de los flavonoides consta de un benzopirano 2-fenil, un anillo dihidroxilados fenólicos [Kühnau, 2000].

Las distintas clases de flavonoides se diferencian en la concentración de saturación y en los sustituyentes del anillo C, mientras que los compuestos individuales, dentro de cada uno de estos grupos, se distinguen por la diferente sustitución de los anillos A y B [Bors *et al*, 2001].

De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en: flavonas, flavonoles, isocatequinas, catequinas y antocianinas [Carvalho, 2008].

Se reportado la presencia de flavonoides en hojas de camote como la quercetina y kaenferol, se identificó la quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-galactoside, quercetina-3-O-sophoroside y quercetina-3-O-hexosas-hexosides y al menos uno de quercetina- 3-O-hexoside

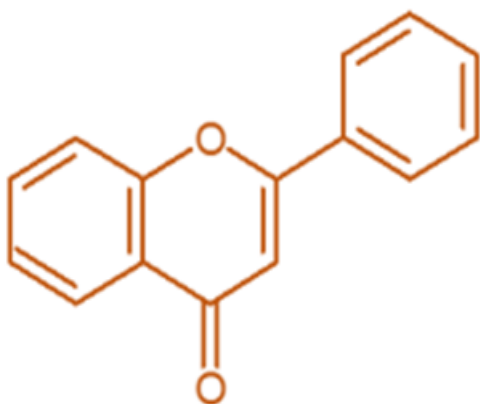


Figura 13. Estructura básica de un flavonoide.

3.5.1.3 Antocianinas presentes en hojas moradas de *Ipomoea batatas*

Las antocianinas están presentes en la naturaleza en forma de pigmentos en flores, frutos, bayas y hojas [Brouillard, 2003].

La función más importante de las antocianinas es la atracción de los insectos para polinizar y dispersar las semillas. Dentro de las vacuolas, las antocianinas, pueden estar localizadas en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos, que se forman mientras la síntesis de pigmentos está en operación [Jiang, 2000].

Son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides. Su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos. Un anillo A benzoil y un anillo B hidroxicinamoil [Strack, 2009].

Aglicona	Sustitución		λ_{nm} (nm)
	R1	R2	Espectro visible
<i>Pelargonidina</i>	H	H	494 (naranja)
<i>Cianidina</i>	OH	H	506 (naranja-rojo)
<i>Delfinidina</i>	OH	OH	508 (azul-rojo)
<i>Peonidina</i>	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
<i>Petunidina</i>	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
<i>Malvidina</i>	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

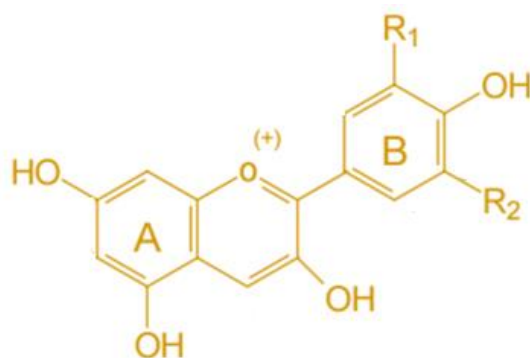


Figura 14. Estructura y sustituyentes de las antocianinas [Garzón, 2008].

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo [Badui, 2006].

En las plantas las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glucosilada; esto es, unidas a algún azúcar y en cuyo caso se denominan antocianinas. El azúcar presente en la molécula les confiere una gran solubilidad y estabilidad, generalmente se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico, pero puede también hacerlo en las posiciones 5 y 7. Con base en el número de azúcares presentes en su estructura, las antocianinas se clasifican en: monoglucósidos (un azúcar), diglucósidos (dos azúcares) y triglucósidos (tres azúcares). Los tipos de azúcares presentes pueden ser: monosacáridos, disacáridos o trisacáridos. Los monosacáridos más comunes son: pentosas como arabinosa y xilosa, o bien hexosas, de las cuales la D-glucosa es la más frecuente, aunque también pueden estar presentes galactosa o ramnosa. Los disacáridos más frecuentes son gentobiosa, soforosa, sambubiosa y rutinosa. Los trisacáridos reportados pueden ser lineales como la gentotriosa, o bien ramificados como xilosilrutinosa o glucosilrutinosa [Strack, 2009]

En algunos casos, los azúcares están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (p-cumárico, caféico, ferúlico o sináptico). Se ha observado que la presencia de estos grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura [Salinas *et al.*, 2010]

La acilación con diversos ácidos fenólicos hace a las antocianinas de camote morado y sus hojas únicas, ya que proporcionan algunas ventajas en el pH y resistencia al calor, sensibilidad a la luz y estabilidad general [Cevallos, 2004].

El aumento de la estabilidad se logra mediante la asociación intermolecular entre la antocianina y los grupos acilo aromático, imposibilitando que una molécula de agua ataque la posición 2 de la antocianidina del anillo C, mantenimiento así a las antocianinas en sus formas estables (catión flavilio o forma quinoidal) [Wallace, 2014]

La cianidina y la peonidina son las antocianinas que principalmente se encuentran en el camote y hojas moradas de la planta *Ipomoea batatas* pero la más abundante reportada son las derivadas de peonidina [Yoshinaga, Yamakawa, & Nakatani, 1999].

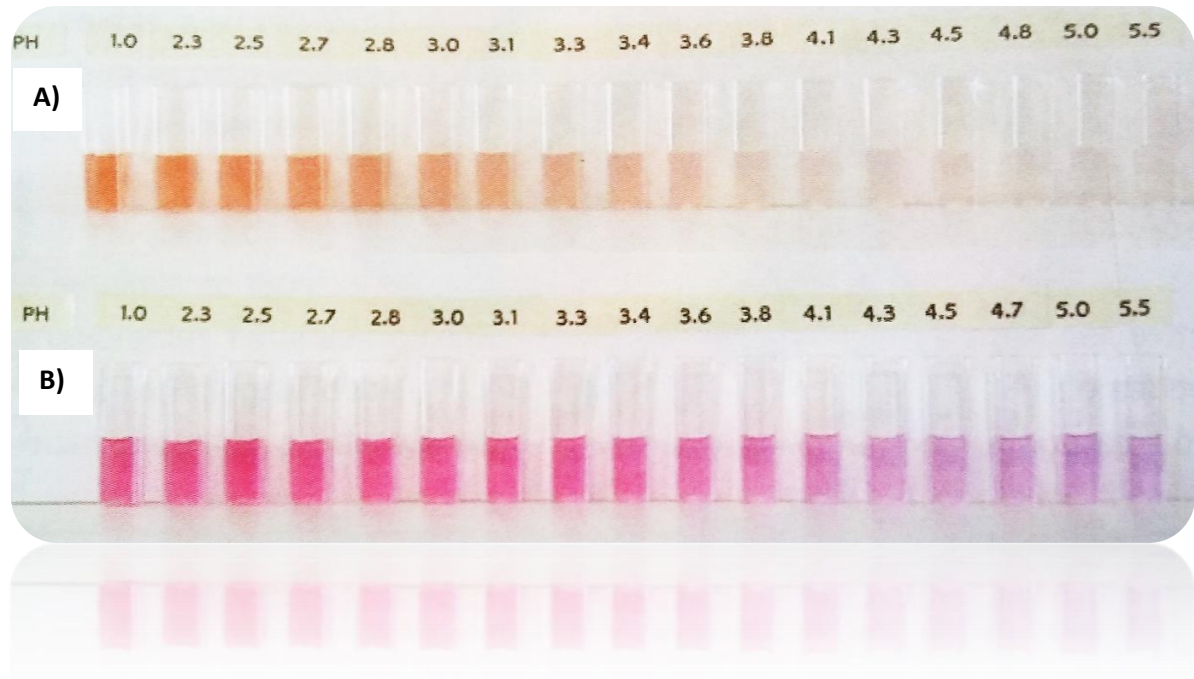


Figura 15. A) Peonidina a pH 1 a 5.5 sin acilación, **B)** Peonidina a pH 1 a 5.5 di-acilada [Heller, 2015]

El camote morado y sus hojas han mostrado excelentes propiedades como colorantes por su alta concentración de antocianinas aciladas estables, las cuales provén color en un rango de rosa a rojo oscuro, dependiendo de su concentración en la solución acidificada [Aguilar *at al.* 2015]

De igual manera las antocianinas, están asociadas a una menor resistencia a la insulina; de modo que mejora la regulación de los niveles de glucosa en sangre, tiene acción antiinflamatoria así como efectos sobre los vasos sanguíneos, plaquetas y lipoproteínas capaces de reducir el riesgo de enfermedades cardíacas coronarias.

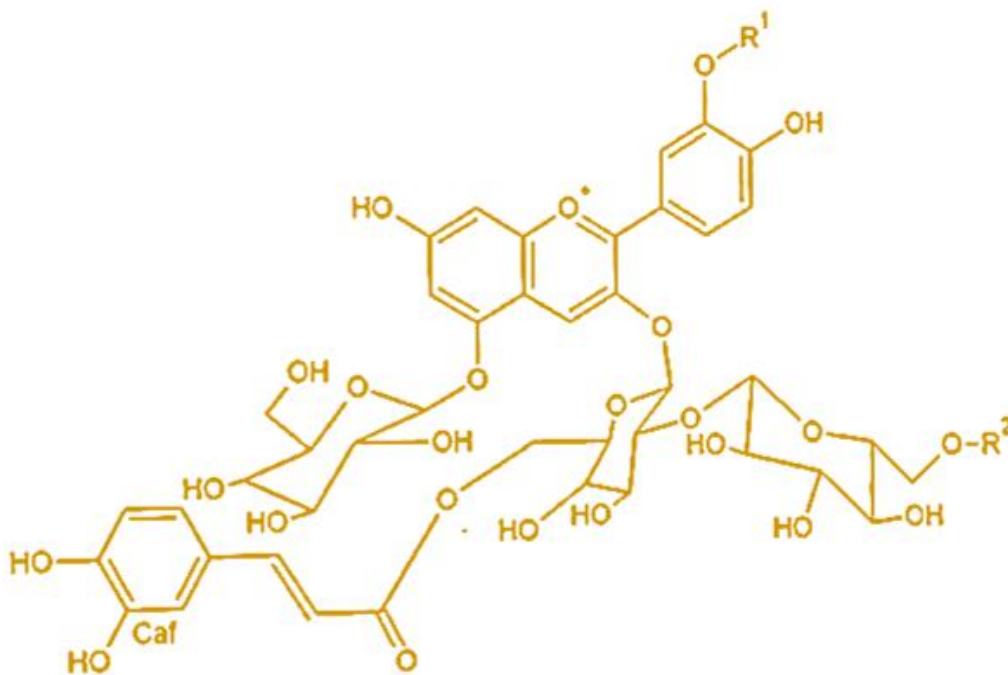


Figura 16. Antocianina acilada con ácido cafeico presente en *Ipomoea batatas* [Terahara, 2008]

3.6 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante describe la habilidad de las moléculas rédox para captar los radicales libres.

Los antioxidantes son compuestos los cuales pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhibiendo la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres.

La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una sustancia a un agente oxidante. Las reacciones de oxidación pueden producir radicales libres que comienzan reacciones en cadena que dañan las células

Los antioxidantes se dividen en dos categorías principalmente que son: sintéticos y naturales. En general los antioxidantes sintéticos son compuestos de estructuras fenólicas con varios grados de sustitución alquímica, mientras que los antioxidantes naturales pueden ser: compuestos fenólicos (tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos), compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) o carotenoides así como el ácido ascórbico [Soto, 2007]. Los antioxidantes sintéticos como el BHA y BHT (Butil – hidroxianisol y Butil - hidroxitolueno) han sido utilizados como antioxidantes desde principios del siglo pasado.

Las antocianinas por su origen fenólico pueden actuar como antioxidantes, ya que pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos a su estructura aromática [Ramírez, 2011].

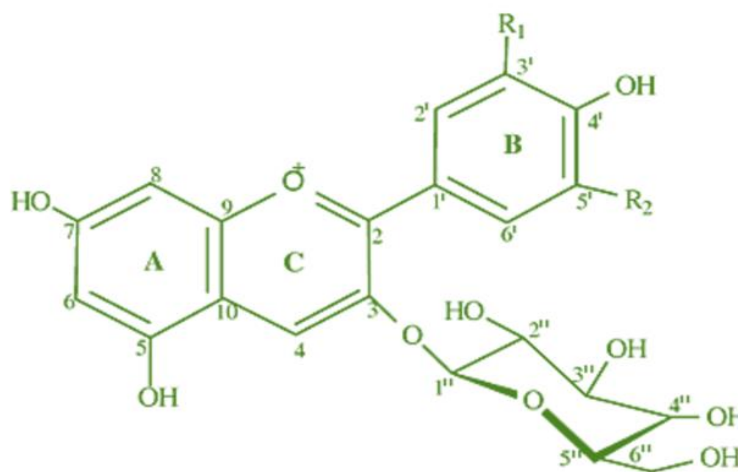


Figura 17. Estructura de una antocianina, con sus grupos hidroxilo donadores de electrones.

Una actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilo en la posición 3 y 4 del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado [Harborne, 2000]

Los grupos hidroxilo de la posición 3 del anillo C y los de la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo de la posición 4 son donadores de electrones [Miller, 1996].

3.6.1 Métodos asociados a la medición de actividad antioxidante

Hay dos tipos de mediciones que se realizan para evaluar la actividad antioxidante, *in vitro* e *in vivo*. Las principales estrategias consisten en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical en donde la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración de los compuestos antioxidantes en la muestra, además se conoce que la capacidad antioxidante depende del microambiente en que se encuentra el compuesto así, como la interacción de los mismos, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios [Arena *et al.* 2001].

Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar la capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: aquellos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrogeno y aquellos basados en la reacción por transferencia de electrones.

La mayoría de los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrogeno se aplica en un sistema de competencia de reacción en la cual el antioxidante y el sustrato compiten por los radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de compuestos azoicos. Estos incluyen la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP), inhibición de la oxidación del ácido linoleico y blanqueo de crocina (TEAC-crocina).

Por su parte los ensayos basados en la transferencia de electrones constan en medir la capacidad de un compuesto en reducir un agente oxidante, que cambian

de color cuando lo hace, el cambio de color se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes presentes en la muestra. Como parte de estos se incluyen el contenido total de fenoles por Folin-Ciocalteu, poder de reducción del ión férrico (FRAP), atrapamiento del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), decoloración del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) y capacidad de reducción antioxidante del cobre (CUPRAC), entre otros [Huang, *et al.* 2005].

El mecanismo general de acción de cada modelo de transferencia en el siguiente:

Transferencia de átomos de hidrógeno:



Transferencia de electrones:



Cabe mencionar que los métodos más aplicados son ABTS y DPPH debido a que presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también presentan algunas diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de magnesio o persulfato de potasio), enzimática (peroxidasa o mioglobulina), o electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico.

4. HIPOTESIS

En la raíz tuberosa de camote *Ipomoea batatas* se ha descrito la presencia de compuestos bioactivos, principalmente antocianinas y ácidos fenólicos de camotes morados, por lo que se espera que hojas moradas provenientes de camotes endémicos de México de igual manera se encuentre este tipo de compuestos bioactivos y que además presenten alta actividad antioxidante por su origen fenólico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Cuantificar fenoles y antocianinas totales en hojas moradas de distintas regiones productoras camote en México; así como su identificación por cromatografía en capa fina y por tiempos de retención en el HPLC, así mismo determinar la actividad antioxidante.

5.2. Objetivos particulares

- Seleccionar hojas de *Ipomoea batatas* en función de la coloración morada y preparación de muestras.
- Optimización del método de secado de las hojas.
- Seleccionar la mejor variedad de hojas moradas de *Ipomoea batatas*, que presente la mayor concentración de antocianinas totales y fenoles totales.
- Determinar la capacidad antioxidante por dos métodos, DPPH y ABTS.
- Identificación de antocianinas y ácidos fenólicos de hojas moradas, por cromatografía en capa fina y HPLC.

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación, una lista de los reactivos y equipos que se utilizó para realizar el desarrollo experimental.

6.1. Reactivos y equipos

➤ REACTIVOS

- Metanol, acetona, butanol
- Agua destilada y desionizada
- Ácido acético, fórmico (sigma)
- Buffer cloruros y de acetatos
- Na₂CO₃ al 2%
- de
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Hexano
- Acetato de etilo
- Acetonitrilo
- ABTS
- Persulfato de potasio
- DPPH

➤ EQUIPO

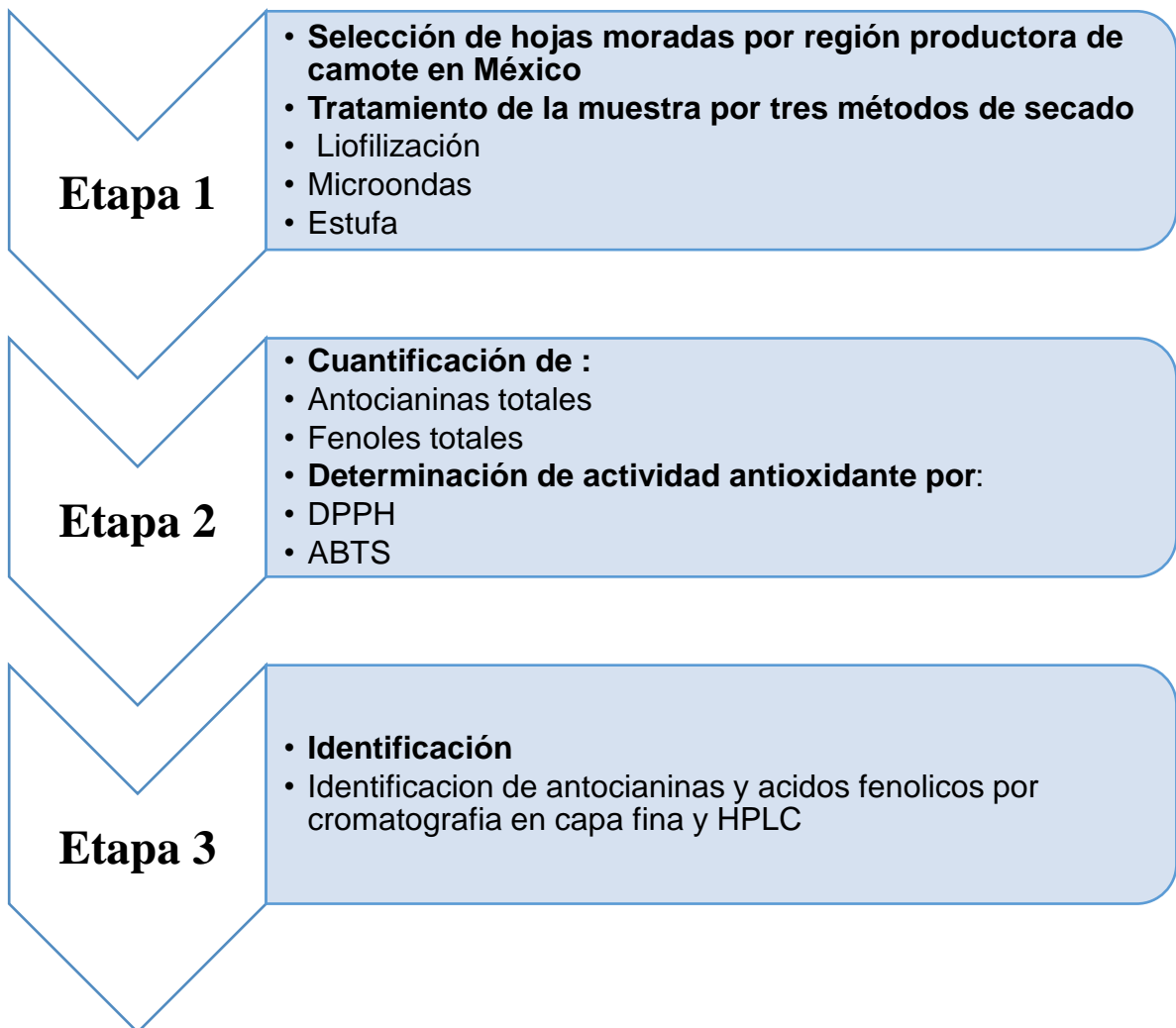
- Molino para café casero KRUPS GX 4100
- Placas de sílice de 2mm
- Lámpara UV
- Liofilizadora Labconco 7522900
- Congelador -80°C Revco Harris
- Sonicador Branson 3510 potencia: 100W, 42 Hz
- Rotavapor (Buchi) R-215, baño de calentamiento B-491, bomba de vacío V-700
- Balanza analítica OHAUS AP1105
- Espectrómetro GBC-CINTRA 101

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC. Agilent

Se efectuó el método de análisis para la cuantificación de antocianinas totales por el método de pH-diferencial, fenoles totales por el de Folin Ciocalteu así como la identificación de antocianinas por CCF y HPLC, a partir de un tamizaje de hojas moradas las cuales provenían de las principales regiones productoras de camote en México. De las cuales también fue medida su actividad antioxidante por DPPH y ABTS.

Nota: Las hojas fueron proporcionadas por el Jardín Botánico del instituto de Biología las cuales provenían de distintas regiones del país.

Diagrama de estrategia experimental



6.2. Etapa 1. Selección de hojas moradas por región productora de camote en México y su método de secado

Se estudió hojas de diferentes variedades de camote, solo tenían que presentar coloración morada.

Tabla 5. Clave de las muestras de hojas moradas, provenientes de las principales regiones productoras de camote en México.

Clave de las hojas moradas	Entidad	Variedad de camote
JC174	Jardín Botánico	—
FB2543	Hidalgo	Camote amarillo
FB2545	Hidalgo	Camote morado
JC83	Guanajuato	Camote morado
FB2617	San Luis Potosí	Camote rojo
FB2419	Puebla	Camote morado
JC149	Michoacán	Camote nailon
JC152	Michoacán	Camote nailon
JC177	Jardín Botánico	—
OJO AMARILLO	Puebla	—
FB2747	Campeche	Camote blanco
FB2748	Campeche	Camote morado
AMARILLO SAN FENIX	Puebla	—
MORADO YACAPIXTLA	Morelos	—
FB2745	Jardín Botánico	—
FB2728	Campeche	Camote morado
JC185	Jardín Botánico	—
JC172	Jardín Botánico	—

FB2636	Veracruz	Camote morado
FB2723	Campeche	Camote morado
PRF123	Guanajuato	Camote morado
FB2748	Campeche	Camote morado

Método de secado

A continuación se explican los tres diferentes métodos de secados que se utilizaron para ver cuál era el más efectivo en cuanto preservación de la muestra y obtención de los compuestos bioactivos.

- Secado por liofilización: Las muestras se congelaron a -80° durante 1 hora, posteriormente se liofilizaron por 36 horas, una vez pasado el tiempo de secado, las muestras se pulverizaron y se tamizó con malla 60.
- Secado por microondas: Se extendieron las hojas en una charola de plástico y se metieron al microondas por 2 minutos, se tamizaron con malla de 60.
- Secado por estufa: Las hojas se extendieron en charola de aluminio y se metieron a estufa por 24 horas a 40°C , se tamizaron con malla de 60.

6.3. Etapa 2. Cuantificación de fenoles, antocianinas totales y determinación de actividad antioxidante

A cada una de las muestras de hojas moradas se le cuantificó fenoles totales y antocianinas totales, porque a partir de estos datos se eligió la muestra que mayor concentración presentaran, para determinar su actividad antioxidante.

6.3.1 Método Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales

Se pesó 1g de muestra y se colocó en un matraz de 50ml al cual se le agregaron 20ml de una solución de metanol: agua 40:60%, posteriormente se tapó y se sonó por 20 minutos a 60°C . Por último se filtró con un embudo de Büchner [Torres A., 2016]

Al extracto obtenido se le cuantifico fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, se tomó 100µL de extracto, se adiciono 2ml Na₂CO₃ al 2%, después de 2 minutos se agregó 100µL de reactivo Folin-Ciocalteu el cual se diluyo primero con agua (1:1). Después de 30 minutos se midió la absorbancia a 750 nm en el espectro. Donde los resultados se expresaron como mg de ácido tánico/ g muestra [Fiskaa *et al*, 2007; Húlya, 2007; Zheng *et al.*, 2007]

La curva patrón se realizó con ácido tánico. La regresión lineal se obtuvo fue:

$$Y = 3.2284(X) + 0.0119$$

$$R = 0.9941$$

6.3.2. Método pH-diferencial para cuantificar antocianinas totales

Se pesó 1g de muestra y se colocó en un matraz de 50 mL al cual se le agrego 20 mL de una solución de acetona: agua 40:60 y 1% de ácido acético, posteriormente se sónico durante 20 minutos a 60°C, se filtró al vacío con un embudo de Büchner [Torres A., 2016]. Y se leyó en el espectrómetro siguiendo el método de pH-diferencial para cuantificar antocianinas totales.

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

Para cada solución, se midió la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de la antocianina) y a 700 nm en un espectrómetro UV visible usando agua destilada como blanco. El contenido de antocianinas totales se expresa como mg/L de cianidina 3-glucósido. Se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación [Van Buren, 1970].

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

$$AT = (A^* \times PM \times FD \times 100) / (\epsilon \times 1)$$

Dónde:

PM: peso molecular de cianidina 3-glucósido (449.2g/mol)

FD: factor de dilución (10)

ϵ : absortividad molar de la cianidina 3-glucósido (26900 L/cm mg)

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

6.3.3. Método 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH)

Se pesó 0.25g de muestra y se colocó en un matraz de 25ml al cual se le agregaron 5ml de una solución de metanol: agua 80:20% y 1% ácido acético, posteriormente se tapó y se sónico por 20 minutos a 60 °C. Por último se filtró con un embudo de Büchner.

El extracto obtenido se colocó en un matraz bola previamente pesado para llevarlo a sequedad en el rota vapor y conocer el peso real del extracto.

Una vez conocido el peso del extracto se diluyo con 5ml de una solución de metano: agua 80:20 y 1% ácido acético. De esta manera se conoce la concentración real del extracto.

Para la preparación del radical DPPH se pesó 2mg de este y se aforo con 10ml de metanol. La solución se cubre de la luz y se deja reposar por 30 minutos [Álvarez E., 2008]

Para cada una de las muestras es necesario realizar una curva con al menos 5 puntos a partir del extracto del cual ya se conoce su concentración real (las concentraciones de los diferentes puntos de la curva serán variables dependiendo de la muestra y su actividad antioxidante).

Colocar en cinco tubos de ensayo 50 μ L de extracto a diferentes concentraciones y 50 μ L de DPPH preparado, dejar reposar por 30 minutos. Leer a 517 nm en el espectro [Brand W. et al, 1995]. Cada punto de la curva se hizo por triplicado.

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición medio para cada concentración de acuerdo con la siguiente expresión matemática:

$$\%Inibicion = \frac{Abs(DPPH) - Abs(DPPH + MUESTRA)}{Abs(DPPH)}$$

El patrón de referencia que se utilizó para realizar la curva estándar fue el Trolox. Se reportó la concentración como IC₅₀, la cantidad de muestra necesaria para reducir a la mitad el radical DPPH en 30 minutos.

6.3.4 Método 2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS)

Se pesó 0.25g de muestra y se colocó en un matraz de 25ml al cual se le agregaron 5ml de una solución de metanol: agua 80:20% y 1% ácido acético, posteriormente se tapó y se sónico por 20 minutos a 60 °C. Por último se filtró con un embudo de Büchner.

El extracto obtenido se colocó en un matraz bola previamente pesado para llevarlo a sequedad en el rota vapor y conocer el peso real del extracto.

Una vez conocido el peso del extracto se diluyo con 5ml de una solución de metano: agua 80:20 y 1% ácido acético. De esta manera se conoce la concentración real del extracto.

Para la preparación del radical ABTS se pesó 4.2 mg de persulfato de potasio y 13 mg de ABTS. La mezcla se aforo con 20ml de agua destilada. La solución se cubre de la luz y se deja reposar por 16 hrs.

Para cada una de las muestras es necesario realizar una curva con al menos 5 puntos a partir del extracto del cual ya se conoce su concentración real (las concentraciones de los diferentes puntos de la curva serán variables dependiendo de la muestra y su actividad antioxidante).

Colocar en cinco tubos de ensayo 50µL de extracto a diferentes concentraciones y 50µL de ABTS preparado, dejar reposar por 5 minutos. Leer a 754 nm en el espectro [Kuskoski *et al*, 2004]. Cada punto de la curva se hizo por triplicado.

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición medio para cada concentración de acuerdo con la siguiente expresión matemática:

$$\%Inibicion = \frac{Abs(ABTS) - Abs(ABTS + MUESTRA)}{Abs(ABTS)}$$

El patrón de referencia que se utilizó para realizar la curva estándar fue el Trolox. Se reportó la concentración como IC₅₀.

6.4. Etapa 3. Identificación de ácidos fenólicos y antocianinas en hojas moradas de *Ipomoea batatas*

En esta etapa se identificó los ácidos fenólicos y antocianinas aciladas presentes en las hojas moradas.

Se pesó 1g de hojas moradas y se colocó en un matraz de 50 mL al cual se le agrego 20 mL de una solución de acetona: agua 40:60 y 1% de ácido acético, posteriormente se sónico durante 20 minutos a 60°C, se filtró al vacío con un embudo de Büchner [Torres A., 2016].

- Cromatografía en capa fina: se tomó 20 µL de extracto aplicando en una placa de aluminio de gel sílice de 2 mm y se eluyó con butanol: ácido acético: agua 6: 1: 3 para antocianinas mientras que para ácidos fenólicos se eluyó con una mezcla de acetato de etilo: agua: ácido fórmico 85: 15: 10
- HPLC: Se colocó 1mL de extracto enriquecido en un vial para HPLC, se efectuó la identificación a una longitud de onda de 510 nm para antocianinas

y para ácidos fenólicos a una longitud de 320nm, en donde se utilizó una columna Hipersil-Gold C18 a una longitud de onda de 325 nm, en donde se utilizó una columna Hipersil-Gold C18 (250x 4.5 nm, 5µm), 20 µL de inyección, flujo de 1.2 ml/min; la fase móvil fue A= H₂O: ácido fórmico: acetonitrilo (90:1.10) y B= acetonitrilo (100) con el siguiente gradiente de elución:

Tiempo	%A	%B
-	97	3
45	75	25
47	70	30
56	97	3

Por tiempo de retención se identificaron tentativamente cada una de las antocianinas de acuerdo a la literatura.

6.5. Análisis estadístico

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

Para determinar si había diferencia significativa entre los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza de 95%.

Para saber entre que muestras había diferencias, se realizó la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95%.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Etapa 1. Selección de hojas moradas por región productora de camote en México y estandarización del método de secado.

En esta primera etapa se seleccionaron 22 muestras de hojas de diferentes variedades de camote, las cuales tenían que presentar coloración morada, ya que esto indica la presencia de antocianinas. Las muestras fueron proporcionadas por Jardín Botánico del instituto de Biología por el doctor Francisco Basurto.

Se eligieron hojas provenientes de Hidalgo, Guanajuato, San Luis Potosí, Puebla, Michoacán, Morelos y Veracruz; entidades que son productoras de camote en México.

Estas hojas recibieron un tratamiento de secado con el fin de conservar y de mantener los compuestos bioactivos que se encuentran en ellas, principalmente antocianinas.

Para poder elegir el mejor método de secado primero se realizó una estandarización donde se eligieron, el secado por estufa, microondas y por liofilización. Se eligió una muestra y se le realizó estos tres tratamientos, para posteriormente cuantificar fenoles y antocianinas totales y así elegir el método más óptimo.

Tabla 6. Hojas PRF123, sometidas a tres métodos de secado y su cuantificación de fenoles y antocianinas totales.

Método de secado	Fenoles totales (mg de ácido tánico/ g muestra)	Antocianinas totales (mg/g muestra seca)
Estufa	44.04±0.12	0.64±0.07
Microondas	91.51±0.13	2.42±0.02
Liofilizado	118.77±0.43	3.10±0.06

En la tabla 6 se observa que tanto la cuantificación de fenoles y antocianinas totales, es más alta en el método de secado por liofilización. Los tres tratamientos muestran estadísticamente una diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% (anexo V).

La concentración de fenoles y antocianinas es más alta por el método de liofilización con un 63 y 80% más con respecto a las secadas por estufa.

Como plantea Martínez S. *et al.* 2001 el secado de las plantas disminuye la concentración de polifenoles extraíbles así como de antocianinas, ya que se aumenta la formación de complejos poli fenol-proteína, con lo cual se afecta la determinación de dichos compuestos, ésta también se reduce con el secado por liofilización, aunque este sea considerado un método con condiciones favorables de temperatura para el secado.

En un estudio realizado por Long *et al.* 2015 con hojas de camote, se observa que el método de secado por estufa afectó significativamente el contenido de derivados de ácido cafeoilquínico (CQA) en tejidos secos de hojas de camote. Los tratamientos de secado a 70 ° C y 100 ° C redujeron significativamente el contenido de derivados CQA. Mientras que el método de liofilización demostró la conservación de la mayor cantidad de derivados de CQA y la propiedad antioxidante.

Esto debido a que en las muestras sometidas a secado por estufa los compuestos termolábiles como el CQA y por tanto antocianinas se vieron alterados debido al uso de altas temperaturas por tiempo prolongado, este proceso presenta la desventaja de que el secado no es uniforme ni homogéneo, además de ser muy lento. Mientras que en la liofilización la forma y características del producto final son esencialmente las originales, la baja temperatura de trabajo impide la alteración de productos termolábiles y los constituyentes oxidables están protegidos. Las hojas tratadas con secado a microondas también presentaron valores bajos pero en menor medida que las de estufa, ya que el tiempo de secado es mucho más rápido con solo 2 minutos, lo cual hace que haya una menor degradación de los compuestos.

7.2. Etapa 2. Cuantificación de fenoles, antocianinas totales y determinación de actividad antioxidante.

Se determinó que el mejor método de secado fue el de liofilización, las 22 muestras fueron sometidas a este tratamiento, para posteriormente cuantificar su concentración de fenoles y antocianinas totales y así mismo se eligieron las 5 muestras con la mejor concentración, para determinar su actividad antioxidante.

7.2.1. Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles de las hojas fueron extraídos con metanol: agua 60:40% sin ácido, ya que anteriormente se realizó una estandarización donde estos disolventes y proporciones presentaban una mejor extracción de fenoles.

La medición se realizó con el extracto obtenido, donde los datos se reportan como mg ácido tánico /g muestra seca. La curva fue hecha con ácido tánico (anexo VI).

Se realizó una ANOVA para determinar si había una diferencia significativa entre todas las muestras, y se encontró que sí, con una nivel de confianza del 95%.

La concentración total de fenoles en la hojas moradas varia de un 10.51 mg Ac. Tánico /g de muestra seca (el valor más bajo) hasta un 157.09 mg Ac. Tánico /g de muestra seca (el más alto), ver tabla 7.

De las 22 muestras de hojas moradas, se eligieron 5 en base a una alta concentración de fenoles totales, pero principalmente a que también coincidieran con un contenido alto de antocianinas totales, siendo las siguientes muestras:

- JC83 (104.20 mg/ g muestra BS)
- JC149 (107.18 mg/ g muestra BS)
- PRF123 (118.785 mg/ g muestra BS)
- JC177 (121.81 mg/ g muestra BS)
- JC 172 (157.09 mg/ g muestra BS)

Tabla 7. Fenoles totales en hojas moradas provenientes de distintas regiones productoras de camote en México.

	Clave de la muestra	Entidad	Fenoles totales (mg ac. tánico /g de muestra seca)
1	JC174	Jardín Botánico	50.81± 1.29
2	FB2543	Hidalgo	29.02± 1.45
3	FB2545	Hidalgo	54.33± 0.20
4	JC83	Guanajuato	104.20± 2.02
5	FB2617	San Luis Potosí	33.31± 5.53
6	FB2419	Puebla	39.792± 1.80
7	JC149	Michoacán	107.18± 4.71
8	JC152	Michoacán	20.13±0.11
9	JC177	Jardín Botánico	121.81± 2.05
10	OJO AMARILLO	Puebla	110.50± 0.96
11	FB2747	Campeche	105.54±6.72
12	FB2748	Campeche	99.36±2.26
13	AMARILLO SAN FENIX	Puebla	96.47± 0.23
14	MORADO YACAPIXTLA	Morelos	96.46±1.00
15	FB2745	Jardín Botánico	98.38±0.68
16	FB2728	Campeche	10.93±3.22
17	JC185	Jardín Botánico	102.48±2.32
18	JC172	Jardín Botánico	157.09± 7.05
19	FB2636	Veracruz	101.23±2.64
20	FB2723	Campeche	108.07±4.67
21	PRF123	Guanajuato	118.77±0.43
22	FB2748	Campeche	10.51±3.22

Estas muestras entre si no presentaron diferencia estadística significativa, a excepción entre las muestras JC 172 con respecto a la JC 83 y JC149. El análisis se hizo por el método de Tukey (anexo VI).

La muestra de hojas moradas JC 172 (157.09 mg/ g muestra BS) obtuvo los valores más altos de fenoles. Se piensa que es debido a la deficiencia de nutrientes, favoreciendo la formación de fenoles, dentro de los cuales destacan las antocianinas y flavonoides. Boscaiu, *et. al.*, 2010 reportan aumento en la concentración de fenoles y flavonoides totales cuando someten a Gypsum Habitats a condiciones de estrés de temperaturas elevadas, deficiencia de nutrientes y concentraciones altas de sal.



Figura 18. Follaje de hojas, brotando del camote.

En otro estudio realizado a 20 muestras de hojas de diferentes cultivares de camote de origen Chino, se reportaron valores de fenoles totales de 34.93 mg/ g muestra B.S, un valor bajo al obtenido en este

estudio (157.09 mg/ g muestra). En donde es importante mencionar que las antocianinas representar aproximadamente solo el 10% sobre el total de fenoles y el 3,5-di-O-cafeoil-quínico representa el 31.7- 58.0% del total de los ácidos fenólicos [Chunying, 2013].

Estos resultados indican que las hojas pertenecientes a camotes endémicos de México, tienen un mayor contenido de fenoles en comparación a las de origen Chino.

7.2.2. Cuantificación de antocianinas totales

Las hojas analizadas fueron aquellas que presentaran coloración morada ya que esto se debe a la presencia de antocianinas.

Se extrajeron las antocianinas con acetona 40%: agua 60% y 1% de ácido acético, al extracto obtenido se le determinó la concentración de antocianinas totales por el método de pH-diferencial, ya que además de que contenga antocianinas aciladas, es importante que contenga cantidades apreciables para obtener un mejor rendimiento [Chávez, 2014].

En la tabla 8 se presentan los resultados de las distintas muestras de hojas moradas. Los resultados se reportan como miligramos de cianidina-3-glucosido en 100 g de muestra.

De acuerdo a la ANOVA, se encontró que hay diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95% en la concentración de antocianinas totales de 22 hojas.

La concentración de antocianinas totales en las hojas moradas varía de un 0.045 mg /g de muestra seca (el valor más bajo) hasta un 3.12mg /g de muestra seca (el más alto), ver tabla 8.

Las muestras con mayor contenido de antocianinas totales son:

- JC83 (1.87 mg/ g muestra BS)
- JC149 (1.23 mg/ g muestra BS)
- PRF123 (3.12 mg/ g muestra BS)
- JC177 (1.50 mg/ g muestra BS)
- JC 172 (1.60 mg/ g muestra BS)

Tabla 8. Antocianinas totales en diferentes muestras de hojas secadas por liofilización

	Clave de la muestra	Entidad	Antocianinas totales (mg/g de muestra seca)
1	JC174	Jardín Botánico	0.9549±0.0637
2	FB2543	Hidalgo	1.11±0.0432
3	FB2545	Hidalgo	0.7334±0.0356
4	JC83	Guanajuato	1.87±0.0848
5	FB2617	San Luis Potosí	0.86±0.0422
6	FB2419	Puebla	1.00±0.0583
7	JC149	Michoacán	1.23±0.1830
8	JC 152	Michoacán	0.045±0.015
9	JC177	Jardín Botánico	1.50±0.0212
10	OJO AMARILLO	Puebla	0.9885±0.0159
11	FB2747	Campeche	0.3871±0.0164
12	FB2748	Campeche	0.2150±0.0098
13	AMARILLO SAN FENIX	Puebla	1.1466±0.1886
14	MORADO YACAPIXTLA	Morelos	0.8526±0.0074
15	FB2745	Jardín Botánico	0.26±0.0555
16	FB2728	Campeche	0.3938±0.0185
17	JC185	Jardín Botánico	0.2803±0.0267
18	JC172	Jardín Botánico	1.60±0.0141
19	FB2636	Veracruz	0.0879±0.0016
20	FB2723	Campeche	0.1622±0.0017
21	PRF123	Guanajuato	3.1250±0.0636
22	FB2748	Campeche	0.9261±0.0092

Se encontró solo que hay diferencia significativa entre las muestra PRF123 respecto a las demás muestras. El análisis se hizo por el método de Tukey (anexo VII).

Sin embargo, aunque no hay una diferencia significativa, entre las otras muestras, son las más altas en antocianinas totales, así como de fenoles habiendo una tendencia entre sí, Figura 19. Por lo cual estas muestras son las que se eligieron para la determinación de actividad antioxidante y la identificación por HPLC.

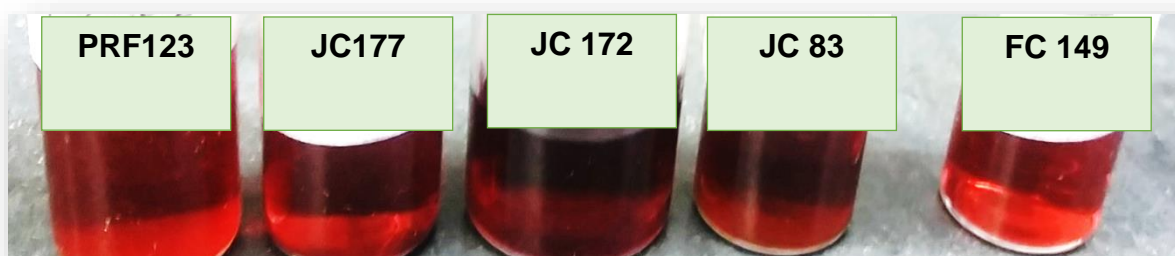


Figura 19. Extractos pertenecientes a hojas moradas con la concentración más alta de antocianinas totales.

Aunque se ha estudiado más las antocianinas presentes en la raíz tuberosa de *Ipomoea batatas*, también se a reportado cantidades apreciables de antocianinas en hojas y flores.

Torres a reportado valores de 2.36 mg/ g muestra BS en hojas moradas, un valor alto si consideramos que en la raíz se a reportado de 3-5 mg/g muestra BS, como la variedad Stokes Purple [Den Truong, 2010] que son variedades no mejoradas, ya que cabe destacar que la variedad Shinzami (variedad coreana) con 13.42 mg/g BS y p40 con 13.92 mg/g BS son mejoradas , enriquecidas de antocianinas, lo cual no solo favorece un mayor contenido de antocianinas en la raíz tuberosa sino también en las propias hojas.

En este estudio se encontró valores de 1.87 mg/ g muestra BS (JC 83) y 3.12 mg/ g muestra BS (PRF 123) en hojas pertenecientes a la variedad de camote morado, lo cual puede explicar la concentración alta ya que en esta variedad se han reportado cantidades altas de antocianinas en comparación a las de otras variedades [Den Truong, 2010], ver figura 20. Además la muestra PRF123 es la única que no proviene del jardín botánico sino del campo, por lo cual su exposición al intemperie y condición de estrés favorece una mayor biosíntesis de compuestos bioactivos como lo son las antocianinas [Boscaiu *et. al.*, 2010]

Tomando en cuenta los valores obtenidos y los reportados, la muestra PRF 123 presenta una mejor concentración con respecto a los reportados y la JC 83 está entre los valores altos.

Sin embargo, hay una amplia variedad de frutos con alto contenido de antocianinas como se muestra en la siguiente tabla

Tabla 9: Fuentes naturales con alto contenido de antocianinas [Castañeda y Guerrero, 2015]

Fuentes natural	Contenido de antocianinas (mg/ g de muestra seca)
Pitahaya	4.56
Rábano	1.12
Fresa	0.43
Frambuesa	0.40
Lechuga de hojas rojas	0.40
Arándano	0.35
Cascara de uva	0.008

Como se puede observar en la tabla algunos alimentos como la fresa, frambuesa y arándanos tienen bajo contenido de antocianinas al compararlos con los valores obtenidos en las hojas, lo cual indica que una buena fuente para extraer antocianinas son las hojas moradas, sin embargo también encontramos valores iguales en la cascara de pitahaya y rábano.



Figura 20. Hojas con coloración púrpura debido a la presencia de antocianinas.

7.2.3. Determinación de actividad antioxidante por DPPH y ABTS

7.2.3.1. Medición del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracil (DPPH)

Se midió y comparó la actividad captadora del radical DPPH de diferentes extractos orgánicos provenientes de cinco muestras de hojas moradas.

La solución de referencia se obtuvo a partir del Trolox disuelto con la solución de DPPH (anexo VIII).

Todas las soluciones con el DPPH fueron incubadas en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se midieron en el espectrofotómetro las absorbancias para todas las soluciones a 517nm. A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición medio para cada concentración.

Luego de haber calculado los porcentajes de inhibición para cada una de las concentraciones, estos fueron ajustados a una regresión y con base en esta curva se determinó el índice de inhibición medio (IC_{50}) o la concentración en la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

En la figura 21 se presenta el porcentaje de inhibición del radical DPPH para obtener el IC_{50} y en la tabla 10 se resumen los resultados de las muestras de hojas.

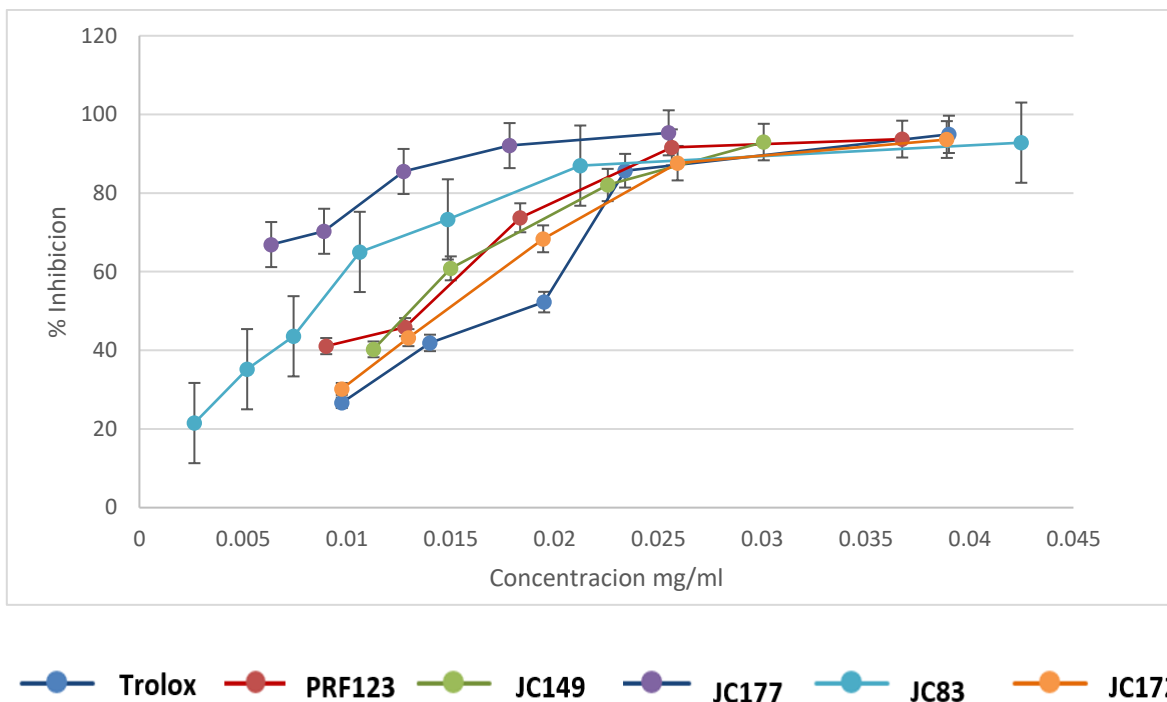


Figura 21. Porcentaje de inhibición del radical DPPH para obtener el IC₅₀

Es importante mencionar que el Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), es un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo y suele utilizarse como estándar para medir la capacidad antioxidante en alimentos. De aquí su utilización en este estudio.



Figura 22. Trolox a diferentes concentraciones con DPPH después de 30min.

Tanto el Trolox como las muestras presentaron una tendencia logarítmica, lo cual nos indica que en algún momento aunque se aumente la concentración ya no hay poder inhibitorio del radical.

Tabla 10. Valores de IC₅₀ de la actividad de cinco extractos de hojas moradas comparadas con Trolox.

Muestra	Entidad	DPPH (IC ₅₀ mg/ml)
JC177	Jardín Botánico	0.0030±0.0001
JC83	Guanajuato	0.0075±0.0001
PRF123	Guanajuato	0.0116±0.0003
JC149	Michoacán	0.01289±0.0002
JC172	Jardín Botánico	0.0141±0.0003
TROLOX	-----	0.0105±0.0003

El valor IC₅₀ para cada extracto y el Trolox, se calculó y definió como la concentración de muestra causante del 50% de inhibición de la absorbancia (Tabla 10). Un valor inferior del IC₅₀ indica una mayor actividad antioxidante. En este estudio, todos los extractos mostraron una excelente actividad inhibidora del radical DPPH dependiente de la concentración, con valores de IC₅₀ que estuvieron en el rango de 0.0030mg/ ml hasta 0.0141 mg/ ml.

Los extractos provenientes de las cinco muestras presentaron valores de IC₅₀ comparables al obtenido para el control positivo Trolox e inferiores al reportado lo que demuestra una actividad antioxidante alta.

Además, los extractos que presentaron el mayor contenido fenólico, resultaron ser los de mayor actividad inhibidora del radical DPPH, incluso superior a la obtenida para el Trolox.

Es importante mencionar que dentro de los compuestos fenólicos se encuentra un grupo llamado flavonoides los cuales contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. [Havsteen, 2000 y Peres, 2001]

Se reportado que en las hojas de *Ipomoea batatas* hay presencia de flavonoides como quercetina y kaenferol [Chunying, 2013], siendo la quercetina un compuesto con elevada actividad antioxidante [Merck, 2000]

En otro estudio realizado por Yasuhiro Takahata evalúa la cantidad y composición de antocianina en camote y su efecto sobre la actividad de compactación de radical DPPH, donde reporta que las antocianinas como cianidina y peonidina tienen importante actividad Antioxidante, debida al sinergismo de cada una de las antocianinas.

7.2.3.2 Medición del radical 2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS)

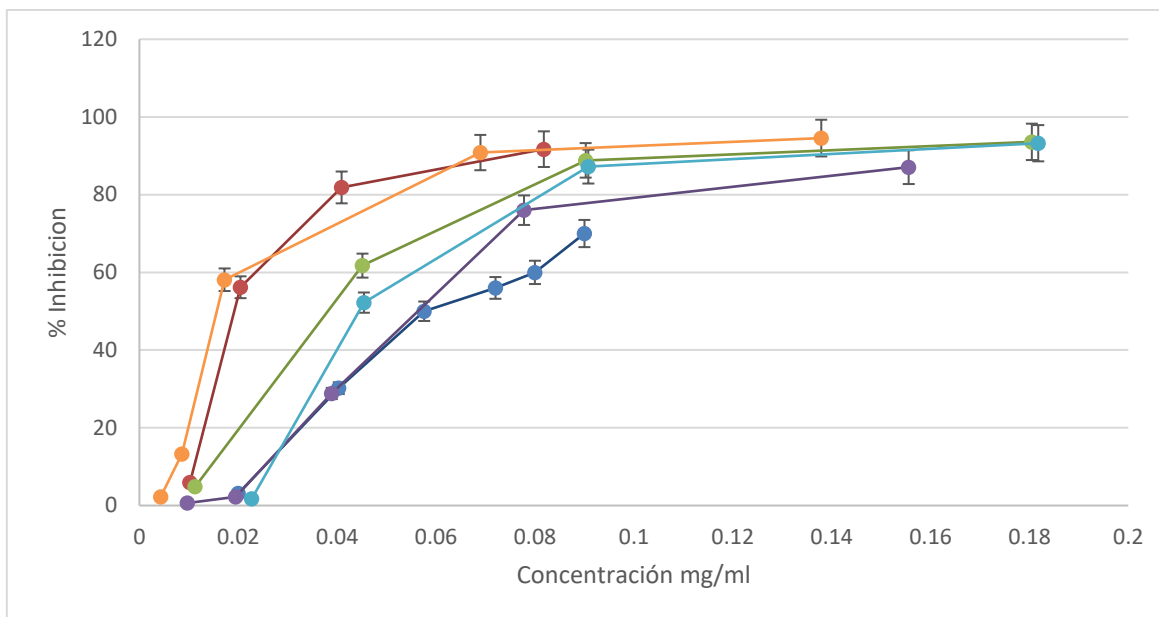
Se midió y comparó la actividad captadora del radical ABTS de diferentes extractos orgánicos provenientes de cinco muestras de hojas moradas.

La solución de referencia se obtuvo a partir del Trolox disuelto con la solución de ABTS (anexo IX).

Todas las soluciones de las muestras con el ABTS fueron incubadas en la oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se midieron en el espectrofotómetro las absorbancias para todas las soluciones a 754nm. A partir de las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje de inhibición medio IC_{50} .

Luego de haber calculado los porcentajes de inhibición para cada una de las concentraciones, estos fueron ajustados a una regresión y con base en esta curva se determinó el índice de inhibición medio (IC_{50}) o la concentración en la cual el porcentaje de inhibición es del 50% (figura 23). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

El Trolox fue utilizado igual como referencia para el método ABTS.



● Trolox ● PRF123 ● JC149 ● JC177 ● JC83 ● JC172

Figura 23. Porcentaje de inhibición del radical ABTS para obtener el IC₅₀

Igual que DPPH, por ABTS las muestras presentaron una tendencia logarítmica, lo cual nos indica que en algún momento aunque se aumente la concentración ya no hay poder inhibitorio del radical.

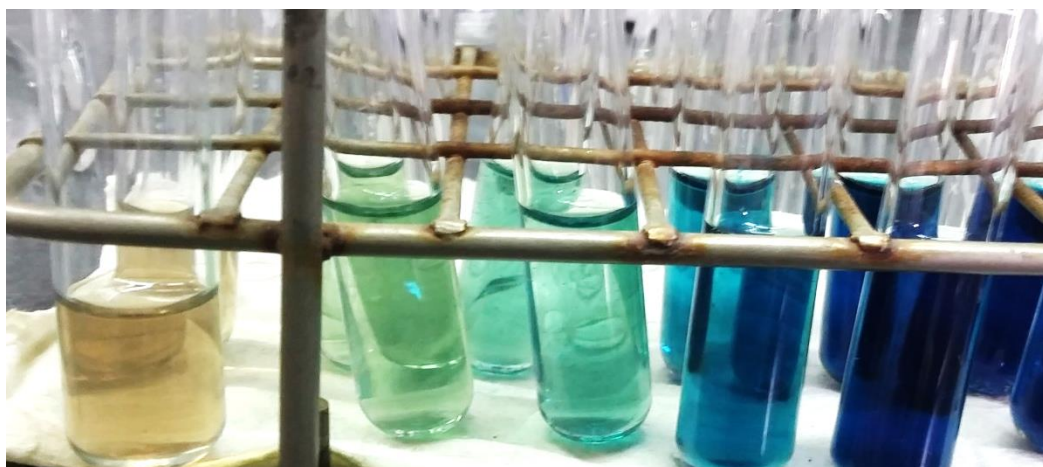


Figura 24. Trolox a diferentes concentraciones con ABTS después de 5 min.

Tabla 11. Valores de IC₅₀ de la actividad de cinco extractos de hojas moradas comparadas con Trolox.

Muestra	Entidad	ABTS (IC ₅₀ mg/ml)
JC177	Jardín Botánico	0.0603±0.0022
JC83	Guanajuato	0.0529±0.0021
PRF123	Guanajuato	0.0232±0.0015
JC149	Michoacán	0.0372±0.0023
JC172	Jardín Botánico	0.0574±0.0022
TROLOX	-----	0.0507±0.0018

Al igual que por DPPH los extractos mostraron una excelente actividad inhibidora del radical se encontraron valores de IC₅₀ que estuvieron en el rango de 0.0232 mg/ml hasta 0.0603 mg/ml.

Por este método las concentración del extracto fueron ligeramente más elevadas con respecto al utilizado para DPPH, lo cual nos indica que es necesario una mayor concentración para poder tener el 50% de inhibición del radical ABTS.

Sin embargo tomando en cuenta nuestra referencia el Trolox las muestras siguen presentando valores iguales o inferiores a este, lo que demuestra una actividad antioxidante buena como la vista en DPPH.

Y como ya se explicó anteriormente esto se puede deber a la presencia de compuestos fenólicos y algunos flavonoides como la quercetina y las antocianinas que se encuentran presentes en las hojas.

7.3. Etapa 3. Identificación de ácidos fenólicos y antocianinas en hojas moradas de *Ipomoea batatas*.

Las cinco muestras con mayor concentración de fenoles y antocianinas totales fueron las utilizadas para la identificación.

7.3.1. Identificación de ácidos fenólicos por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

- **Cromatografía en capa fina para fenoles**

De los extractos obtenidos de las hojas liofilizadas, se realizó una identificación cualitativa por cromatografía en capa fina de ácidos fenólicos.

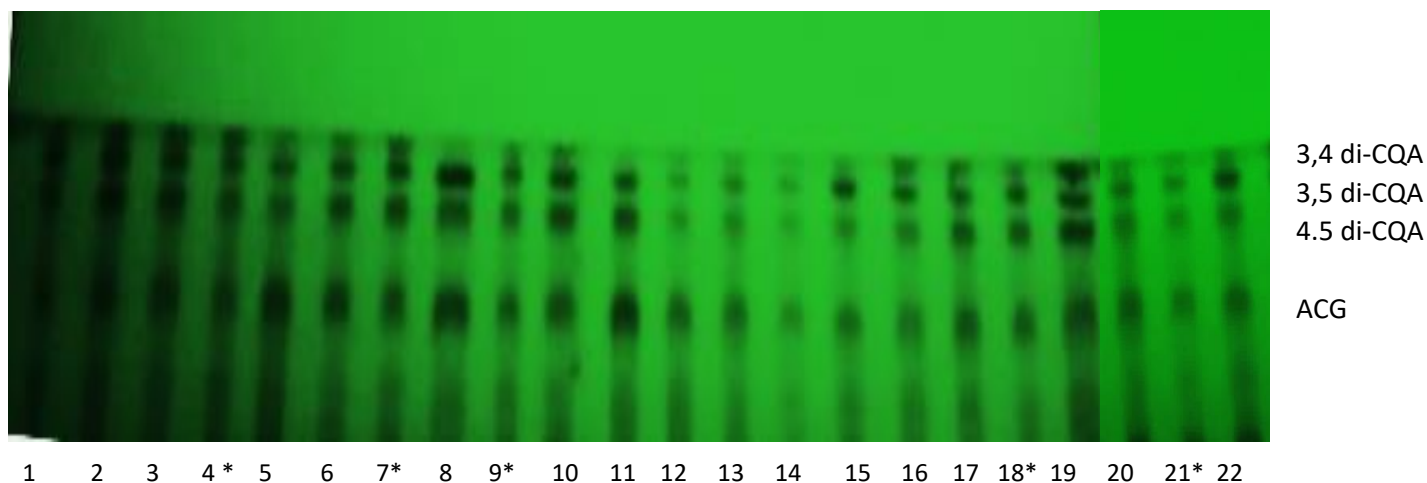
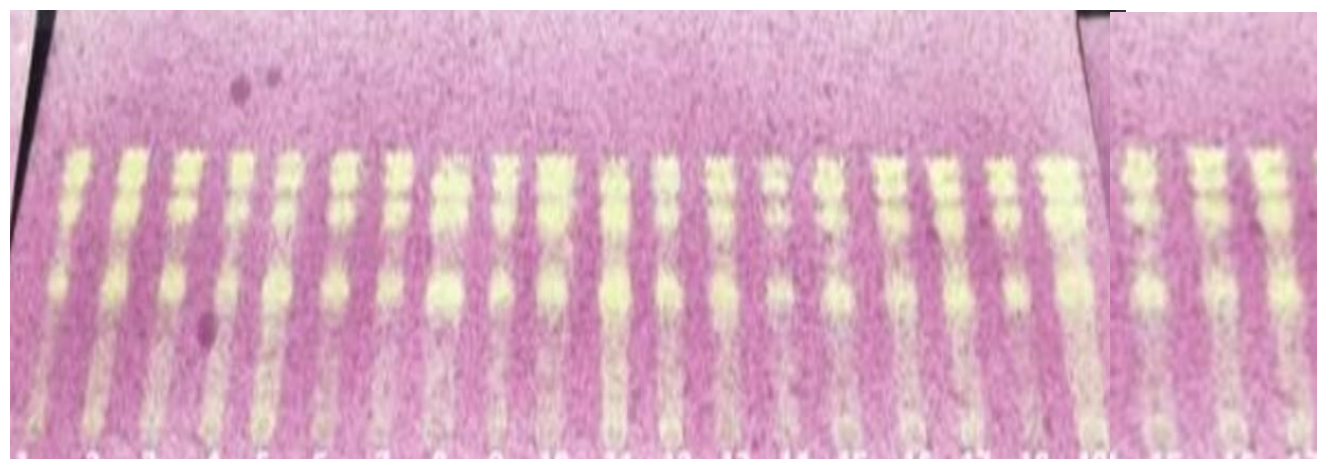


Figura 25. Cromatografía en capa fina del extracto hojas moradas, eluido con acetato de etilo: agua: ácido fórmico 85: 15: 10, visto en cámara UV. Las marcadas con (*) son aquellas con alto contenido de fenoles toles.

Se puede observar en la figura 25, la presencia de compuestos fenólicos, en donde todas las muestras presentan el mismo perfil, pues a pesar de que la concentración es distinta para cada muestra de hojas, el perfil se mantiene igual.

Con base a estudios en cromatografía en capa fina por Torres, 2016 para extractos de la raíz de *Ipomoea batatas* con estándares de los ácidos: clorogénicos o monocarcoilquinico, 3,4; 4,5 y 3,5 di-CQA, de acuerdo al RF de éstos y el orden de

elución de las manchas cromatográficas en las muestras de dicho estudio, se comparó e identificó la presencia de ácido clorogénico y tres de los ácidos di-cafeoil-quinicos (4,5; 3,5 y 3,4 di-CQA) siendo el orden de abajo hacia arriba.



1 2 3 4* 5 6 7* 8 9* 10 11 12 13 14 15 16 17 18* 19 20 21* 22

Figura 26. Placa revelada con DPPH. Las marcadas con (*) son aquellas con alto contenido de fenoles toles.

En la figura 26, se observa la actividad antioxidante de los compuestos identificados mediante el revelador DPPH, tal efecto se da ya que cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R.) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color característico [Muñoz, 2008]. Se puede ver que presentan el mismo perfil en cuanto el poder de inhibición del radical, lo cual se comprobó en la etapa donde se determinó actividad antioxidante ya que los valores obtenidos fueron muy parecidos entre sí para las muestras analizadas.

- **Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para fenoles**

Para la identificación parcial por HPLC se utilizaron las muestras que presentaron la mayor cantidad de fenoles totales, ver figura 27, bajo las condiciones especificadas en la metodología.

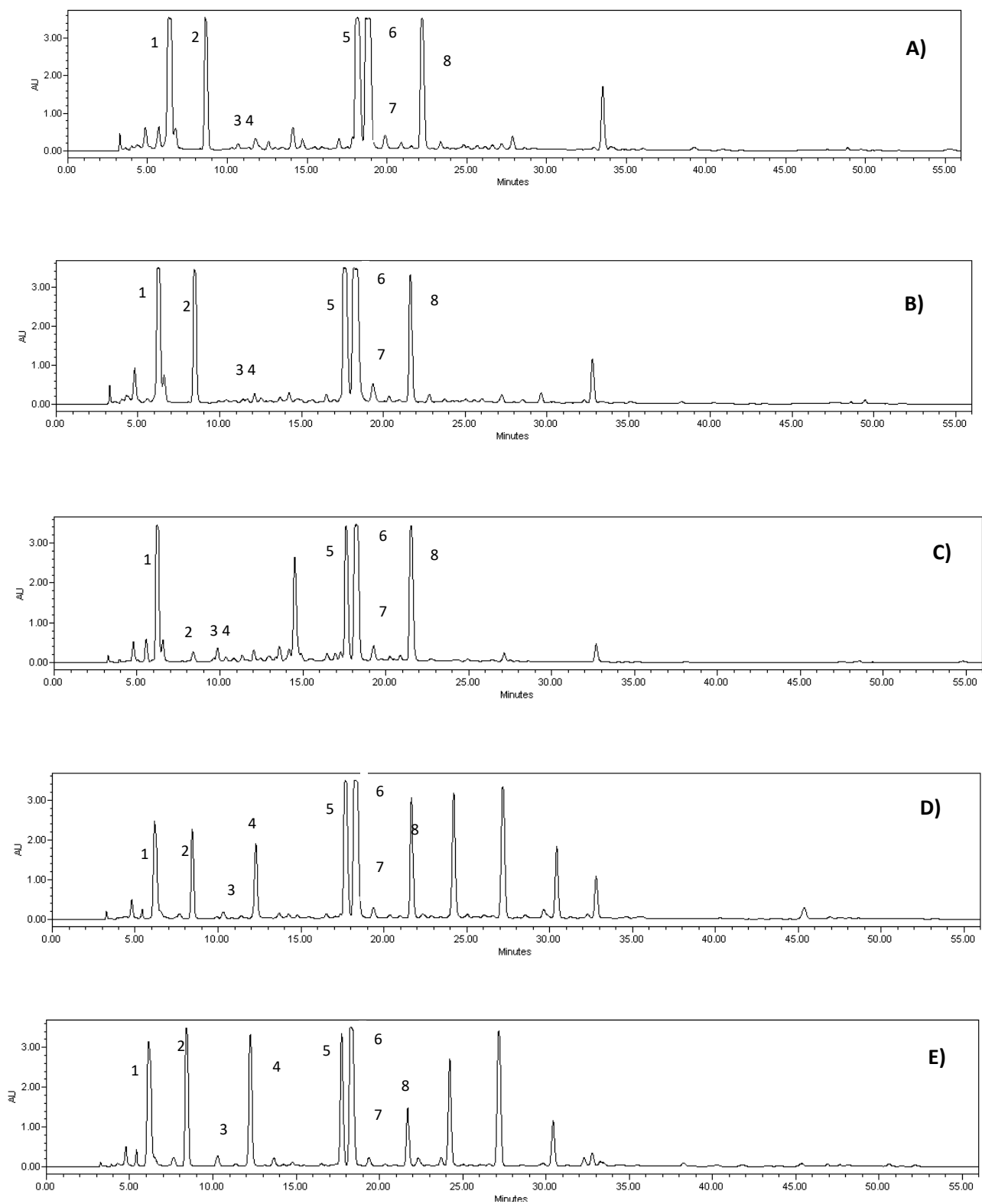


Figura 27. Cromatograma de las cinco muestras de hojas. **A)** JC177, **B)** JC172, **C)** PRF123, **D)** JC149 y **E)** JC83

Tabla 12. Ácidos fenólicos presentes en hojas.

Pico	Ácido
1	Ácido cafeico
2	Ácido clorogénico
3	Ácido 1,3-di-O-cafeoil-quínico
4	Ácido 1,5-di-O-cafeoil-quínico
5	Ácido 3, 4-di-O-cafeoil-quínico
6	Ácido 3, 5-di-O-cafeoil-quínico
7	Ácido 4, 5 -di-O-cafeoil-quínico
8	Ácido 3, 4, 5-tri-O-cafeoil-quínico

En el HPLC se determinó por tiempo de retención el perfil de ácidos fenólicos de acuerdo a lo reportado [Torres, 2016], en donde se identificaron tentativamente 8 ácidos fenólicos, los cuales se presentan en el tabla 12.

Lo cual coincidió con la cromatografía en capa fina, donde se identificó la presencia de ácido clorogénico y tres de los ácidos di-cafeoil-quínicos (3,4; 4,5 y 3,5 di-CQA).

Así mismo en los cromatogramas (figura 27) se observa un perfil muy parecido entre las muestras, algo también observado en la cromatografía en capa fina (figura 25).

La mayoría de los picos se encuentran en el límite de detección lo cual podría dar una idea de la alta concentración en el que se encuentran sin embargo esto es cualitativo, pero se reportado que en hojas moradas hay una mayor concentración de Ácido 3, 5-di-O-cafeoil-quínico, además se reportado la presencia de distintos ácidos fenólicos, como se ve en la figura 28 [Chunying, 2013].

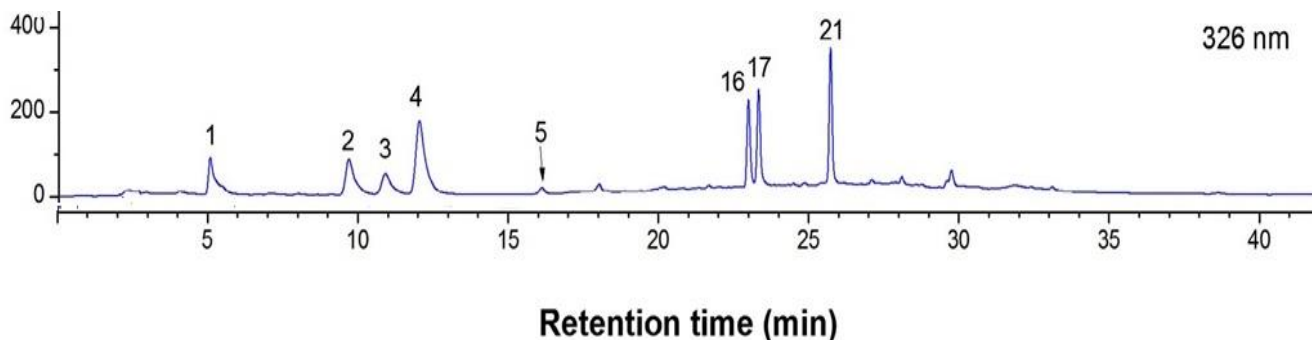


Figura 28. Cromatograma de HPLC-DAD de ácidos fenólicos, (pico 1) 3-CQA, (pico 2) ChA, (pico 3) 4-CQA, (pico 4) CA, (pico 16) 3,4-diCQA, (pico 17) 3,5-diCQA y (pico 21) 4,5-diCQA

Como se puede observar, en este estudio al compáralo con el de Chunying se confirme que en hojas de camote se encuentra la presencia del ácido clorogénico (ChA), el ácido cafeico (CA), así como el 3,5; 4,5- di-cafeoil-quinico

7.3.2. Identificación de antocianinas por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

- **Cromatografía en capa fina para antocianinas**

De los 22 extractos obtenidos, se realizó una identificación cualitativa por cromatografía en capa fina, donde se puede observar que las muestras que presentaron menos de 0.5 mg Antocianinas totales/g, fueron las mismas que presentaron una coloración muy tenue en la placa y por lo tanto no se logra ver una separación, estas muestras fueron la 8, 11, 12, 15, 16, 17, 19 y 20, el resto de las muestras en donde es más visible la presencia de las antocianinas presentaron perfiles diferentes además de que no se logra ver una buena separación, solo las muestras de Puebla (6) y del jardín botánico JC149 (7) muestran un perfil igual, en paralelo a la muestra de Puebla Ojo amarillo (10) y la de jardín botánico JC172 (18).

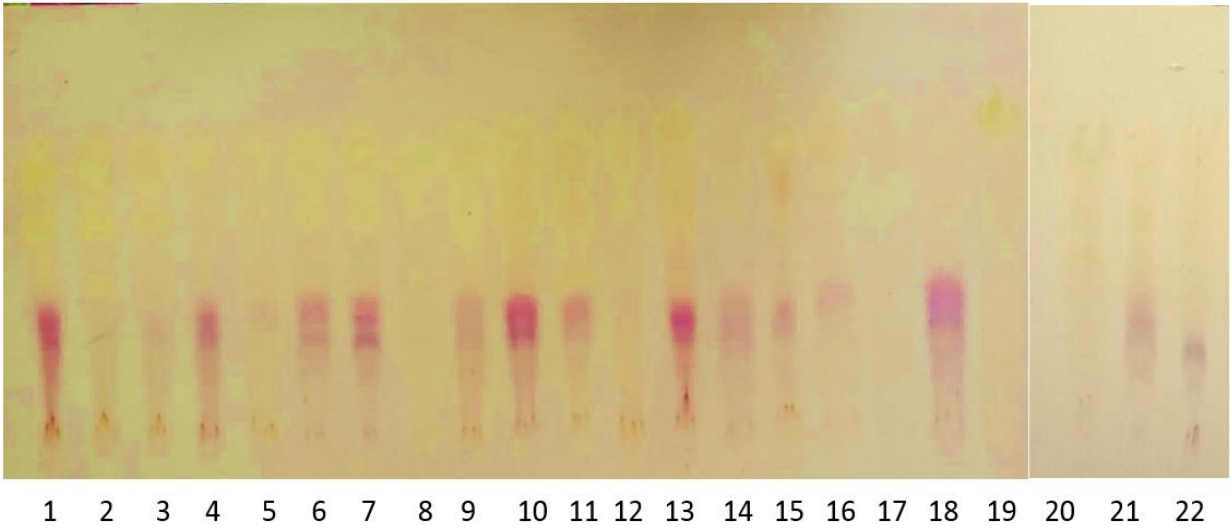


Figura 29. Cromatografía en capa fina del extracto de antocianinas obtenido de diferentes muestras de hojas moradas, eluido con Butanol: Ácido acético: Agua 6:1:3

El perfil de antocianinas es importante ya que este puede variar de una hoja a otra además de que pueden tener antocianinas diferentes o una puede predominar más que otra, lo cual nos podría dar una gama diferente de antocianinas.

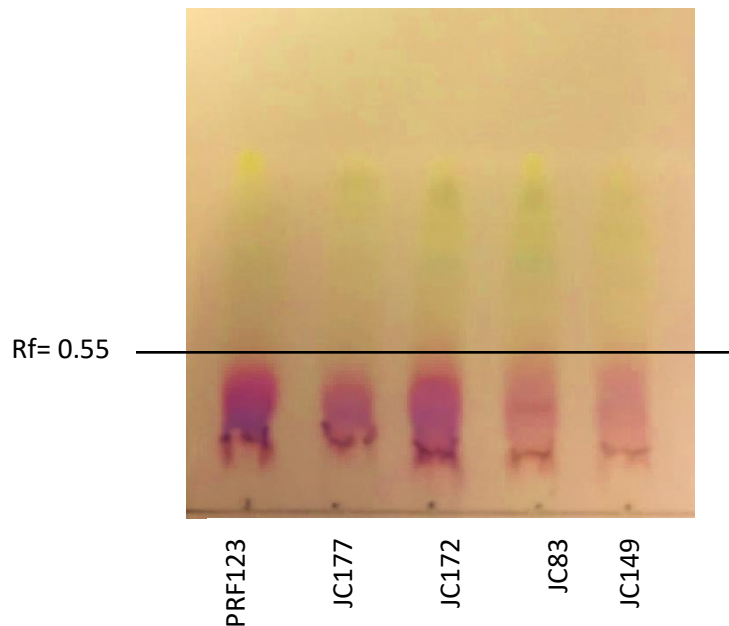


Figura 30. Cromatografía en capa fina del extracto de antocianinas obtenido de las hojas con mayor concentración de antocianinas totales, eluido con Butanol: Ácido acético: Agua 6:1:3

Las hojas de mayor cantidad de antocianinas fueron la PRF123, JC177, JC172, JC83 y JC149 por lo cual fueron las que se consideraron para sacar el Rf teniendo uno de 0.55, por lo que se puede tratar de peonidina 3, 5 glucósido ya que tiene valores cercanos a los reportados de 0.56 (figura 30).

En cuanto perfil se pudo observar que las muestras, PRF123, JC177 y JC172, son las que más igualdad tienen entre si, y las CJ83, JC149 entre ellas. Pero cabe recalcar que todas presentan el mismo Rf que indica la presencia de peonidina 3, 5 glucósido.

- **Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para antocianinas**

Las muestras que presentaron la mayor concentración de antocianinas totales fueron las que se utilizaron para realizar la identificación parcial de estas mismas. En el HPLC se determinó por tiempo de retención el perfil de antocianinas de acuerdo a lo reportado [Torres, 2016], ver figura 31, en donde se identificaron tentativamente 5 antocianinas. Las muestras analizadas fueron las que presentaron una alta concentración de antocianinas totales.

Tabla 13. Antocianinas presentes en *Ipomoea batatas*

Pico	Antocianina
1	Cianidina 3-p-hidroxibenzoil-soforosido-5-glucosido
2	Cianidina 3-(6''feruloil soforosido)-5-glucosido
3	Peonidina 3-(feruloil-p-cumaril soforosido)-5-glucosido
4	Cianidina-3-(6''-cafeoil-6'''-p-hidroxibenzoil soforosido)-5-glucosido
5	Cianidina-3-(6'6''-dicafeoil soforosido)-5-glucosido
6	Cianidina-3-(6''-cafeoil-6'''feruloil soforosido)-5-glucosido
7	Peonidina3-(cafeoil-p-hidroxibenzoil soforosido)-5-glucosido
8	Peonidina-3-(6''-cafeoil-6'''feruloil soforosido)-5-glucosido

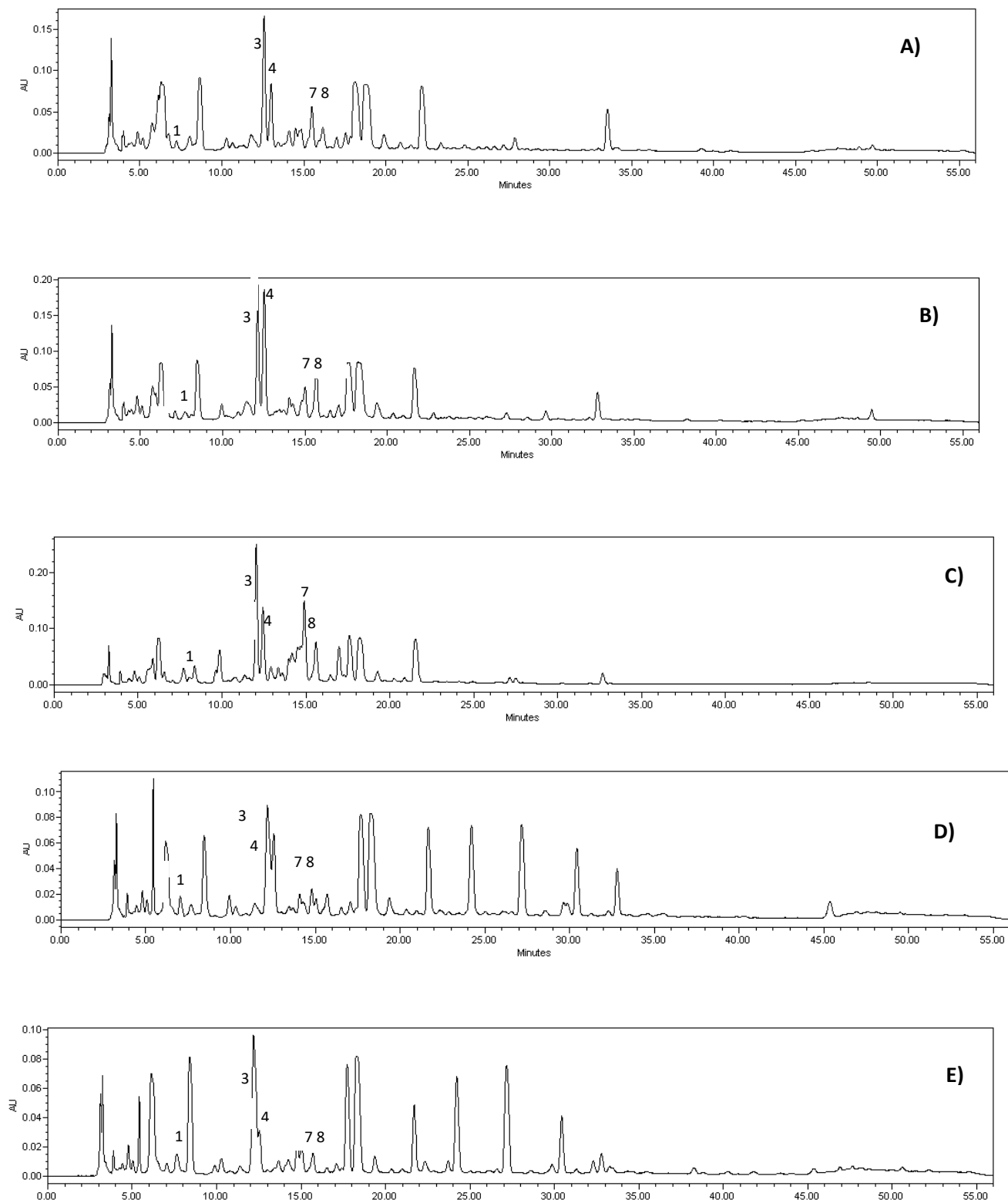


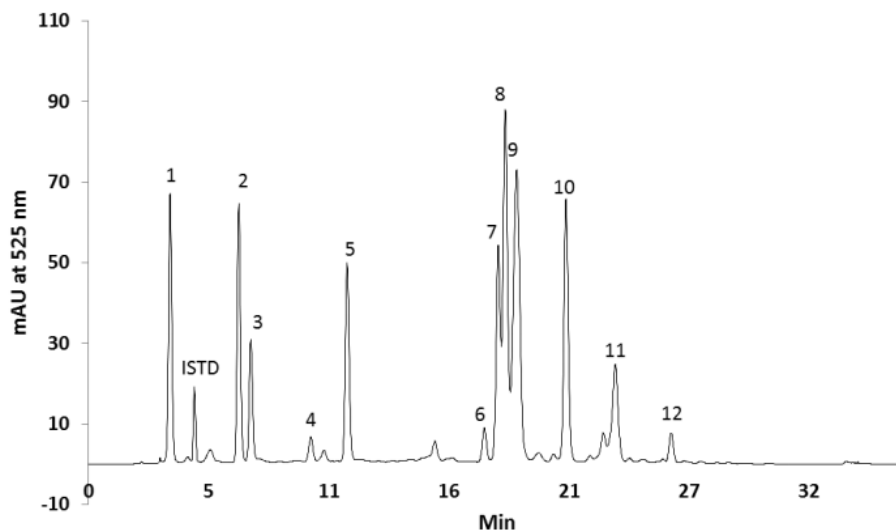
Figura 31. Cromatograma de las cinco muestras de hojas. **A)** JC177, **B)** JC172, **C)** PRF123, **D)** JC149 y **E)** JC83

Como se muestra en la tabla 13 las antocianinas identificadas son cianidina y peonidina las cuales están mono o di aciladas con ácido caféico, ferúlico, p-cumárico y p-hidroxibenzoico, estas antocianinas al estar combinadas con los diferentes azúcares y aciladas con los ácidos anteriormente mencionados pueden formar distintas variedades de estas antocianinas las cuales podemos encontrar en las hojas.

Las antocianinas identificadas en hojas fueron solo 5 (pico 1, 3, 4, 7 y 8) en donde estas antocianinas también se han encontrado en la raíz a acepción de Cianidina-3-(6''-cafeoil-6''-p-hidroxibenzoil soforosido)-5-glucosido (pico 4). El pico 3 y 7 que son Peonidina3-(..)-5-glucosido fue una de las antocianinas que también se pudo observar por cromatografía en capa fina.

En los cromatogramas se observa que el perfil de las muestras JC177, JC172 y PRF123 son parecidos, mientras que las muestras JC149 y JC83 son parecidas entre sí, sin embargo todas presentan el pico 3 en el límite de detección, lo cual nos podría dar una idea de que Peonidina 3-(feruloil-p-cumaril soforosido)-5-glucosido está en mayor concentración que Peonidina3-(cafeoil-p-hidroxibenzoil soforosido)-5-glucosido, sin embargo esto es solo cualitativo.

Se encontró que en el extracto de camote de la variedad p40, presenta doce distintas antocianinas [Jianteng Xu, 2013] de las cuales cuatro son las mismas identificadas en hojas y aun que no coinciden en los tiempos de retención ya que se utilizó diferente concentración de fase móvil, si son iguales en orden de elución. Las antocianinas fueron: Cianidina 3-p-hidroxibenzoil-soforosido-5-glucosido, Peonidina 3-(feruloil-p-cumaril soforosido)-5-glucosido, Peonidina3-(cafeoil-p-hidroxibenzoil soforosido)-5-glucosido y Peonidina-3-(6''-cafeoil-6''feruloil soforosido)-5-glucosido.



Peak number	Retention time (min)	Compound Identity	R1*	R2*	R3*	Parent ion, product ion (m/z)	% Peak area
1	3.618	Cyanidin 3-sophoroside-5-glucoside	H	H	H	773, 611 449 287	9.25
2	6.668	Cyanidin 3-p-hydroxybenzoyl sophoroside-5- glucoside	H	pHB	H	893, 731 449 287	8.83
3	7.203	Cyanidin 3-(6'' -caffeoyl sophoroside)-5-glucoside	H	Caf	H	935, 773 449 287	4.74
4	9.847	Peonidin 3-p-hydroxybenzoyl sophoroside-5- glucoside	CH3	pHB	H	907, 745 463 301	1.29
5	11.484	Cyanidin 3-(6'' -feruloyl sophoroside)-5-glucoside	H	Fr	H	949, 787 449 287	8.09
6	17.582	Peonidin 3-(6'' -feruloyl sophoroside)-5- glucoside	CH3	Fr	H	963, 801 463 301	1.72
7	18.199	Cyanidin 3-(6'' ,6'' ' -dicafeoyl sophoroside)-5- glucoside	H	Caf	Caf	1097, 935 449 287	9.56
8	18.510	Cyanidin 3-caffeoyl-p-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside	H	Caf	pHB	1055, 893 449 287	16.43
9	19.017	Peonidin 3-caffeoyl sophoroside-5- glucoside	CH3	Caf	H	949, 787 463 301	19.72
10	21.209	Cyanidin 3-(6'' -caffeoyl-6'' ' -feruloyl sophoroside)-5-glucoside	H	Caf	Fr	1111, 949 449 287	12.10
11	23.404	Peonidin 3-caffeoyl-p-hydroxybenzoyl sophoroside-5-glucoside	CH3	Caf	pHB	1069, 907 463 301	6.32
12	25.884	Peonidin 3-(6'' -caffeoyl-6'' ' -feruloyl sophoroside)-5-glucoside	CH3	Caf	Fr	1125, 963 463 301	1.53

Figura 32. Antocianinas identificadas en HPLC de camote de la variedad p40 [Jianteng Xu, 2013]

8. CONCLUSIÓN

Se encontró que hay una mayor concentración de compuestos bioactivos (antocianinas y fenoles) en las hojas secadas por liofilización ya que este método mantiene las características del producto y no altera los compuestos termolábiles.

De las 22 muestras de hojas moradas, 5 fueron las que presentaron el mayor contenido de antocianinas totales y a su vez fueron las que presentaron valores altos de fenoles, siendo JC149, JC177, JC172, JC83 y PRF123.

Estas muestras presentaron una alta o igual actividad antioxidante con respecto al Trolox que fue la referencia, lo cual indica que tienen una alta actividad antioxidante, se determinó *in vitro* por dos métodos DPPH y ABTS. En ambos métodos se mantiene la misma tendencia de actividad antioxidante.

En las cinco muestras se identificaron los ácidos hidroxicinámicos e hidroxicinamoilquínicos los cuales fueron 8 ácidos, el cafeico; clorogénico; 1,5; 1,3; 3,4; 4,5 y 3,5 di-O-cafeoil- quínico y 3,4,5 tri--O-cafeoil- quínico.

Las antocianinas encontradas fueron cianidina y peonidina las cuales están mono o di aciladas con ácido caféico, ferúlico, p-cumárico y p-hidroxibenzoico, estas antocianinas al estar combinadas con los diferentes azúcares y aciladas con los ácidos anteriormente mencionados pueden formar distintas variedades de estas antocianinas como la Peonidina3-(cafeoil-p-hidroxibenzoil soforosido)-5-glucosido entre otras como se puede ver en la tabla 13.

9. Bibliografía

- Aguilera Ortiz M, (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas, *Bio revista Tecnia*. 8 (2). Pp 16-22.
- Aguilar Cipriano P., Ekice L. and Barnes C. (2015). Pre-heating and polyphenol oxidase impaction extraction of purple sweet potato anthocyanins, *Food Chemistry*, 180, 227-234 pag.
- Alam M. N., Brisit N. J. and Rafiquzzaman M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21. Pp 143-152.
- Alvarez E., Jimenez O., Posada C., Rojano B., Gil J., Garcia C. and Durango D. (2008). Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del genero vismia (Guttiferae). *Facultad de química farmacéutica*. 15 (81). Pp 165-172.
- An L. V., Frankow- Lindberg B. E and Lindberg J. E. (200). Effect of harvesting interval and defoliation on yield and chemical composition of leaves, stems and tubers of sweet potato (*Ipomoea batatas L*) plant parts. *Field Crops Research*. 82. Pp 49-58.
- Arena E., Fallico B. and Maccarone E. (2011). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juice as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*. 74. Pp 423-427.
- Badui D. (2006). Química de los alimentos. Editorial Pearson Educación. México.
- Basurto F., Martínez D., Rodríguez T., Evangelista V., Mendosa M., Castro D., Gonzales J. C. and Vaylón V. (2015). Conocimiento actual del camote (*Ipomoea batatas L*) en México. *Agroproductividad*. 8 (1). Pp 30-34.
- Benzie I.F. and Choi S. W. (2014). Antioxidants in food: Content, measurement, significance, action, caution, caveats and research needs. *Advances in Food and Nutrition Research*, 71. Pp. 1-49.
- Bors W., Heller W. and Chista M. (2001). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*. Pp 343-355.

- Boscaiu M., Sanchez M., Bautista I. and Donat P. (2010). Phenolic compounds as stress markers in plants from Gypsum Habitats. *Bulletin UASVM Horticulture*. 67 (1). Pp 44-49.
- Brouillard R. (2003). Chemical Structure of anthocyanins. *En anthocyanins as food colors*. Academic Press. Pp 1-38.
- Campbel G.M., Hernández P. and Miller J. C. (2003) The effect of day length temperature and comparative flower induction techniques on flowering and seed-set in *Ipomoea batatas*. *Agricultural Workers Association*. Pp 173-174.
- Carvalho I. S., Cavaco T., Carvalho L. M. and Duque P. (2010). Effect of photoperiod on flavonoid pathway activity in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L) Lam) leaves. *Food Chemistry*, 118 (2), 384-390.
- Castañeda A., and Guerrero J. A., (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. Departamento de ingeniería química. Pp 25-33
- Cevallos-Casals, Cisneros-Zeballos. (2004). Stability of Anthocyanin-based Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Food Chemistry*. 86. Pp 69-77.
- Chávez M. (2014) Evaluación de la estabilidad de las antocianinas aciladas obtenidas de camote morado, el rábano y la campanilla roja. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Chunying L., Xixi W., Ge G., Wang L., Yongxin L. and Chengjun S. (2013). Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC-DAD and HPLC-ESI- MS/MS. *Food Chemistry*. 141. Pp 2697-2706.
- Cipriano P.A, Ekici L, Barnes R.C, Gomes C and Tacott S. (2015). Preheating and polyphenol oxidase inhibition impact on extraction of purple sweetpotato anthocyanins. *Food Chemistry*, 180. Pp. 227-234.
- Cook H.T. (2009). Sweet potato diseases U.S. *Department Agriculture Farmers Bulletin*. Pp 1059.
- Contreras G. J. (2001). Camote. En recursos genéticos disponibles en México. Ed. Tarcicio Cervantes S. Sociedad Mexicana de Fititecnia. A.C.

- Conabio, La diversidad biológica de México 2008, [en línea](Actualizado al 19 diciembre 2008) Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/db_mexico.html [ultimo acceso el 20 de Abril 2017}
- Corrales M., S. Toepfl, Butz P., Knorr D., Tauscher B, (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonic, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Vol 9, 85-91.
- Criollo K., Molina N. (2016). Evaluación de la estabilidad de de extractos obtenidos a partir de distintos tipos de secado de *Jungia rugosa*.
- Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivo 2008, [en línea] (Actualizado al 14 Agosto 2008) Disponible en: http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/36659430/antocianinas_de_la_fresa.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56TQJRTWSMTNPEA&Expires=1473564848&Signature=L8rkh4dV0QDMHtelQ9ARrjKOcQY%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DLAS_ANTOCIANINAS_COMO_COLORANTES_NATURAL.pdf [ultimo acceso el 13 Febrero de 2017]
- Deng J., Cheng W., Yang G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*. 125. Pp 1430-1435.
- Den Truong V., Nigel D., Thompson R.T., Mcfeeters R.F., Dean L.O., Pecota K. V. and Yencho G. C. (2010). Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-fleshed sweet potatoes by HPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 58 (1). Pp 404-410.
- Dos Santos A., De Miranda A., Trugo L, and De Quino N. (2003). Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. *Journal of Biosciences*. 58 (7). Pp 590-593.
- Dziejczak S. Z. and Hudson, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*. 2002, 14. Pp 45-51.

- Emejulu V. N, (2013). Evaluation of Phytochemical composition and antimicrobial activity of sweet potato (*Ipomoea batatas*) Leaf. *Journal of Nutrition*. 12 (6). Pp 575- 586.
- Folquer F. La batata (camote) estudio de la planta y su producción comercial. Editorial hemisferio sur, Costa Rica.
- García E., Fernández S. and Fuentes L. (2011). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Universidad politécnica de Valencia*.
- Garzón A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica Colombiana*. 13. Pp 27-36.
- González O., Hernández M., Silvia J., Espinosa A., and Ros C. (2011). Biotecnológicas aplicadas al cultivo del boniato *Ipomoea batatas*. Pp. 9-13.
- Gutiérrez M. (2008), Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos físico-químicos, *Sistema de Información Científica Redalyc*. 10 (2). Pp 35-44pag.
- Harborne J. B., Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 52. Pp 481-504.
- Havsteen B. (2000). Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*. 32. Pp 1141-1148.
- Heller L. (2015). Dando color a las bebidas. *Énfasis Alimentacion*. 4. Pp 46-50.
- Huang M. A., Ou B., Prior R. L. (2011). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53. Pp 1841-1856.
- Ishida H., Suzuno H., Sugiyama N., Innami S., Tadokoro T. & Maekawa A. (2000). Nutritive evaluation on chemical components of leaves, stalks and stems of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* *poir*). *Food Chemistry*. 68. Pp 359-367.

- Islam S, (2014). Nutritional and medicinal qualities of sweet potato tops and leaves. *Plant Science*
- Jianteng Xu,(2013). Identification and stability of acylated anthocyanins in purplefleshed sweetpotato p40. Thesis of master of science. Kansas state university.
- Jung K. L., Lee S. U., Kozukue N., Levin C.E and Friedman M. (2011). Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomea batatas L.*) plants and in home processed roots. *Journal Food Composition and Analysis*. 6. Pp 29-37.
- Kühnau J. (2000). The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*. Pp 117-190
- Kuskoski E. M., Asuero A .G., Troncoso A. M., Mancini-Filho J. and Fett R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianínicos. *Revista Brasileña de ciencia y tecnología de alimentos*. 24 (4). Pp 691-693.
- Lacueva C., Medina R. A., Llorach R., Urpi Sarda M., Khan N., Chiva Blanch G., Zamora Ros R., Rotches Ribalta M. and Larnuela Raventós R. M. (2010). “Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables”, Department, Pharmacy School, University of Barcelona. Pp 53-77.
- Lebota V., Michaletb S., (2016) Identification and quantification of phenolic compounds responsible for the antioxidant activity of sweet potatoes with different flesh colours using high performance thin layer chromatography (HPTLC) Legendreb. *Journal of Food Composition and Analysis* 49 (2016) 94–101.
- León J. (1989). Botánica de los cultivos tropicales. Ed IICA. San José costa rica.
- Linares, E, R. Bye, Pereda M. (2008). El camote. CONABIO. *Biodiversitas*, 81. Pp 11-15.
- Long J., Chia Chi L, Ting Chen L., Su Yue L., Jih Min S. (2014). Effects of drying on caffeoylquinic acid derivative content and antioxidant capacity of sweet potato leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*. 23. Pp 701- 708.

- Martínez M. (2006). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas. Fondo de cultura económica. 1° edición. Pp 140-141.
- Martínez S., Martínez J., Pedraza R., García Y. (2001). Influencia del método de secado del follaje y el solvente de extracción en la cuantificación de polifenoles extractables totales. CEDEPA. Pastos y Forrajes Vol. 24, No. 4.
- Marecek V., Mikyska A., Hampel D., Cejka P., Neuwirthova J., Malachova A and Cerkal R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*. 73. Pp 40-45.
- Merck S.A. (2000). Industrias químicas: Bioflavonoides: Quercetina y Rutina. Informe a profesionales.
- Montilla E. C., Hillebrand S., Butschbach D., Baldermann S., Watanabe N. and Winterhalter P., (2010). Preparative isolation of anthocyanins from Japanese purple sweet potato (*Ipomoea batatas L*) varieties by high-speed countercurrent chromatography. *Journal. Agricultural Food Chemistry*. 58. Pp 9899-9904.
- Munguía R. (2001). Estudios preliminares sobre la composición y aprovechamiento de camote (*Ipomoea batatas L.*). *Industria Alimentaria*. 8 (3). Pp. 4-7.
- Miller N. J., Papaganda G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20 (7). Pp 933-956.
- Ojha H., Mishra K., Chaudhury N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*. 130. Pp 1036-1043.
- Odake K., Terahara N., Saito N., Toki K and Honda T. (1992). Chemical structures of two anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Phytochemistry*. 31 (6). Pp 2127-2130.
- Peres W. (2001). Radicais Livres em níveis biológicos. Ed. Universidad Católica de Pelotas, Brasil. Pp 49-81.

- Peñarrieta J., Tejeda L., Mollinedo P., Vila J. and Bravo A., (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*. 31 (2).
- Ramirez T., Andersen O. M., Gardner P. T., Morrice P.C., Wood S. G. (2001). Anthocyanin-rich extract decreases índices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 31 (9). Pp 1033-1037.
- Robbins R. J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (10). Pp 2866-2887
- Salinas M. Y., Soria R.J and Espinosa T.E (2010). Aprovechamiento y distribución de maíz azul el estado de México.
- Soto H, M. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lipia greveolens hbk var. Berlandieri Shafer*). *Fitotecnia Mexicana*. 30 (1). Pp 43-49.
- Stathers^{V5} T., Bechoff A., Sindi K., Low J. and Ndyetabula D. (2013). Everything you ever wanted to know about sweetpotato: Reaching agents of change ToT manual 5: Harvesting and postharvest management, processing and utilization, marketing and entrepreneurship. *International potato center*, Nairobi, Kenya. 5.
- Stathers^{V1} T., Low J., Carey T., Mwanga R., Njoku J., Tumwegamire S., Malinga J. and Andrade, M. (2013). Everything you ever wanted to know about sweetpotato: Reaching agents of change ToT manual 1: Helping adults to learn; origin and importance os sweetpotato: sweetpotato varietal selection and characteristics. *International potato center*, Nairobi, Kenya. 1.
- Strack D. and Wray V. (2009). Anthocyanins. *Methods in plant biochemistry*. Plant phenolics. H. B Harborne. 1. Pp 325-356.
- Taira J., Taira K., Ohmine W. and Nagata J. (2013). Mineral determination and anti-LDL oxidation activity of sweet potato (*Ipomoea batatas L.*) leaves. *Journal of Food Composition and Analysis*. 29. Pp 117-125.
- Terahana N., Matsui T. (2008). Structures and functionalities of Acylated anthocyanins. *American Chemical Society*. 9. Pp 90-101

- Tique J., Chaves B. and Zurita H. (2009). Evaluación agronómica de diez clones promisorios CIP y dos materiales nativos de *Ipomoea batatas* L. *Agronomía Colombiana*. 27 (2). Pp 151-158
- Tiwari B., O Donnell C., Cullen P. (2009). Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*, 93. Pp 166-171.
- Torres, A. (2016). Caracterización y cuantificación de compuestos bioactivos en *Ipomoea Batatas* (L) LAM variedad morada y en un snack de camote. Tesis de Maestría. UNAM.
- Takahata Y., Yumi K., Tanaka M., Nakayama H. and Yoshinaga M. (2011). Enlargement of the variances in amount and composition of anthocyanin pigments in sweetpotato storage roots and their effect on the differences in ADPPH radical-scavenging activity. *Scientia Horticulturae*. 127. Pp 469-474.
- Wallace T., and Giusti M. (2014). Anthocyanins in health and disease.
- Wang S, Nie S and Zhu, (2016). Chemical constituents and health effects of sweet potato. *Food Research International*. 89. Pp 90-116.
- Williams W., Cuperlier M. E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*. 28 (1). Pp 25-30
- Wrolstad R. (2004). Anthocyanin Pigments-bioactivity and Coloring Properties. *Journal Food Science*. 69 (5). Pp 419-425
- Yang, Z., and Zhai, W. (2010). Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (1). Pp 169–176
- Yoshinaga M., Yamakawa O. and Nakatani M. (1999). Genotypic diversity of anthocyanin content and composition in purple-fleshed sweetpotato (*Ipomoea batata* L). *Breeding Science*. 49 (1). Pp 43-47.
- Zuleta A., Esteve M., Frigola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food chemistry*. 144 (1). Pp 310-316.

10.ANEXOS

Anexo I. Fundamento Folin-Ciocalteu para la medición de fenoles totales

Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 750 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles [García E, 2011]

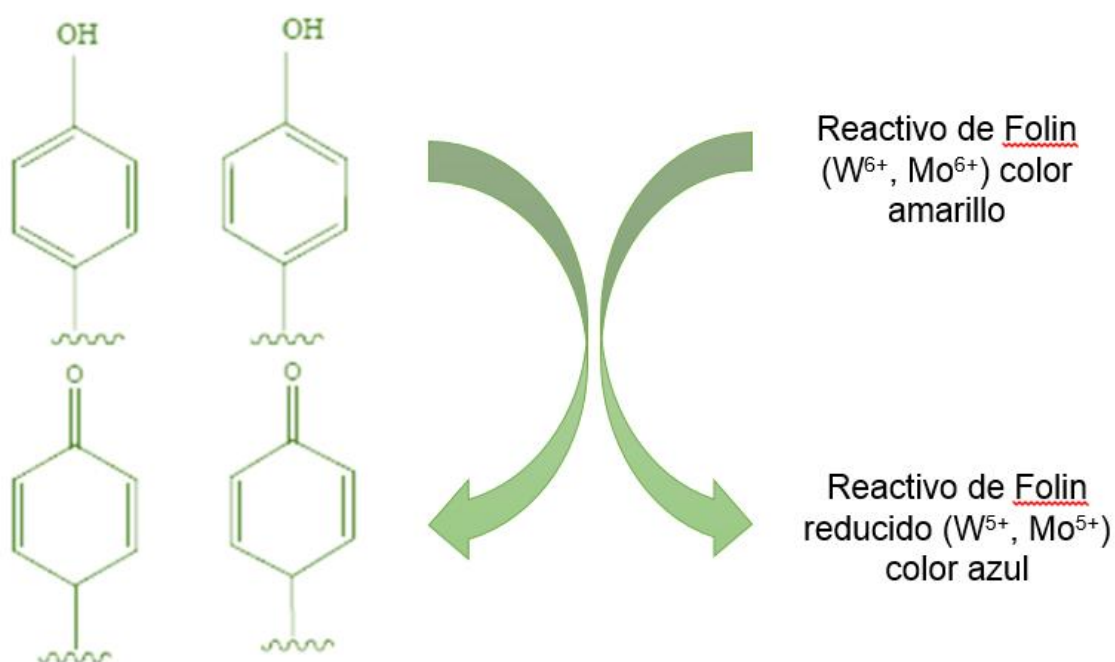


Figura 31. Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu [García, 2011]

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 750 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico [Andrés, 2010].

Anexo II. Fundamento pH-diferencial para la medición de antocianinas totales

Para la obtención de la concentración de antocianinas totales se utiliza el método de pH diferencial. Las antocianinas experimentan una transformación reversible con los cambios de pH manifestando por un llamativo cambio en la absorbancia. La formación de un catión flavilio a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. El pH diferencial es el método basado en esta reacción, y permite una rápida medida de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes [Leyva, 2009]

Este método fue utilizado por Fuleki y Francis en 1968 para medir el contenido de antocianinas en arándano.

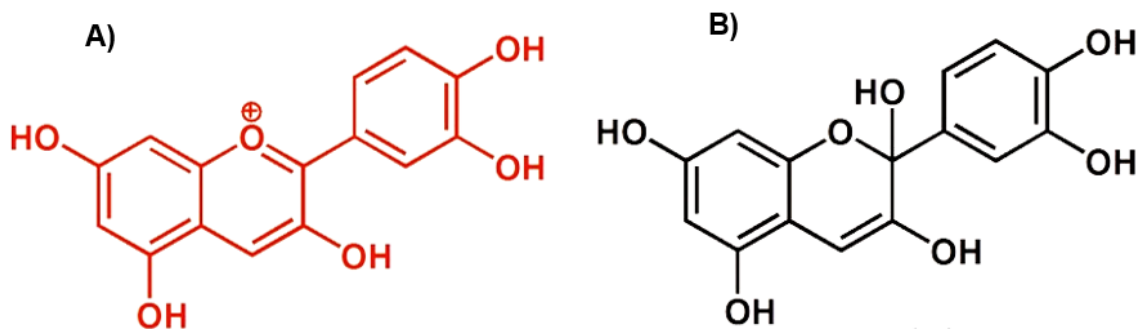


Figura 32. Cambios de estructuras que sufren las antocianinas a diferentes pH. **A)** Catión flavilio a pH 1 (color rojo), **B)** Hemiacetal a pH 4.5 (incoloro)

Anexo III. Fundamento DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil)

Este método fue propuesto por Blois (1958) en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno (H) proveniente de una molécula de cisteína.

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la Figura 3.17, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes. Después de aproximadamente tres décadas este ensayo comenzó a utilizarse rutinariamente para la caracterización de las propiedades antioxidantes.

El procedimiento original para el ensayo DPPH ha sido modificaciones a conveniencia, una revisión detallada de la 16 literatura ha revelado que la mayoría de los estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 minutos requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox [Ojha *et al.*, 2012].

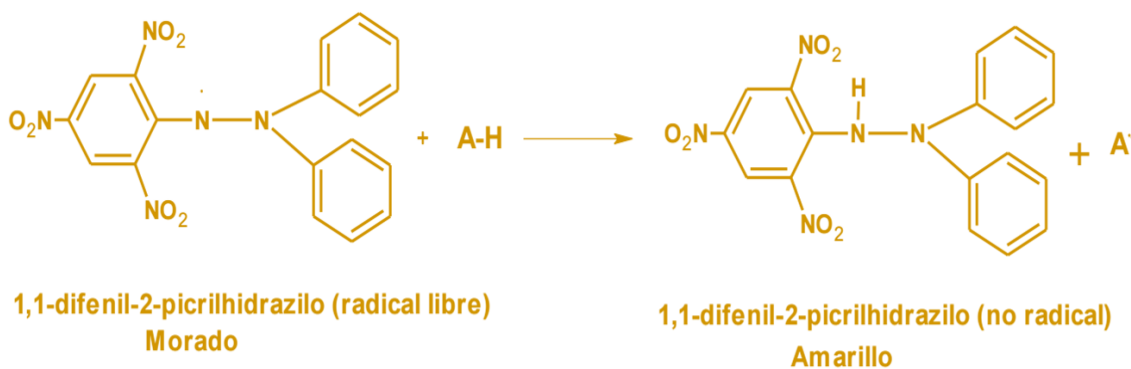


Figura 33. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante [Alam *et al.*, 2012].

Los resultados del ensayo DPPH se han presentado de diferentes maneras. La mayoría de los estudios expresan los resultados como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC_{50}), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor IC_{50} cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH usado [Deng et al., 2011].

Anexo IV. Fundamento ABTS (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico])

La generación del radical ABTS constituye la base de uno de los métodos espectrométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas.

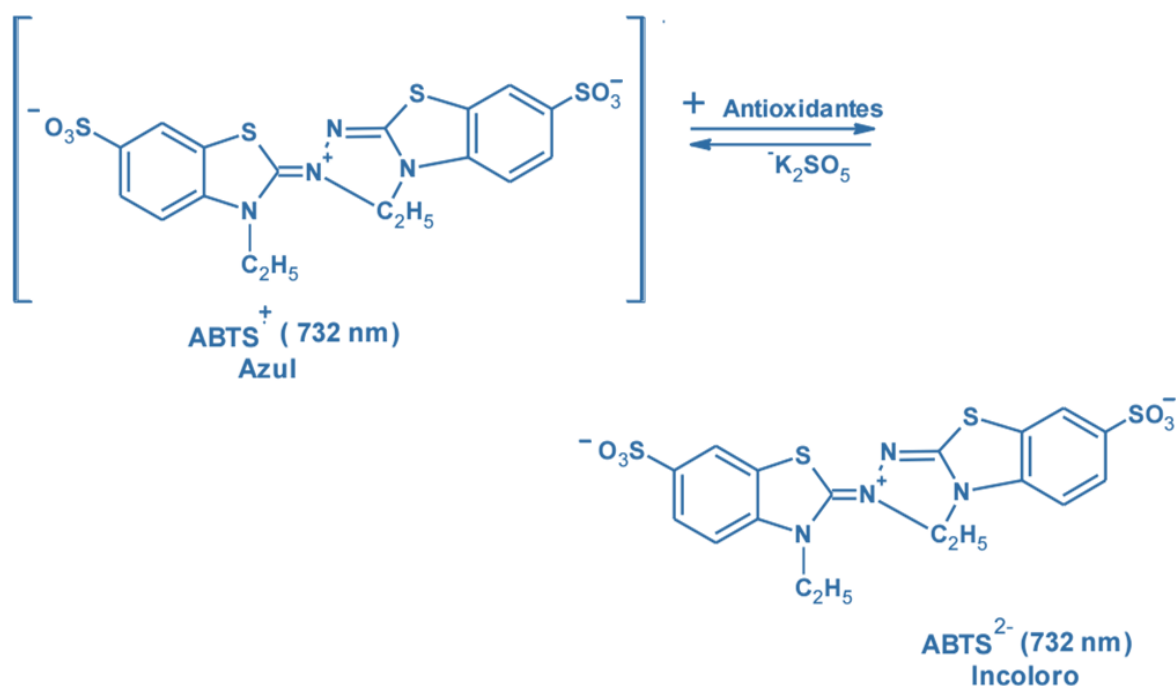


Figura 34. Estructura del ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante [Zuleta et al., 2009].

Se basa en la generación del catión $ABTS^+$, por la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condicione

Anexo V. Análisis estadístico para el método de secado

FENOLES TOTALES:

Anova

RESUMEN

GRUPOS	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ESTUFA	2	88.08	44.04	0.005
MICROONDAS	2	183.02	91.51	0.1058
LIOFILIZADO	2	237.55	118.775	0.37845

ANÁLISIS DE VARIANZA

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
ENTRE GRUPOS	5721.4009	2	2860.70045	17541.3415	7.9065E-07	9.5520945
DENTRO DE LOS GRUPOS	0.48925	3	0.16308333			
TOTAL	5721.89015	5				

Tukey

	estufa	microondas	liofilizadas
estufa		47.47	74.735
microondas			27.265
liofilizadas			

HSD=	1.68763014
Multiplicador	5.91
MS	0.16308333
n=	2

ANTOCIANINAS TOTALES

Anova

RESUMEN

GRUPOS	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
ESTUFA	2	1.281	0.6405	0.0000125
MICROONDAS	2	4.84	2.42	0.045
LIOFILIZADOS	2	6.21	3.105	0.00045

ANÁLISIS DE VARIANZA

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
ENTRE GRUPOS	6.47307033	2	3.23653517	213.573946	0.00058245	9.5520945
DENTRO DE LOS GRUPOS	0.0454625	3	0.01515417			
TOTAL	6.51853283	5				

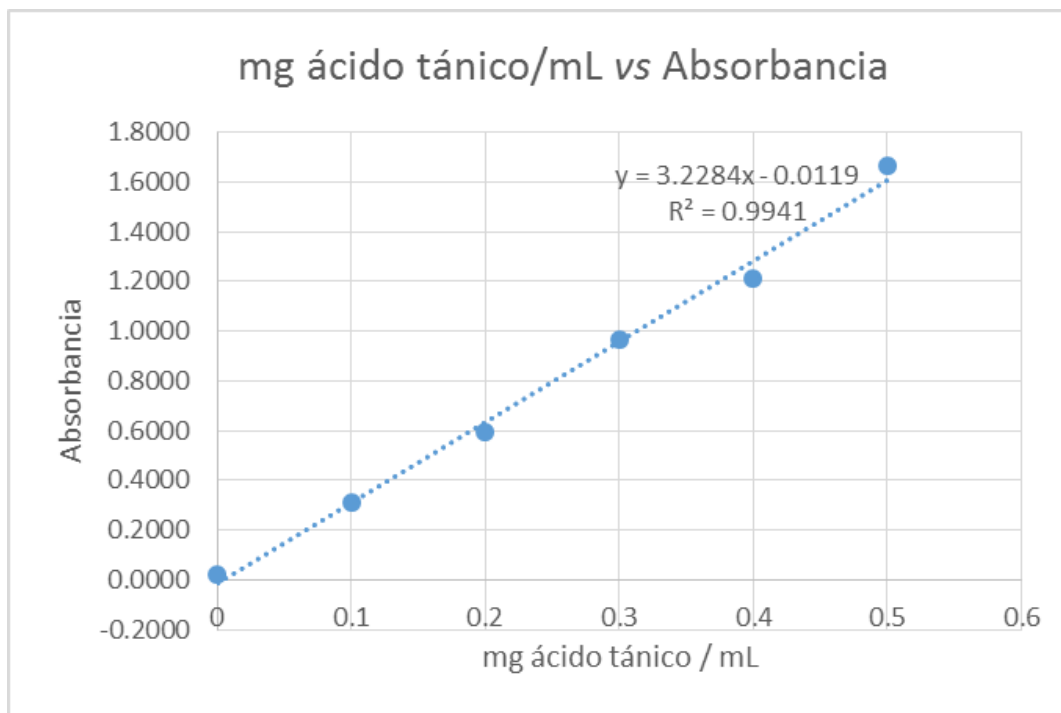
Tukey

	estufa	microondas	liofilizadas
estufa		1.7795	2.4645
microondas			0.685
liofilizadas			

HSD=	0.51444448
Multiplicador	5.91
MS	0.01515417
n=	2

Anexo VI. Curva de ácido tánico y análisis estadístico de fenoles

CURVA



Análisis estadístico

Anova

RESUMEN

GRUPOS	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
JC 174	2	99.8580467	49.9290233	1.66693074
FB2543	2	58.0538859	29.0269429	2.11098401
FB 2545	2	214.376119	107.188059	22.2117711
JC 83	2	208.403648	104.201824	4.09483732
FB2617	2	66.6284986	33.3142493	30.6647006
FB2419	2	82.1362108	41.0681054	3.25224285
JC 149	2	108.671983	54.3359915	0.04372011
JC152	2	40.25	20.125	5E-05
JC 177	2	243.627552	121.813776	4.20480217
OJO	2	221.004958	110.502479	0.92938611
AMARILLO				
FB2747	2	211.07	105.535	5E-05
FB2748	2	198.74	99.37	0.0002

AMARILLO SN FENIX	2	192.941317	96.4706585	0.05529077
MORADO YACAPIXTLA	2	192.96	96.48	0.0008
FB2745	2	196.78	98.39	0.0002
FB2728	2	21.33	10.665	0.14045
JC185	2	204.98	102.49	0.0002
JC 172	2	314.191145	157.095573	3255.3155
FB2636	2	202.57	101.285	0.00605
FB2723	2	216.17	108.085	0.00045
PRF123	2	237.57	118.785	0.00045
FB2748	2	21.03	10.515	0.34445

ANÁLISIS DE VARIANZA

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
ENTRE GRUPOS	72343.8614	21	3444.94578	22.7933279	1.9563E-10	2.05872841
DENTRO DE LOS GRUPOS	3325.04352	22	151.138342			
TOTAL	75668.9049	43				

Tukey

	JC83	JC149	JC177	JC172	PRF123
JC83		49.8658325	17.6119519	52.8937486	14.583176
JC149			37.4777844	102.759581	34.4490085
JC177				35.2817966	3.02877591
JC172					38.3105726
PRF123					

HSD	49.8981244
MULTIPOLICADOR	5.74
MSE	151.138342
N	2

Anexo VII. Análisis estadístico de antocianinas

RESUMEN

GRUPOS	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
JC174	2	1.9099	0.95495	5E-09
FB2543	2	2.23	1.115	5E-05
FB2545	2	1.4699	0.73495	4.805E-06
JC83	2	3.72	1.86	0.0002
FB2617	2	1.74	0.87	0.0002
FB2419	2	2.02	1.01	0.0002
JC149	2	2.48	1.24	0.0002
JC152	2	0.091	0.0455	5E-07
JC177	2	3.02	1.51	0.0002
OJO AMARILLO	2	1.977	0.9885	0
FB2747	2	0.7742	0.3871	0
FB2748	2	0.432	0.216	0.000002
AMARILLO SAN FENIX	2	2.2967	1.14835	6.125E-06
MORADO YACAPIXTLA	2	1.7057	0.85285	1.25E-07
FB2745	2	0.53	0.265	5E-05
FB2728	2	0.7878	0.3939	2E-08
JC185	2	0.5604	0.2802	2E-08
JC172	2	3.22	1.61	0.0002
FB2636	2	0.176	0.088	2E-08
FB2723	2	0.3246	0.1623	2E-08
PRF123	2	6.257	3.1285	2.45E-05
FB2748	2	1.8523	0.92615	5E-09

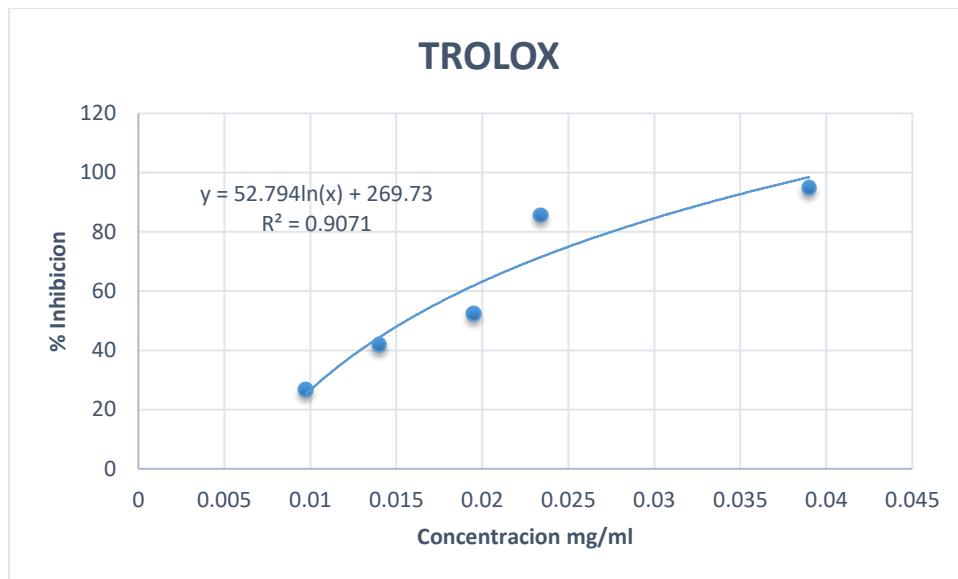
ANÁLISIS DE VARIANZA

ORIGEN DE LAS VARIACIONES	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
ENTRE GRUPOS	21.49932	21	1.02377714	16831.5819	1.3289E-41	2.05872841
DENTRO DE LOS GRUPOS	1.293015	22	6.0825E-05			
TOTAL	21.5006581	43				

	JC149	JC83	JC 177	JC172	PRF123
JC149		0.62	-0.8529	0.37	1.8885
JC83			-0.94729	-0.25	1.2685
JC177				0.9229	2.7414
JC172					1.5185
PRF123					

HSD	0.981654623
MULTIPOLICADOR	5.74
MSE	0.059
N	2

Anexo VIII. Curva de Trolox para DPPH



Anexo IX. Curva de Trolox para ABTS

