



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINAMOIL-QUÍNICOS DE DIFERENTES  
FUENTES Y SU POTENCIAL EMPLEO PARA ESTABILIZAR ANTOCIANINAS DEL  
CAMOTE MORADO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

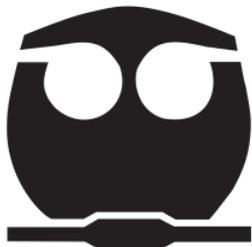
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**PAULINA MICHELLE CASTAÑEDA LÓPEZ**



**CDMX.**

**2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:**      **Profesor: Dr. Aguilar Osorio José Guillermo de Jesús**

**VOCAL:**            **Profesor: M. en E. Carreño Ortiz Hugo Rubén**

**SECRETARIO:**    **Profesor: Dr. Navarro Ocaña Arturo**

**1er. SUPLENTE:**   **Profesor: M. en C. Gómez Sierra Tania**

**2° SUPLENTE:**    **Profesor: M. en C. Pineda Loperena Jazmín**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

### **DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, LABORATORIO 321, CONJUNTO E.

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Arturo Navarro Ocaña

\_\_\_\_\_

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Andrea Torres Alcalá

\_\_\_\_\_

### **SUSTENTANTE:**

Paulina Michelle Castañeda López

\_\_\_\_\_

# Agradecimientos

A la Máxima Casa de Estudios: Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

Al apoyo económico del proyecto DGPA-PAPIIT IT201321.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por su dedicación y asesoría en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Andrea Torres Alcalá por su asesoría, transmitirme sus conocimientos en el ámbito experimental y su dedicación en la revisión de la redacción del presente escrito.

Al jurado asignado Dr. Guillermo Aguilar y M. en E. Hugo Carreño por aceptar la revisión de mi tesis y enriquecer mi investigación con sus comentarios.

## Índice

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	6
3.1. Fitoquímicos en alimentos .....	6
3.2. Polifenoles.....	8
3.3. Ácidos fenólicos .....	11
3.4. Ácidos AHCQ en los alimentos. ....	14
3.4.1 Ipomoea batatas (Camote morado).....	14
3.4.2 Coffea arábica y Coffea canephora (Café arábica y café robusta) .....	16
3.4.3 Ilex paraguariensis (Yerba mate) .....	18
3.4.4 Sambucus mexicana (Saúco) .....	19
3.5. Flavonoides .....	21
3.6. Antocianinas.....	22
3.7. Estructura química de las antocianinas .....	22
3.8. Estabilidad de las antocianinas .....	23
3.8.1. Efecto del pH .....	24
3.8.2. Temperatura .....	24
3.8.3. Copigmentación.....	25
3.9. Antocianinas en <i>Ipomoea batatas</i> .....	26
3.10. Métodos de extracción de los AHCQ.....	28
3.11. Aplicación de los AHCQ en los alimentos .....	29
3.12. Actividad antioxidante.....	30
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	32
5. HIPÓTESIS .....	32
6. OBJETIVOS .....	32

6.1.	Objetivo general.....	32
6.2.	Objetivos particulares .....	32
7.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	34
7.1.	Estrategia experimental.....	34
7.2.	Procedimiento experimental. ....	35
7.2.1.	ETAPA 1. Acondicionamiento de fuentes vegetales.....	35
7.2.2.	ETAPA 2. Cuantificación e identificación cualitativa de compuestos bioactivos.....	35
7.2.3.	ETAPA 3. Extracción e identificación de AHCQ. ....	37
7.2.4.	ETAPA 4. Evaluación de estabilidad de las antocianinas de <i>Ipomoea batatas</i> con extracto enriquecido de los AHCQ.....	38
7.2.5.	Etapa 5: Actividad Antioxidante .....	39
7.3.	Lista de material y equipo.....	39
7.4.	Análisis estadístico.....	40
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
8.1.	Etapa 2: Cuantificación de compuestos bioactivos.....	41
8.1.1.	Compuestos bioactivos en fuentes de AHCQ.....	41
8.1.2.	Compuestos bioactivos en el cultivo de <i>Ipomoea batatas</i> .....	43
8.1.3.	CCF de los compuestos bioactivos de AHCQ.....	46
8.2.	Etapa 3: Extracción e identificación de compuestos bioactivos. ....	47
8.2.1.	Extracción de AHCQ.....	47
8.2.2.	Identificación de AHCL .....	50
8.3.	Etapa 4: Evaluación de estabilidad de las antocianinas de <i>Ipomoea batatas</i> con los AHCQ.....	58
8.3.1.	Temperatura .....	59
8.3.2.	Luz.....	61
8.4.	Etapa 5: Actividad antioxidante .....	63
9.	CONCLUSIONES .....	65
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	67
11.	ANEXO .....	75

## ABREVIATURAS

AHCQ: Ácidos hidroxicinamoil-quínicos

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

FT: Fenoles Totales

AT: Antocianinas Totales

BS: Base Seca expresada en 1g

CCF: Cromatografía Capa Fina

AA: Actividad Antioxidante

DPPH: Difetil-Picril-Hidrazilo

TE: Transferencia de electrones

TAH: Transferencia de Átomos de Hidrógeno

RF: Factor de Referencia

$\lambda$ : longitud de onda

3-CQA: Ácido 3-cafeoil-quínico

5-CQA: ácido 5- cafeoil-quínico

4-CQA: Ácido 4-cafeoil-quínico

3,4-di-CQA: Ácido 3,4-di-cafeoil-quínico

3,5-di-CQA: Ácido 3,5-di-cafeoil-quínico

4,5-di-CQA: Ácido 4,5-di-cafeoil-quínico

3,4,5-tri-CQA: Ácido 3,4,5-tri-cafeoil-quínico

AC: Ácido cafeico

## 1. RESUMEN

Los ácidos hidroxicinamoilquínicos o AHCQ son compuestos bioactivos que pertenecen al subgrupo de los ácidos fenólicos de la familia de los polifenoles.

La estructura química de los AHCQ consta de la conjugación de los ácidos p-hidroxicinámicos con una o varias moléculas del ácido quínico dando lugar a diversas estructuras químicas. Se encuentran comúnmente en alimentos de origen vegetal tales como: el café (*Coffea* variedad *arábica* y *canephora*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*), sauco (*Sambucus mexicana*) y camote (*Ipomoea batatas*).

El presente trabajo tuvo como objetivo extraer la fracción de AHCQ de hojas de *Ipomoea batatas*, las hojas de *Coffea* variedad *arábica* y *Coffea canephora* (robusta), *Ilex paraguariensis*, así como de las flores, tallos y hojas de *Sambucus mexicana*. Por medio de la metodología de HPLC se determinó el perfil de composición de AHCQ. Adicionalmente, se evaluó si el extracto enriquecido de AHCQ tenía un efecto copigmentante sobre las antocianinas de la raíz de *Ipomoea batatas* y por último se calculó la actividad antioxidante de los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas*.

El estudio se realizó en 5 etapas:

- Etapa 1. Tratamiento de la muestra. Todo el material biológico se secó en estufa a 30°C, se trituraron y se tamizaron en la malla 60.
- Etapa 2 se cuantificó el contenido de FT y se realizó una identificación cualitativa por CCF del perfil de los AHCQ.

La concentración de FT en las hojas sin tratamiento y descafeinadas de *Coffea arábica*, *Coffea canephora*, flores, hojas y tallos de *Sambucus mexicana*, *Ilex paraguariensis* y hojas de *Ipomoea batatas* fue de 45.51±4.35 a 198.73±3.63 FT/BS, siendo las hojas y tallos de *Sambucus mexicana* las que tuvieron menor concentración y las hojas de *Coffea canephora* las de mayor concentración.

Se identificaron por CCF la presencia de 5-CQA y de isómeros del dicafeoil-quínico en todas las muestras vegetales.

Adicionalmente a la muestra vegetal de *Ipomoea batatas*, se le evaluó la concentración de FT y AT en cada uno de los órganos: tallos, flores, la raíz se clasificó en tres calidades

de acuerdo a la relación talla/calidad en primera (1ra), segunda (2da) y tercera (3ra) y las hojas de acuerdo al tamaño (XCH, Chicas, Medianas y Grandes) . La concentración de FT que se obtuvo fue de  $12.61\pm 1.15$  a  $217.56\pm 14.11$  FT/BS, siendo el órgano con menor concentración la raíz, seguido de las flores, tallos y por último las hojas cuya concentración dependía del tamaño de estas, ya que las de mayor tamaño presentaron una concentración más baja ( $123.51\pm 0.34$  FT/BS) y las hojas de menor tamaño tuvieron una concentración más alta ( $217.56\pm 14.11$  FT/BS). En cuanto a la concentración de AT se obtuvo una concentración de  $0.07\pm 0.03$  a  $1.44\pm 0.29$  AT/BS siendo las hojas de tamaño mediano el órgano con menor concentración y la de mayor las hojas chicas. Las raíces de las tres calidades se obtuvo una concentración de entre  $0.73\pm 0.02$  a  $0.81\pm 0.01$  AT/BS siendo la de tercera calidad la de menor concentración y la de mayor corresponde a la primera calidad.

- En la Etapa 3, se extrajeron los AHCQ por medio de par de disolventes: Inicialmente se usó una extracción con hexano para retirar las clorofilas presentes en la muestra y una segunda extracción empleando el par de disolventes agua:acetato de etilo; en la fase orgánica se extrajo principalmente los ácidos di y tri cafeoil-quinicos y parte del mono-CQA permaneció en la fase acuosa. Los resultados obtenidos fueron: FT de  $5.28\pm 0.08$  a  $48.58\pm 1.98$  FT/BS siendo las hojas y tallos de *Sambucus mexicana* las de menor concentración y las de mayor concentración las hojas de *Coffea arábica*. En el porcentaje de rendimiento de extracción con respecto a 1 g de BS de las diversas fuentes se obtuvieron valores de 0.80-10.28 %, las hojas y tallos de *Sambucus mexicana* corresponden a las de menor rendimiento de extracción y las de mayor rendimiento a *Ilex paraguariensis*. Por otro lado, se identificó el perfil de AHCQ por HPLC, las hojas sin tratamiento y descafeinadas de *Coffea arábica*, *Coffea canephora*, las flores, hojas y tallos de *Sambucus mexicana* presentaron de acuerdo al área del pico la concentración más alta 5-CQA respecto con los isómeros del dicafeoil-quinico. *Ilex paraguariensis* fue la fuente que destacó por presentar una alta concentración de 5-CQA, 3,5-diCQA y 3,4-diCQA. En el caso de las hojas de *Ipomoea batatas* la concentración de 5-CQA es menor y el ácido que se encuentra en mayor proporción es el 3,5-di-CQA además de ser la única fuente que presentó el ácido 3,4-5-tri-CQA.

- En la Etapa 4 se evaluó la estabilidad por copigmentación de los AHCQ con las antocianinas de *Ipomoea batatas*, para ello se realizó una prueba de estabilidad de un

extracto concentrado de antocianinas de la raíz de *Ipomoea batatas* con un extracto concentrado de los AHCQ de *Ilex paraguariensis* a diferentes condiciones de temperatura (4 y 65°C) y expuestos a la luz solar encontrándose que al añadir dicho extracto la estabilidad no fue favorecida independientemente a la condición a la que se someta en comparación con aquella que sólo contiene el extracto concentrado de antocianinas.

- Por último en la Etapa 5 por medio de la metodología de DPPH se cuantificó la actividad antioxidante (AA) de los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas* siendo las hojas la de mayor actividad antioxidante ( $123.14 \pm 0.19$  AA/BS), seguido de los tallos ( $53.37 \pm 3.12$  AA/BS), flores ( $23.19 \pm 5.37$  AA/BS) y raíz ( $5.69 \pm 0.35$ - $8.49 \pm 0.88$  AA/BS).

## 2. INTRODUCCIÓN

Las plantas contienen una gran cantidad de sustancias químicas que se originaron a partir de interacciones evolutivas con su entorno como son los fitoquímicos, los cuales son importantes para el crecimiento de las plantas ya que al ser liberadas estas sustancias químicas afectan los procesos fisiológicos, promueven el desarrollo y sirven como mecanismo de defensa al prevenir la depredación de herbívoros (Guan R. et al., 2021). Estudios epidemiológicos han demostrado que las frutas, verduras, cereales y otras dietas a base de plantas tienen un efecto positivo, por ejemplo, en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares Miller et al. (2017) investigó a 135,335 voluntarios de entre 35 y 70 años de 18 países y encontró que una dieta rica en frutas, verduras y frijoles se asociaba con un menor riesgo de mortalidad cardiovascular. Los fitoquímicos pueden prevenir la diabetes y reducir enfermedades cardiovasculares, además de tener propiedades antiinflamatorias (Guan R. et al. 2021).

Dentro de estos compuestos se encuentran los polifenoles los cuales son un grupo muy amplio de compuestos químicos cuya estructura básica se forma a partir de un anillo fenólico (Dennis K. et al., 2021). Los AHCQ pertenecen a la familia de los polifenoles cuya estructura química se forma a partir de la conjugación de los ácidos cinámicos con el ácido quínico formando varios isómeros entre ellos los ácidos cafeoil-quínicos, dicafeoil-quínicos, feruloil-quínicos y cumaroil-quínicos. Y aunque la mayoría de ellos son ubicuos en los vegetales, es importante establecer métodos de extracción que favorezca la concentración de cada grupo de compuestos.

Existen diversas técnicas de extracción de los AHCQ, para seleccionar la adecuada se debe de tomar en cuenta la naturaleza propia de la fuente y el tratamiento previo más conveniente ya sea en fresco, congelado o seco para evitar se altere la composición de los fitoquímicos de interés; además de utilizar los disolventes y técnicas de extracción; como la extracción asistida por microondas o sonicación, que favorezcan la eficiencia de extracción (Kumar, N., & Goel, N.; 2019).

Uno de los cultivos más importantes por su alta concentración de ácidos clorogénicos es el café, siendo el fruto el órgano que más se ha estudiado, ya que a partir de este se prepara una de las bebidas más consumidas a nivel mundial. Sin embargo, las hojas, que muchas

veces son consideradas un residuo, también presentan una alta concentración de clorogénicos los cuales pueden ser usados con diversos fines en la rama de alimentos (Chen X. et al., 2019). Por otro lado, *Sambucus mexicana* o Sauco mexicano se consume con fines medicinales en infusión siendo las flores el órgano más utilizado con este fin sin embargo en la literatura esta variedad no se ha identificado el perfil de los AHCQ, dentro de la familia del Sauco la especie *Sambucus nigra* se destaca por su alta concentración de 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 1,5-di-CQA, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y 4,5-di-CQA (CONABIO, 2020 ; Meinhart A.D. et al., 2017). Respecto a *Ipomoea batatas* o camote morado, las hojas en México son utilizadas como alimento para ganado o son consideradas residuos y rara vez son aprovechadas, se tienen datos que establecen que son el órgano con el mayor contenido de ácidos clorogénicos. Siendo la raíz el órgano comúnmente consumido, cuyo contenido de compuestos bioactivos como los fenoles y antocianinas son ampliamente estudiados por las propiedades benéficas que se les atribuye (Krochmal-Marcza B. et al., 2020). Otra fuente vegetal destacable por su contenido de ácidos fenólicos es *Ilex paraguarensis* o yerba mate, y es consumida en infusión en países como Argentina, cuyo contenido de AHCQ se compara con el té verde (Burriss K. et al., 2012; Heck C. & De Mejia E., 2007).

El tener diversas fuentes vegetales y métodos de extracción eficiente de ácidos clorogénicos es importante en la industria de alimentos, ya que estos compuestos se han utilizado para mejorar las propiedades organolépticas como sabor, astringencia, dureza, color, cualidades sensoriales, nutricionales y antioxidantes de los alimentos (Kumar, N., & Goel, N.; 2019).

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1. Fitoquímicos en alimentos**

Los fitoquímicos son compuestos bioactivos que se encuentran en los alimentos vegetales como frutas, verduras, cereales, frutos secos y semillas, entre otros; son los responsables de conferir color y sabor a los vegetales, además de proporcionarles un efecto protector a las células de la planta inhibiendo el proceso de desestabilización debido a agentes extraños como el efecto de la luz ultravioleta (Fereidoon S. et al., 2010; Butnariu & Butu, 2015).

Se han encontrado más de 5000 fitoquímicos en frutas, vegetales, cereales integrales, frijoles y frutos secos. Estos han sido clasificados en diferentes grupos de acuerdo a su estructura química en polifenoles, carotenoides, compuestos orgánicos de azufre, alcaloides y compuestos que contienen nitrógeno (Fereidoon S. et al., 2010).

El consumo frecuente de los alimentos de origen vegetal ayuda a inhibir el estrés oxidativo, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad, enfermedad de Alzheimer y cáncer motivo por el cual se han desarrollado diversos métodos de extracción para aplicarlos en la industria de alimentos con el fin de darles un valor agregado (Guan R. et al., 2021).

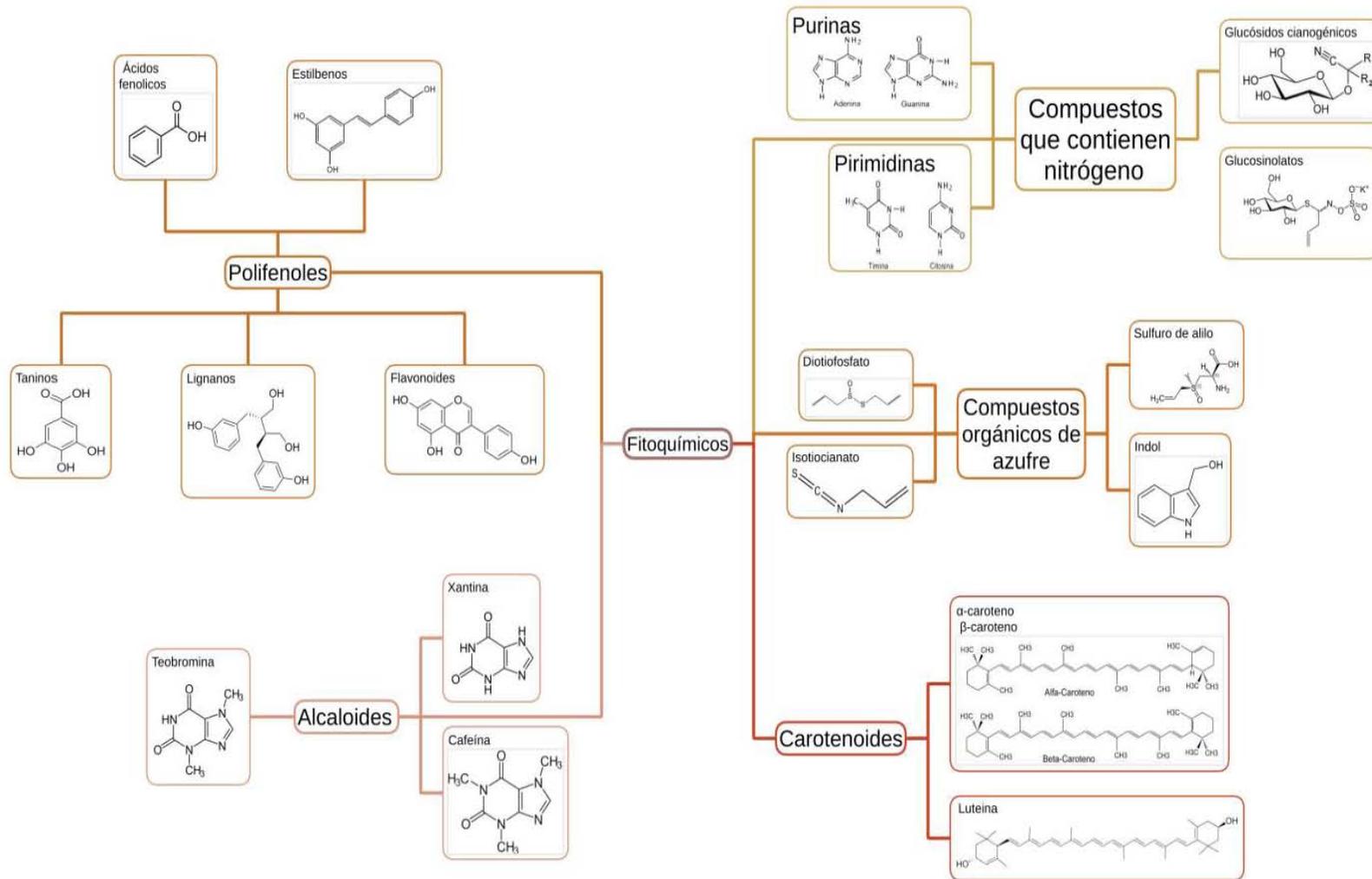
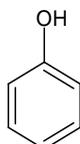


Figura 1. Clasificación de los compuestos fitoquímico

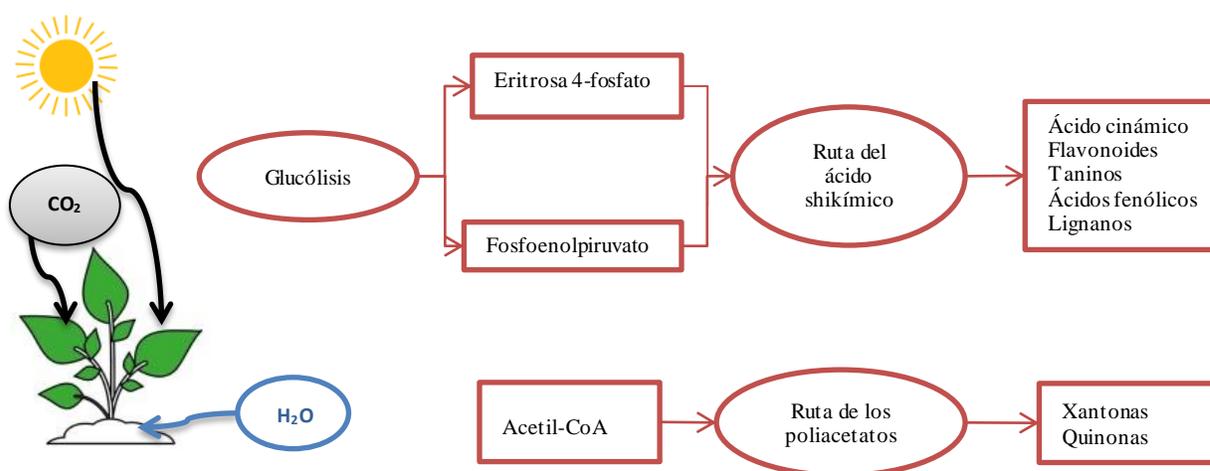
### 3.2. Polifenoles

Los polifenoles son un grupo muy extenso de compuestos presentes comúnmente en alimentos de origen vegetal, su estructura química básica la cual se muestra en la *Figura 2* consiste en un anillo aromático sustituido con hidroxilo o anillo fenólico (Peñarrieta J.M. et al., 2014).



**Figura 2. Estructura química del anillo fenólico**

Los polifenoles son sintetizados durante el proceso de fotosíntesis como producto del metabolismo secundario de las plantas principalmente por la ruta del ácido shikímico y la de los poliacetatos. En la *Figura 3* se muestra el esquema general de biosíntesis de los polifenoles, a partir de la condensación de la Eritrosa 4-fosfato y del Fosfoenolpiruvato se forma el ácido Shikímico formando posteriormente compuestos como el ácido cinámico, los flavonoides, taninos, ácidos fenólicos y lignanos. La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de AcetilCoA y a través de una serie de condensaciones se forma principalmente las xantonas y las quinonas (Quiñones M. et al., 2012).



**Figura 3. Esquema general de la ruta de biosíntesis de los polifenoles en las plantas**

Los polifenoles están involucrados en muchas funciones en las plantas, tales como propiedades sensoriales: color, aroma, sabor y astringencia, estructura, favorece el proceso de polinización, resistencia a plagas y depredadores (Reis Giada, 2013).

Estos compuestos se han clasificado de acuerdo a la fuente de origen, distribución en la naturaleza, función biológica y su estructura química.

La clasificación de los polifenoles de acuerdo a su estructura química se basa en la cantidad de anillos fenólicos y los elementos estructurales que unen a estos anillos entre sí. En la *Figura 4* se observa que estos se clasifican en cinco grupos: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y taninos (Belscak-Cvitanovic, A. et al., 2018). Los ácidos fenólicos y los flavonoides se encuentran en mayor proporción en los alimentos de origen vegetal, estos además tienen subclasificaciones de acuerdo a su estructura química, los ácidos fenólicos se clasifican en ácido cinámico y ácido benzoico, los flavonoides tienen 5 subclasificaciones: flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas.

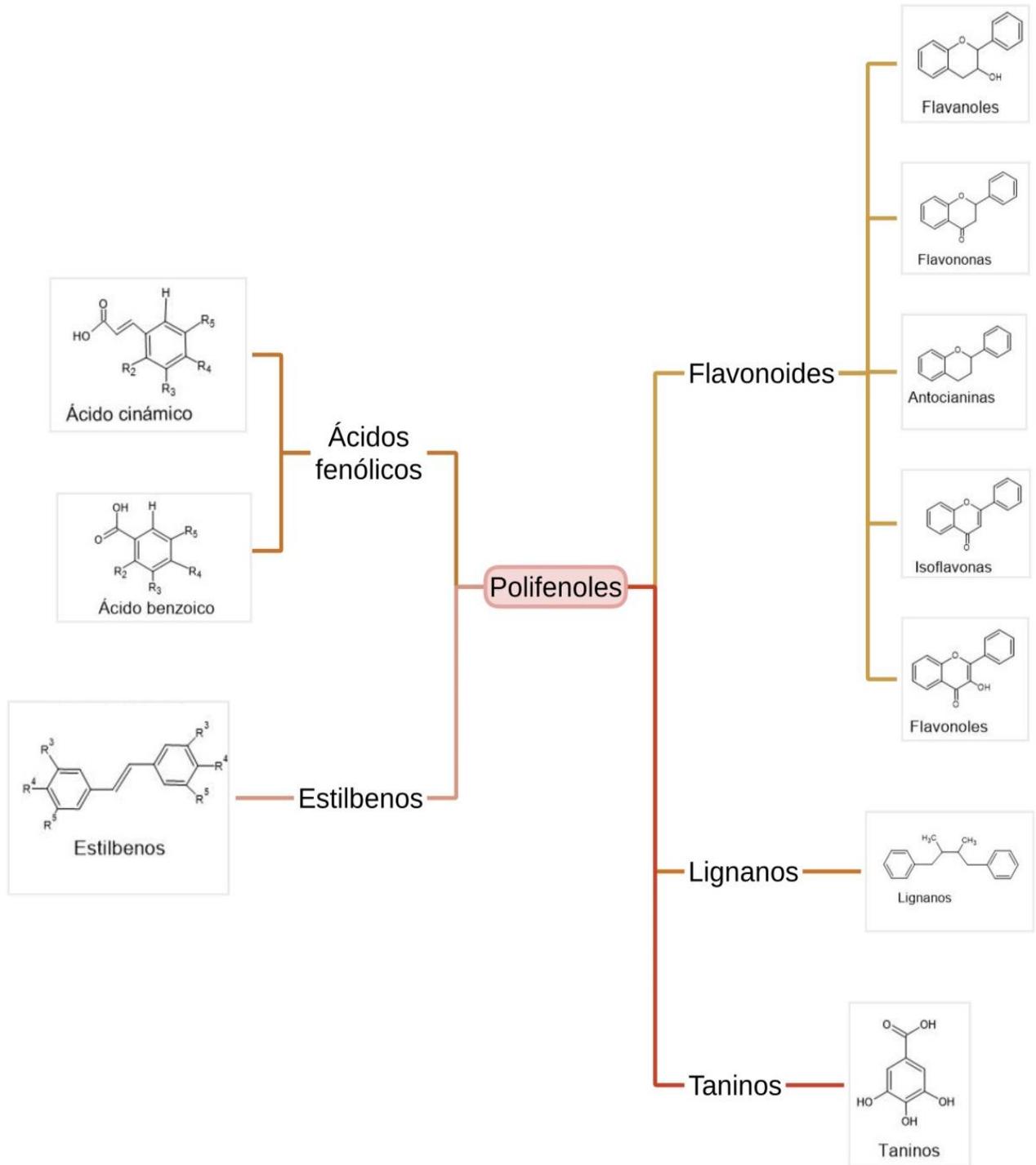
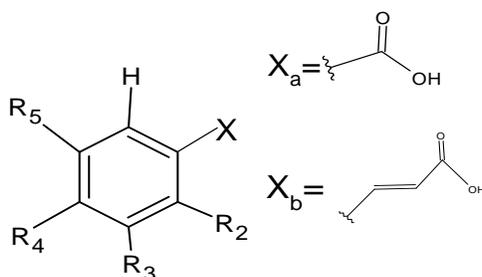


Figura 4. Clasificación de polifenoles de acuerdo a su estructura química.

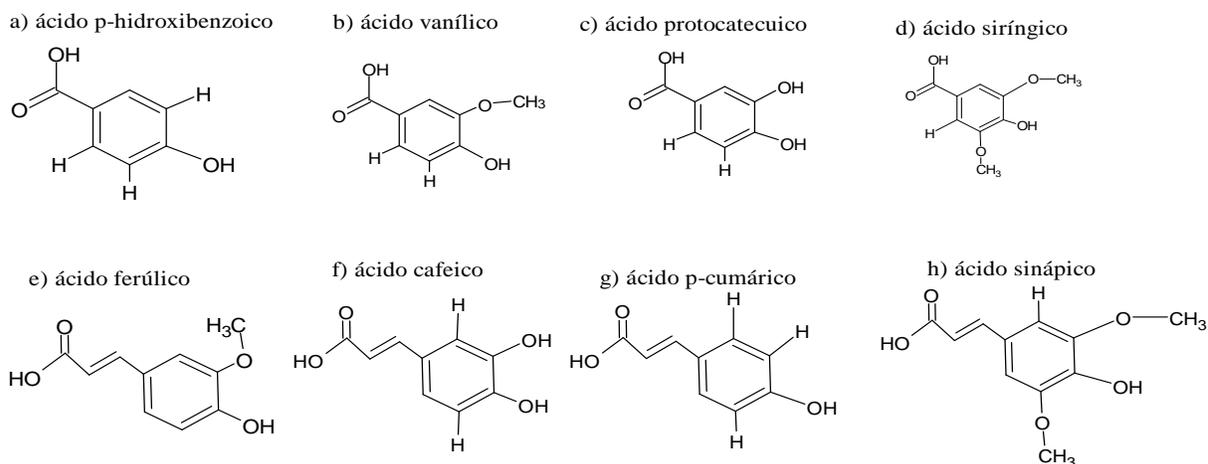
### 3.3. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos cuya estructura química consta de anillo de benceno, un grupo de ácido carboxílico y uno o más grupos hidroxilo o metoxilo. Por lo general se encuentran unidos con otros compuesto como amidas, ésteres o glucósidos, muy raramente se encuentran en su forma libre.



**Figura 5. Estructura química general de los ácidos fenólicos**

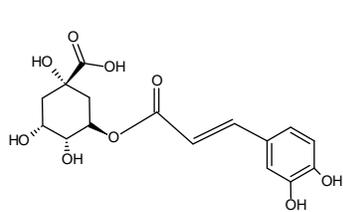
Se dividen principalmente en dos subgrupos: ácidos benzoicos o hidroxibenzoicos y ácidos cinámicos o hidroxicinámicos. En la *Figura 5* se encuentra la estructura química general de los ácidos fenólicos donde X<sub>a</sub> es el grupo funcional característico de los ácidos benzoicos y X<sub>b</sub> es el grupo funcional característico de los ácidos cinámicos; R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> pueden ser grupos metoxilo o hidroxilo. En la *Figura 6* se observa las estructuras químicas de los ácidos fenólicos reportados en la literatura: el ácido p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico y siríngeo corresponden al subgrupo de los hidroxibenzoico y en el subgrupo de los ácidos hidroxicinámicos se encuentra el ácido ferúlico, cafeico, p-cumárico y sinápico. (Kumar & Goel, 2019).



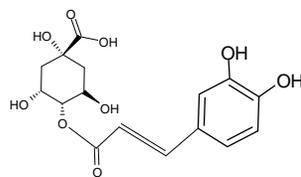
**Figura 6. Estructura química de ácidos benzoicos y ácidos cinámicos más comunes en la naturaleza**

Los ácidos hidroxicinamoil-quinicos o ácidos clorogénicos son aquellos cuya estructura química se forma al conjugarse los ácidos cinámicos con el ácido quínico. Los compuestos químicos que forman se denominan ácidos cafeoilquinicos, dicafeoilquinicos, feruloilquinicos y cumaroilquinicos (Liang & Kitts, 2016).

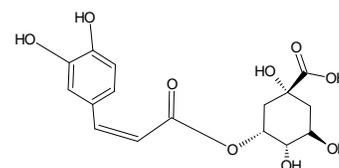
En la clasificación de los ácidos cafeoilquinicos se forman tres isómeros: 3-CQA, 4-CQA y 5-CQA. Los dicafeoil-quinicos tienen cuatro isómeros 1,5-di-CQA, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y el 4,5-di-CQA. Existe además por su conjugación con tres moléculas de ácido quínico el 3,4,5-tri-CQA.



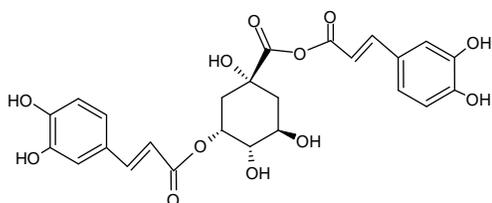
3-cafeoilquinico



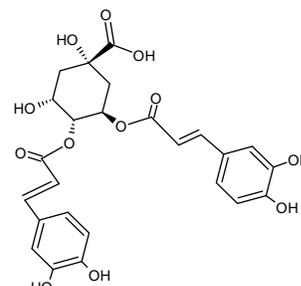
4-cafeoilquinico



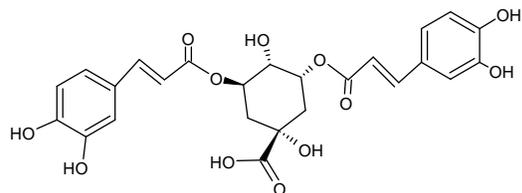
5-cafeoilquinico



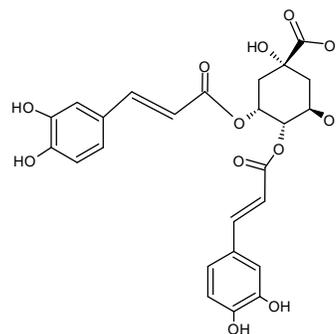
1,5-dicafeoilquinico



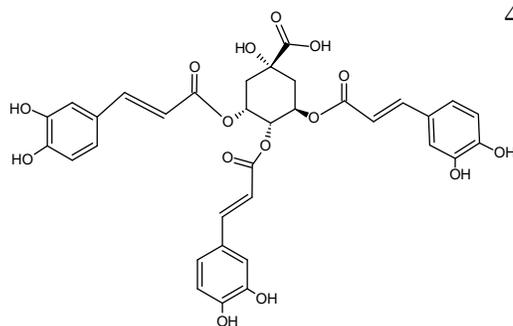
3,4-dicafeoilquinico



3,5-dicafeoilquinico



4,5-dicafeoilquinico



3,4,5-tricafeoilquinico

**Figura 7. Estructura química de isómeros de los ácidos cafeoilquinicos**

### **3.4. Ácidos AHCQ en los alimentos.**

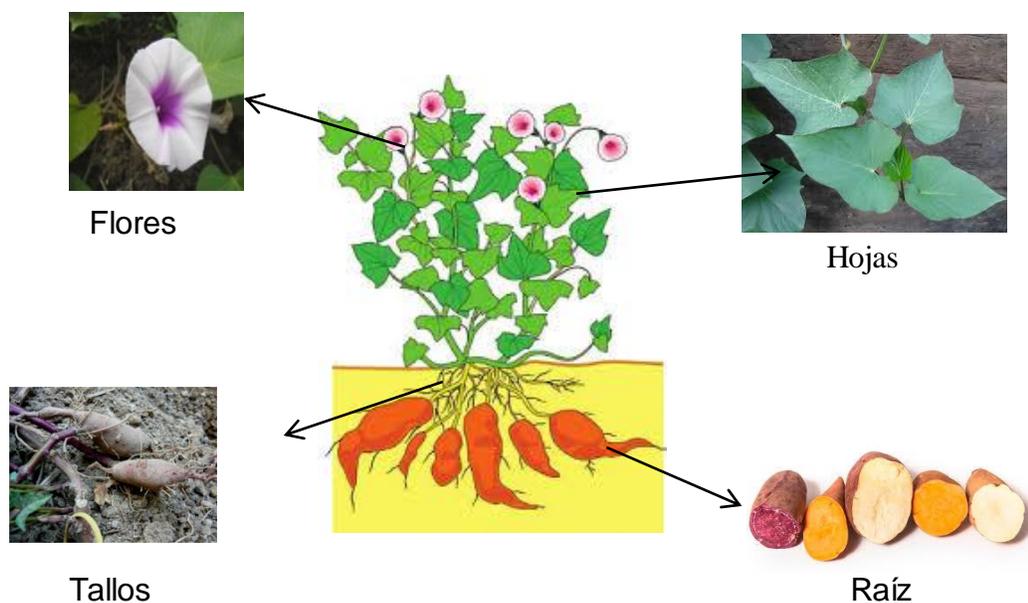
Los ácidos clorogénicos son compuestos fenólicos naturales que se encuentran en todas las plantas superiores. Por sus diversas propiedades biológicas son metabolitos secundarios muy importantes ya que se ha demostrado que exhiben actividad captadora de radicales (RSA), antimutagenicidad, actividad anticancerígena, actividad antidiabética, antibacteriana, antiinflamatoria, actividad anti-VIH e inhibición de la producción de melanina *in vitro* o *in vivo* (Ishiguro K. et al., 2007). Por lo que, recientemente se ha retomado el estudio de los ácidos clorogénico y su ocurrencia natural, tanto más porque se proponen nuevas aplicaciones de dichos compuestos en productos farmacéuticos, alimentos, aditivos alimentarios y cosméticos.

Existe una gran variedad de alimentos de origen vegetal que se consumen regularmente que tienen un alto contenido de ácidos hidroxicinamoil-quinicos. Las fuentes seleccionadas en el presente trabajo son el camote (*Ipomoea batatas*), hojas de café (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y sauco (*Sambucus mexicana*) las cuales se han reportado que de los fitoquímicos que presentan una concentración considerable son el ácido cafeoil-quinico, dicafeoil-quinico y tricafeoil-quinico..

#### **3.4.1 Ipomoea batatas (Camote morado)**

##### **3.4.1.1 Botánica**

El camote (*Ipomoea batatas* Lam.) pertenece a la familia *Convolvulaceae* es una de las ocho especies de la sección Batatas nativa que abarca desde México hasta el centro de Sudamérica (Linares et al., 2008). El cultivo de camote consta de distintos órganos los cuales son las flores, hojas, tallos y raíz. La raíz se clasifica principalmente de acuerdo a la coloración que tiene: amarillo, blanca y morada.



**Figura 8. Principales partes del cultivo de *Ipomoea batatas* (Human, 1992)**

### **3.4.1.2 Producción**

En el 2019 la producción mundial del camote según la *FAO* fue de 91,820,732 toneladas siendo Asia la región con mayor producción la cual corresponde al 70.5%. Los principales países productores son China, Malawi, Nigeria, República Unida de Tanzania y Uganda. La producción en el 2019 en México es de más de 59,358 toneladas siendo Michoacán, Guanajuato, Zacatecas, Veracruz y Chihuahua los principales estados productores (SIAP, 2019)

### **3.4.1.3 Composición nutricional**

La raíz contiene grandes cantidades de almidón, vitaminas, fibra y minerales. En el caso de los carbohidratos su composición es de 20.1% siendo el almidón la mayor composición del 12.7% y 4.2% de azúcares; grasas del 0.1% y proteínas del 1.6% (CONABIO, 2021). El alto valor nutricional de las hojas de camote se debe a la alta cantidad de minerales como calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, hierro, cobre y zinc; fibra soluble, vitaminas C, E, B1, B2, B6, niacina, biotina, caroteno, ácido pantoténico y proteína, el contenido de todos los componentes mencionados se encuentran en una concentración mayor que en la raíz y tallos (Krochmal-Marcza B. et al., 2020).

#### **3.4.1.4 Compuestos fitoquímicos**

Las hojas, tallos y flores del camote son fuente ricas de derivados de los ácidos cafeoil-quínicos se ha reportado la presencia de ácido cafeico, ácido clorogénico, isómeros del 4-CQA, 5-CQA, isómeros del dicafeoil-quínico tales como el 4,5-di-CQA, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y ácido 3,4,5-tri-CQA (Toong, L. et al., 2015).

#### **3.4.1.5 Usos en alimentos**

Las hojas y la raíz son la parte del cultivo que comúnmente se consume en preparaciones como sopas, té y ensaladas.

### **3.4.2 Coffea arábica y Coffea canephora (Café arábica y café robusta)**

#### **3.4.2.1 Botánica**

El café pertenece a la familia *Rubiaceae* del género *Coffea*. Su origen data entre 150,000 y 350,000 años atrás proveniente del continente de África (Farah, 2019). Existen más de 70 variedades, sin embargo las variedades más estudiadas son la *Coffea arábica* también conocida como Arábica y *Coffea canephora* o Robusta debido a su mayor consumo a nivel mundial. (Mussatto, et. al, 2011). La planta de café es un arbusto que llega a medir de entre 9 a 12 metros, el cultivo consta de la flor de coloración blanca la cual florece irregularmente o en temporada de lluvias, el fruto o cerezo cuya coloración varía dependiendo del estado de madurez pasando de verde a amarillo y por último al rojo, de este cerezo se obtiene el grano del café; y las hojas son brillantes y cerosas de color verde claro o oscuro o bronce según la etapa de desarrollo la vida útil de las hojas de la variedad Robusta es de 7 a 10 meses y de la variedad Arábica de aproximadamente 8 meses (CONABIO, 2021 & Chen X. , 2019)



**Figura 9. Cultivo de café (CONABIO, 2021)**

### **3.4.2.2 Producción**

En el 2019 la producción mundial de café verde según la *FAO* fue de 10,035,576 toneladas. Los principales países productores son Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y Etiopía. México ocupa el lugar número 13 con una producción de 900,215 toneladas, los principales estados productores son Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca y Guerrero (SIAP, 2019). La variedad Arábica su producción mundial es del 75% y de la Robusta corresponde un 25%

### **3.4.2.3 Composición nutricional**

La composición nutricional de las hojas de café de la variedad Arábica es de 5.5-7.8% de humedad, 8.8-12.4% de cenizas, 14.4-19.0% proteína, 4.5-12.5% lípidos, 17.1-20% fibra, 51-63.9% carbohidratos, calcio, magnesio y hierro son los tres minerales principales.

### **3.4.2.4 Compuesto fitoquímicos**

Los compuestos fitoquímicos que se han reportado en las hojas del café se encuentran los alcaloides como la cafeína, trigonelina, teobromina y tefilina; ácidos fenólicos como ácido cafeico, ácido p-cumárico, ferúlico benzoico, sináptico, protocatecuico, feruloilquínicos, ácidos clorogénicos: : 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y 4,5-di-CQA; xantanoideos como mangiferina e isomangiferina y flavonoides como catequinas, antocianinas, rutina, quercetina, etc. (Chen X. et. al, 2019)

### **3.4.2.5 Uso en alimentos**

Desde el año 1800 en Etiopía, Sudán, Indonesia, Jamaica, India, Java y Sumatra las hojas de café se consumen como té debido a que tiene propiedades medicinales. En México las hojas de café no se consumen de igual forma que el grano de café sin embargo debido a que reportan un contenido importante de fitoquímicos ha ido en aumento el interés de utilizarlas en una bebida similar al té, como complementos alimenticios funcionales y en medicinas. (Chen X. et al, 2019)

### **3.4.3 Ilex paraguariensis (Yerba mate)**

#### **3.4.3.1 Botánica**

Yerba mate, mate o *Ilex paraguariensis* es un arbusto nativo de América del sur de la familia *Aquifoliacea*, la cual puede alcanzar de altura de 8 a 15 metros. El cultivo de la yerba mate consta de las hojas las cuales reportan un alto contenido de fitoquímicos, las flores cuyo periodo de floración se produce de octubre a diciembre. Las frutas son drupas que van del color rojo al negro dependiendo su etapa de maduración. (Croge C. et al., 2021)



**Figura 10. Cultivo de yerba mate**

#### **3.4.3.2 Producción**

En el 2019 la *FAO* reportó una producción mundial de 945,962 toneladas, siendo los principales países productores Brasil, Argentina y Paraguay. Debido a que es una fuente cuyo consumo es muy local en países de Sudamérica y apenas se está popularizando son estos países productores quienes se encargan de exportar el producto (SIAP, 2019).

#### **3.4.3.3 Composición nutricional**

La composición nutricional la infusión típica que se elabora en Argentina proceso que se le denomina “mateada” la cual consiste en agregar 50 gramos de mate se le agregaron 20 mL

de agua caliente (70°C) dejando reposar durante 20 segundos, realizando este paso hasta completar un volumen de 500 mL el contenido de carbohidratos es del 9.82±1.42%, azúcares de 2.97±0.76%, proteínas 1.03±0.18%, grasas 0%, fibra alimentaria del 0.56±0.21 y cenizas totales 1.45±0.17%. (Instituto Nacional de la Yerba Mate, 2019).

Las hojas de la yerba mate se han determinado los principales minerales que contienen debido al alto contenido de cenizas totales que contiene siendo magnesio, calcio, hierro, zinc, sodio y potasio; además de que contiene vitamina A, C, B1 y B2 (Croge C. et al., 2021).

#### **3.4.3.4 Compuestos fitoquímicos**

Se han identificado numerosos fitoquímicos en el té de yerba mate entre ellos los dos compuestos más altos son los polifenoles siendo los derivados del cafeoil: el ácido clorogénico, ácido cafeico, 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA y 3,4-di-CQA, y los otros compuesto que predomina en su composición son las xantinas entre ellas la cafeína, teobromina y teofilina, rutina, quercetina y kaempferol. (Burriss K. et al., 2012; Heck C. & De Mejia E., 2007)

#### **3.4.3.5 Uso en alimentos**

Se consume principalmente como infusión que se le denomina Chimarrão en Brasil la cual se compone de 70% hojas y 30% ramas delgadas. Además de utilizarse como infusión, se han preparado bebidas energéticas, cervezas, refrescos, licores, dulces, mermeladas y como ingrediente funcional ya que inhibe el pardeamiento de las frutas frescas. (Croge C. et al., 2021)

### **3.4.4 Sambucus mexicana (Saúco)**

#### **3.4.4.1 Botánica**

El saúco o la especie *Sambucus nigra* es una especie nativa de Europa, noroeste de África y sudoeste de Asia. Esta tiene dos subespecies *Sambucus peruviana* y *Sambucus mexicana*. *Sambucus mexicana* es una clase de arbusto perteneciente a la familia Adoxaceae que puede alcanzar una altura de 10 metros. Esta especie se distribuye desde Canadá hasta Panamá y también vive en las islas del Caribe. El cultivo consta de tallos los cuales son de color grisáceo, las hojas de color verde, flores de color blanco las cuales florecen casi todo

el año especialmente en primavera e invierno y el fruto de color púrpura o negro (INECOL, 2020) .



**Figura 11. Cultivo de *Sambucus mexicana* (CONABIO, 2020)**

#### **3.4.4.2 Producción**

Las partes del cultivo que son relevantes para la producción son los frutos y el extracto de las flores. En muchos países se recolectan grandes cantidades de materia prima de plantas silvestres sin embargo a principios de la década de 1980 se ha plantado y cultivado en parcelas experimentales y comerciales de algunos países europeos, Estados Unidos, Canadá, Nueva Zelanda y Chile. La producción total de frutas en comparación con otros cultivos de bayas es bastante pequeño por ello los datos estadísticos son escasos e incompletos (Młynarczyk K. et al., 2018). Existe una clasificación en el sistema de FAO para bayas no identificadas en el 2019 se reporta una producción de 922,681 toneladas, siendo los principales países productores México, Nueva Guinea, Vietnam, Turquía y China. (FAO, 2019)

#### **3.4.4.3 Composición nutricional**

Las bayas de *S. nigra* son el producto que más se consume se tiene reportado que en cuanto carbohidratos contiene de azúcar total del 7.86-11.5% siendo los principales identificados la glucosa, fructosa y sacarosa; proteínas su contenido es del 2.7-2.9% en las bayas, en flores del 2.5% y 3.3% en hojas siendo los aminoácidos que más predominan el ácido glutámico, aspártico y alanina (Młynarczyk K. et al., 2018).

#### **3.4.4.4 Compuestos fitoquímicos**

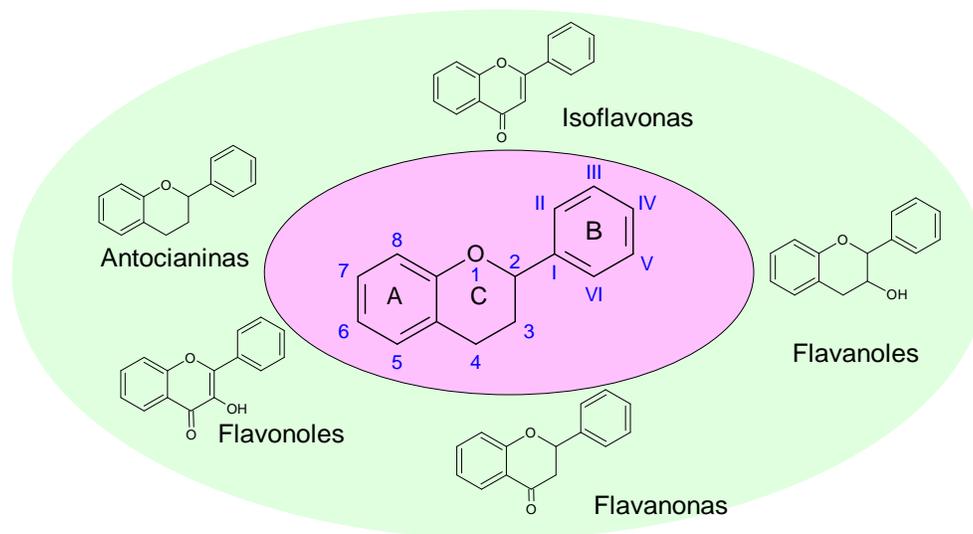
Se han identificado diversos compuestos biológicamente activos como flavonoides, kaempferol, quercetina, rutina, terpenos, ácidos clorogénicos, taninos, mucílago, pectina y azúcar (Barnes et al., 2007). De los AHCQ presentes en la flor de *Sambucus nigra* se reporta la presencia del ácido 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 1,5-di-CQA, 3,4-di-CQA, 3,5-di-CQA y 4,5-di-CQA (Meinhart A.D. et al., 2017).

#### **3.4.4.5 Uso en alimentos**

Las flores y frutos son comestibles. De la flor se puede consumir un té que tiene propiedades medicinales para tratar síntomas como la tos y la calentura en Chihuahua, Baja California Sur, Sonora y Nayarit. Las hojas se utilizan como insecticida y colorantes. De la fruta se obtiene vino, gelatina y colorante (CONABIO, 2020).

### **3.5.Flavonoides**

Los flavonoides son pigmentos no nitrogenados solubles en agua, metanol y etanol. Están compuestos por anillos de benceno A y B conectados por un anillo C de pirano heterocíclico (*Figura 12*). La actividad biológica de los flavonoides depende de la disposición de los grupos funcionales en la estructura del núcleo. Según el grado de oxidación del anillo C, se dividen en cinco categorías: antocianinas, isoflavonas, flavonoles, flavanol y flavanonas. Se han reportado más de 5,000 compuestos que proporcionan colores amarillos y naranjas a frutas como peras, fresas, manzanas, cerezas duraznos, naranjas y limones; son los responsables en parte de la astringencia en alimentos como el té verde, además las antocianinas proporcionan colores que van desde el morado al rojo (Guan R. et al., 2021; Badiu, 2006).



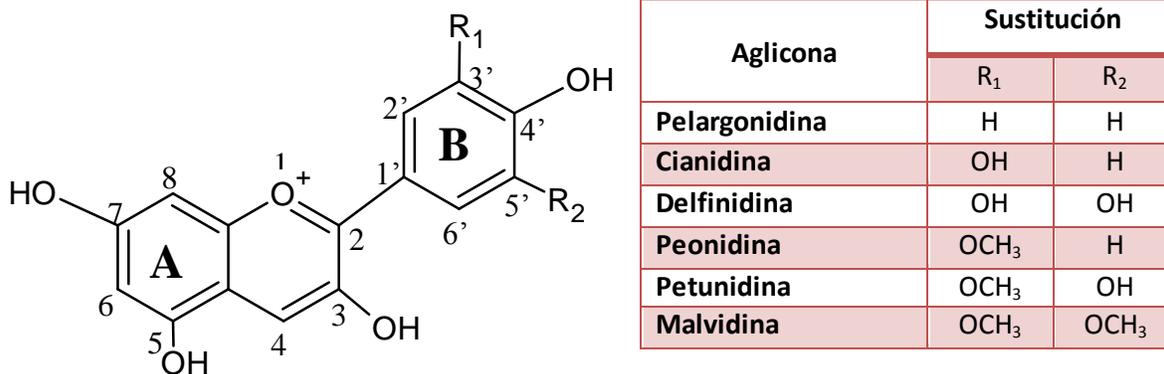
**Figura 12. Esqueleto de carbono básico y clasificación de flavonoides (Guan R. et al., 2021).**

### **3.6. Antocianinas**

Las antocianinas son pigmentos vegetales que pertenecen a la familia de los flavonoides, solubles en agua responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul de muchas frutas, vegetales y cereales en donde se acumulan en las vacuolas de las células. Son consideradas metabolitos secundarios de las plantas y tienen diferentes funciones como son la percepción visible para la atracción de animales con el propósito de polinización y dispersión de semillas, protección contra la radiación ultravioleta, contaminación microbiana y resistencia contra plagas. (Garzón, 2008).

### **3.7. Estructura química de las antocianinas**

La estructura química de las antocianinas consiste en un aglucón su esqueleto se forma de dos anillos bencénicos y uno heterocíclico con oxígeno (Badiu, 2006). En la *Figura 13* se ilustra la estructura química general de las antocianinas el anillo A es un grupo benzopirilio y el anillo B es un anillo fenólico, las variaciones en las sustituciones en el anillo B van a dar lugar a la formación de las antocianinas más conocidas e importantes las cuales son pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Garzón, 2008).



**Figura 13. Estructura química y sustituyentes de las antocianinas (Garzón, 2008)**

Todas las antocianinas están hidroxiladas en las posiciones 3,5 y 7 con azúcares como la glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa los cuales son los más comúnmente se han encontrado y ocasionalmente gentiobiosa, rutinosa y soforosa. Dependiendo del número de sustitución glucosídica que contenga son monóxidos, bióxidos y trióxidos; estos enlaces incrementan la solubilidad y estabilidad de la molécula (Badiu, 2006).

Otra variación en la estructura de las antocianinas es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Estos ácidos pueden ser alifáticos como el malónico, acético, málico, succínico u oxálico, o aromáticos como el p-coumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, gálico o p-hidroxibenzoico; está acilación no tienen efecto en el color pero aumenta la estabilidad de la molécula (Garzón, 2008).

### 3.8. Estabilidad de las antocianinas

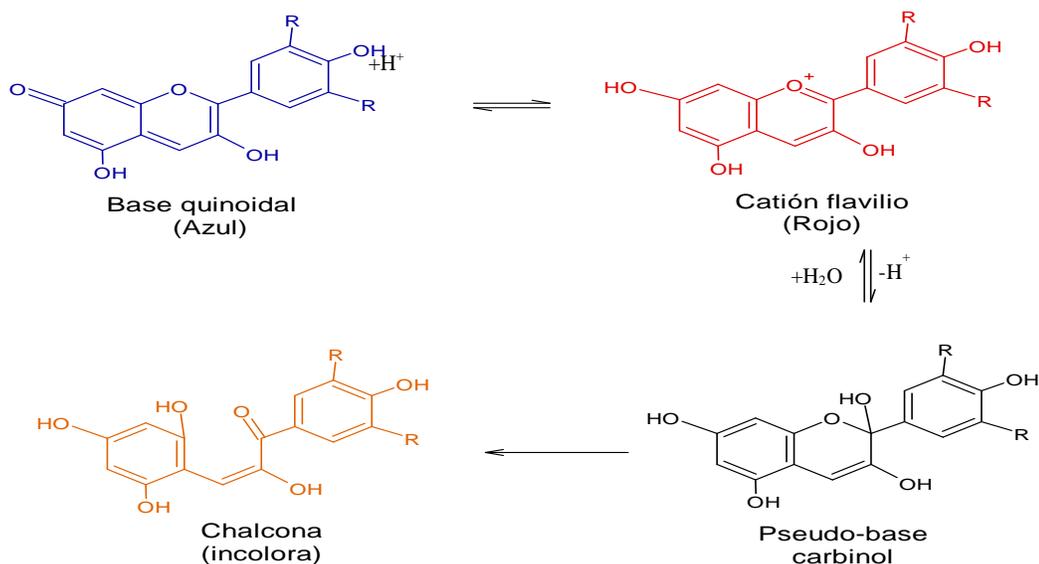
Las antocianinas se utilizan como colorante de origen natural en algunos alimentos aunque su uso es muy limitado debido a su baja estabilidad y a la interacción que tienen con otros componentes en una matriz alimentaria. Los factores que afectan la estabilidad son la estructura y la concentración de la antocianina, la temperatura, pH, luz, oxígeno, enzimas,

iones metálicos, ácido ascórbico, sulfitos, otros flavonoides y compuestos fenólicos. (Rodríguez-Amaya, 2019).

### 3.8.1. Efecto del pH

La estructura general de la molécula de las antocianinas tiene catión flavilio en el anillo benzopirilo el cual al tener una deficiencia de electrones es muy sensible a cambios de pH con lo cual se modifica provocando un cambio en la coloración.

En la *Figura 14* se encuentra las estructuras que se forma cuando se modifica el pH. A pH ácidos se promueve un efecto protector de la molécula lo cual favorece la formación del catión presentando principalmente coloraciones rojas. Al ir aumentando el pH ocurre una desprotonación del del catión flavilio promoviéndose la formación de la base quinoidal de la molécula a pH 7 y superiores se presenta una coloración azul. Cuando el valor del pH es muy alcalino se forma la pseudo-base carbinol formando la chalcona cuya pigmentación es incolora.



**Figura 14.** Estructura de las antocianinas debido a la variación del pH.

### 3.8.2. Temperatura

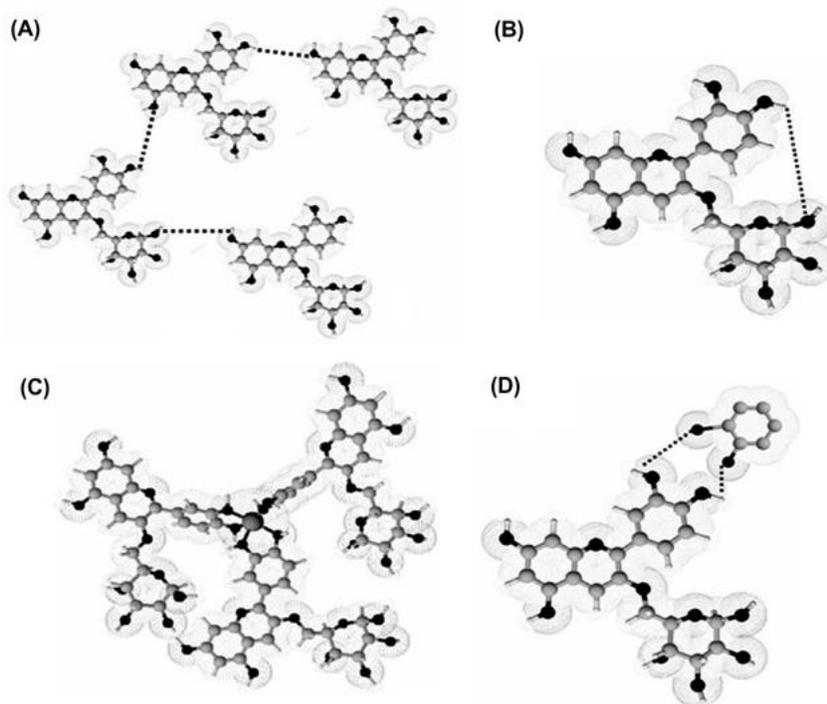
Los tratamientos térmicos influyen en la destrucción de las antocianinas, a medida que la temperatura aumenta lentamente los pigmentos se van disminuyendo la estructura de las antocianinas se forma principalmente las chalconas produciendo coloraciones marrones en la solución (Badiu, 2006).

### 3.8.3. Copigmentación

En la naturaleza las antocianinas se estabilizan por efecto de copigmentación. Se conoce como copigmentación al fenómeno en el cual los pigmentos en este caso las antocianinas y otros compuestos orgánicos como los flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos, antocianinas o iones metálicos forman una asociación o complejo generando un cambio o un incremento en la intensidad del color.

Esta interacción se puede llevar a cabo principalmente de cuatro formas como se observa en la *Figura 15* dependiendo de la especie con la que interactúan.

La copigmentación intramolecular ocurre cuando el copigmento es parte de la antocianina esto se da principalmente cuando las antocianinas son acilada; la copigmentación intermolecular ocurre cuando un copigmento incoloro y una antocianina se combinan por medio de una interacción no covalente intensificando la coloración de la antocianina o modificándola dependiendo del tipo de copigmento que se utilice; la autoasociación e interacción con un metal (Taihua Mu et al., 2017).



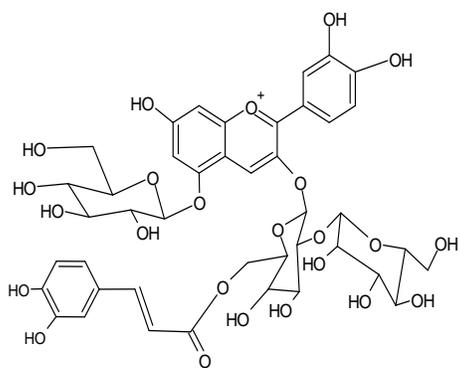
**Figura 15. Interacción de las antocianinas A) Asociación con la misma molécula, B) Copigmentación intramolecular, C) Formación de complejo con un metal, D) Copigmentación intermolecular (Castaneda-Ovando et al., 2009).**

### 3.9. Antocianinas en *Ipomoea batatas*

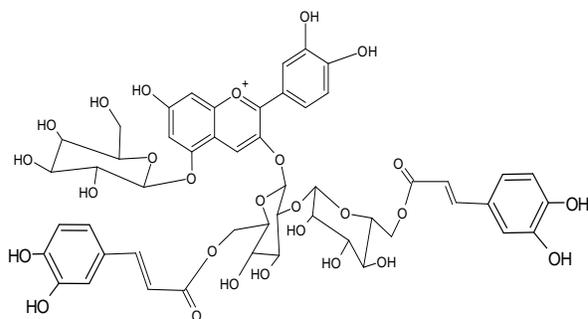
Se han identificado un total de 39 antocianinas en *Ipomoea batatas*, las dos estructuras químicas que predominan en las hojas y raíces son la cianidina-3-soforosido-5-glucósido y peonidina-3-soforosido-5-glucósido las cuales pueden estar mono-, diaciladas con ácido cafeico, ferúlico, *p*-cumárico y *p*-hidroxibenzoico o no aciladas. (Gras C.C. et al., 2017).

Las antocianinas fueron autorizadas como aditivos alimentarios en la Unión Europea y fueron evaluadas por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en 1982, de acuerdo con Sistema Internacional de Numeración de aditivos alimentarios o INS le corresponde el 163 en el Codex Alimentarius se encuentra la clasificación y dentro de esta clasificación de colorante se encuentra identificaos con números romanos la fuente de donde se pueden obtener dichos extractos concentrados los cuales fueron: extracto de la piel de las uvas (ii), extracto de grosella negra (iii), el color del maíz morado (iv), el color de la col morada (v), extracto de zanahoria negra (vi), el color del camote morado (vii), el color del rábano rojo (viii), color de la baya del saúco (ix), color de hibisco (x). El color del camote morado ha sido permitido y ha sido ampliamente utilizado en muchos países incluidos China, la República de Corea y la Unión Europea. Los alimentos donde se ha aplicado como colorante: bebidas, confitería, postres, helados, mermeladas, jaleas, helados, dulces y rellenos y coberturas de panadería. En el 2013 la EFSA solicitó un dictamen científico sobre la reevaluación de las antocianinas (E 163) como alimento aditivo ya que la base de datos toxicológica que se encontraba disponible era inadecuada por lo que se recomendó que se deberían requerir datos de caracterización y toxicológicos para permitir una reevaluación y datos comparativos sobre las antocianinas producidas por extracción acuosa (EFSA Journal, 2013; FAO, 2019 & FAO, 2016).

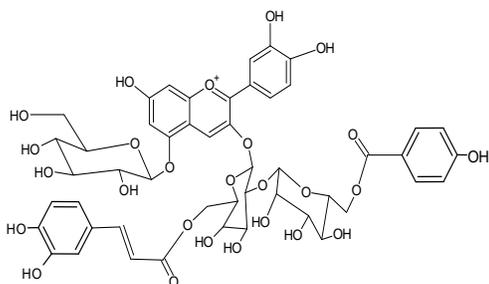
Las antocianinas del camote morado han sido ampliamente estudiadas debido a se reportó que su estructura química que la mayoría se encontraban aciladas con ácido cafeico, ferúlico y *p*-hidroxibenzoico lo cual le confiere propiedades como una alta estabilidad a la luz y a la temperatura, además de que se reportó que posee un efecto benéfico al ser ingerido (Taihua Mu et al., 2017).



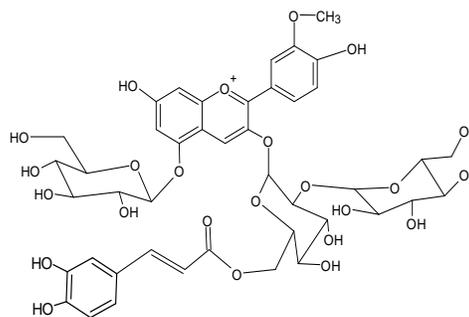
Cianidina-3-(cafeoil-soforósido) 5-glucósido



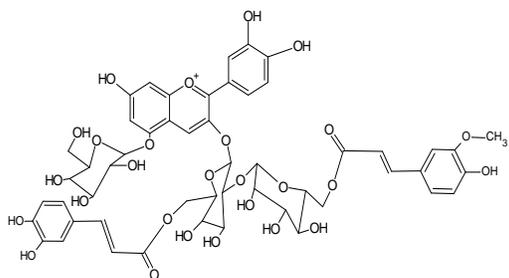
Cianidina-3-(dicafeoil-soforósido) 5-glucósido



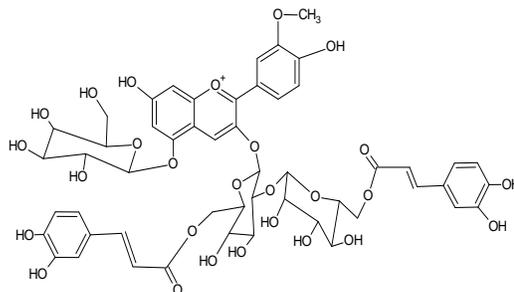
Cianidina-3-(cafeoil-*p*-hidroxibenzoil-soforósido) 5-glucósido



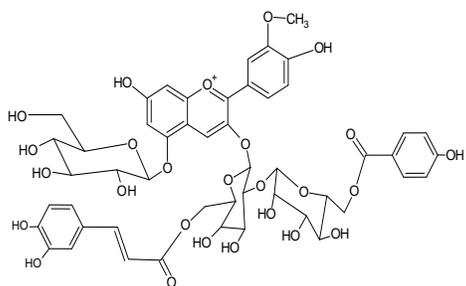
Peonidina-3-(cafeoil-soforósido) 5-glucósido



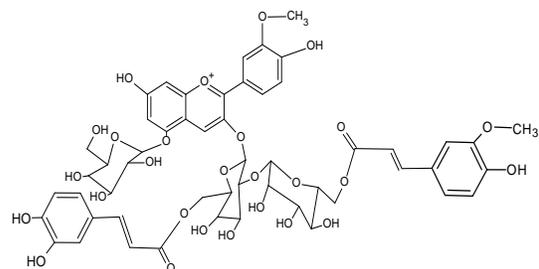
Cianidina-3-(cafeoil-feruloil-soforósido) 5-glucósido



Peonidina-3-(dicafeoil-soforósido) 5-glucósido



Peonidina-3-(cafeoil-*p*-hidroxibenzoil-soforósido) 5-glucósido



Peonidina-3-(cafeoil-feruloil-soforósido) 5-glucósido

**Figura 16. Estructura química de las antocianinas de *Ipomoea batatas***

### 3.10. Métodos de extracción de los AHCQ

Existen diversos métodos de extracción de los AHCQ para ello se debe tener en cuenta las características propias de la fuente vegetal en estudio y así determinar el procedimiento más eficaz.

Las principales etapas constan un pre-tratamiento de la muestra cuyo objetivo principal es mantener la concentración de los compuestos bioactivos para lograr cuantificar gran parte de ellos además de que es fundamental reducir el tamaño de partícula para incrementar el contacto de superficie de la muestra con el disolvente que se vaya a utilizar.

En la etapa de extracción el objetivo es solubilizar los compuestos bioactivos, por lo general los ácidos clorogénicos son solubles en disolventes orgánicos, en el caso de que estos se encuentran glucosilados son más solubles en agua; los solventes más comúnmente usados son el agua, acetona, metanol, etanol, propanol y acetato de etilo; para que la extracción sea lo más óptima el pH se tiene que ajustar a condiciones ácidas (Kumar & Goel, 2019).

La siguiente etapa corresponde al aislamiento cuyo objetivo es eliminar aquellos compuestos que interfieren en la cuantificación, una de las técnicas que más se usan es la extracción con otros disolventes inmiscibles debido a la polaridad que presentan los derivados del ácido cafeoil-quínico.

Otra técnica analítica para cuantificar los AHCQ es por medio de la espectrofotometría, en un ensayo muy general y utilizado denominado metodología de Folin-Ciocalteu cuyo fundamento es una reacción de óxido-reducción de los compuestos fenólicos cuando se mezclan con el reactivo Folin el cual contiene Tungsteno y Molibdeno en un medio alcalino para crear un complejo de color azul que se cuantifica a 750 nm, estos resultados se expresan en unidades de concentración en función a una curva de calibración de un compuesto conocido como el ácido gálico, tánico o clorogénico (Plaza M. et. al, 2018).

La técnica analítica que más se ha usado actualmente debido a que da resultados más específicos es la HPLC ya que separa, identifica y cuantifica los compuestos de interés de muestras muy complejas.



**Figura 17. Principales etapas de extracción y cuantificación de los AHCQ**

### 3.11. Aplicación de los AHCQ en los alimentos

Se han demostrado que los AHCQ tienen un efecto de conservación en los productos alimenticios ya que tiene un efecto de agente antimicrobiano. Varios estudios realizados en han medido la actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos como bacterias, levaduras, mohos, virus y amebas. En un artículo realizado por Santana-Gálvez et al. a modo de resumen de las principales investigaciones que se realizaron para demostrar dicha propiedad se mostró que en el caso de las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* la inhibición de éstas es menor que en el caso de las bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus* (Santana-Gálvez et al., 2017).

Se ha demostrado que la capacidad antioxidante de los AHCQ puede contrarrestar la oxidación de los lípidos ya que en una investigación que realizó Laguerre et al. midió la capacidad antioxidante del ácido clorogénico en aceite emulsionado de una nuez del árbol de tung y observó un efecto positivo ya que inhibió la oxidación de dicho aceite (Laguerre M. et al., 2011).

Además de que estos pueden inhibir la degradación de compuestos bioactivos fotoquímicos que se encuentran en los alimentos como las antocianinas. Kopjar et al. investigó la prevención de la degradación de las antocianinas en jugo de arándanos con la adición de azúcar y ácidos clorogénicos y observó que estos inhiben la degradación de las antocianinas por un mecanismo de copigmentación. Es por ello que se infiere dado los antecedentes antes mencionados que los AHCQ podrían ser usados como aditivos alimentarios (Kopjar M. et al., 2012).

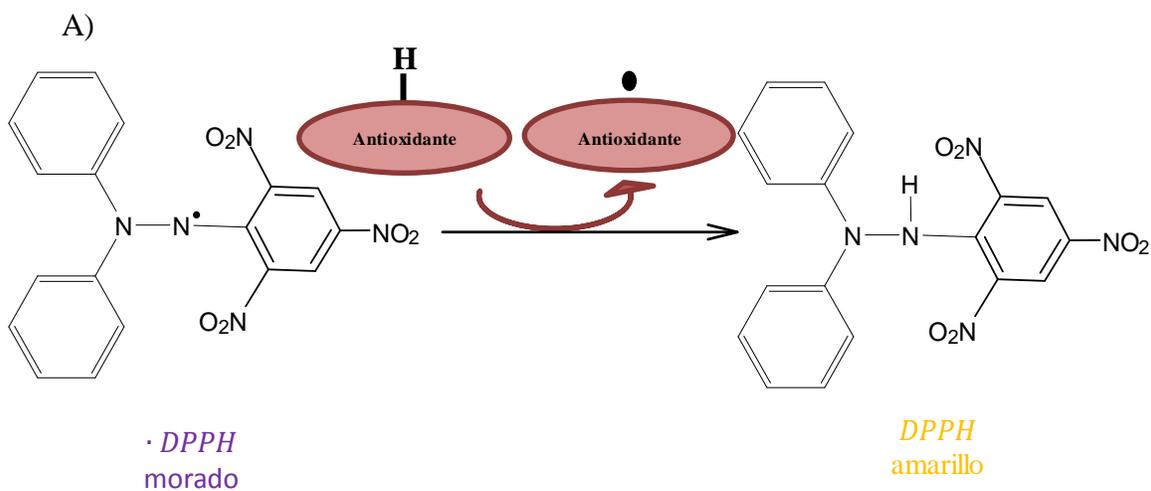
### 3.12. Actividad antioxidante

Se define como antioxidante a cualquier sustancia que cuando está presente en una concentración relativamente baja retrasa o inhibe la oxidación de un sustrato. Los antioxidantes inhiben especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), hidroxilo ( $\cdot OH$ ), peróxilo ( $ROO \cdot$ ), radicales alcoxilo ( $RO \cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) las cuales pueden atacar macromoléculas biológicas *in vivo* lo que provocará daños en proteínas, lípidos y ADN, envejecimiento celular y enfermedades originadas por estrés oxidativo (Xiao F. et al., 2020)

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, es decir, mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa (Londoño J., 2012). Existen varios ensayos para medir la capacidad antioxidante ya sea *in vitro* o *in vivo*. La metodología *in vitro* consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos (Kuskoski E. et al., 2005).

Los ensayos para medir la actividad antioxidante están basados en la transferencia de electrones (TE) y en la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH). Los métodos de TE determina la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un oxidante cambiando la coloración cuando esta se reduce; los ensayos basados en TE son ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC, etc. Los métodos TAH miden la capacidad un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. Los ensayos basados en TAH son ORAC, TRAP, TBA, etc. (Londoño J., 2012)

El método de DPPH se fundamenta en la capacidad de estabilizar el radical DPPH el cual tiene un electrón desapareado que se genera cuando el reactivo de Difenil-Picril-Hidrazilo (DPPH) reacciona con metanol en la oscuridad, el método fue propuesto originalmente por Brad-Williams (Shalaby E. & Shanab M., 2013). El radical libre DPPH es un radical de nitrógeno orgánico de larga duración con un color morado intenso cuando esta se mezcla con un antioxidante cambia a amarillo.



B)



**Figura 18. Metodología de DPPH A) Reacción entre el radical DPPH y el antioxidante para formar DPPH. B) Efecto de la coloración del radical DPPH a mayor concentración del radical se observa el color morado conforme aumenta la concentración del antioxidante disminuye el DPPH presentando un color amarillo.**

## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la amplia demanda creciente de aditivos de origen natural como los antioxidantes, colorantes, estabilizantes etc. en la industria de los alimentos, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas, siendo los subproductos de alimentos de origen vegetal, una fuente prometedora para extraer compuestos fitoquímicos tales como los ácidos hidroxicinamoilquínicos.

## 5. HIPÓTESIS

Los órganos de *Ipomoea batatas* y de *Sambucus mexicana* son subproductos poco utilizados o no utilizados en la industria de los alimentos en México, sin embargo se infiere que si se tiene un método de extracción óptimo de ácidos hidroxicinamoilquínicos, se obtendrán concentraciones iguales o equivalentes a las hojas de *Coffea arabica* y *canephora*, así como de *Ilex paraguariensis* que son plantas más comúnmente utilizadas en el mundo y destacan por sus concentración de ácidos fenólicos.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

- Extraer los AHQ de fuentes naturales subutilizados en la industria de los alimentos tales como las hojas de *Ipomoea batatas*, hojas de *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, hojas descafeinadas de *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, *Ilex paraguariensis* y flores, hojas y tallos de *Sambucus mexicana* para evaluar su potencial uso para estabilizar las antocianinas de *Ipomoea batatas* y determinar la actividad antioxidante en los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas*.

### 6.2. Objetivos particulares

- Cuantificar el contenido de FT de las hojas de *Coffea robusta* y *Coffea canephora*; hojas descafeinadas de *Coffea robusta* y *Coffea canephora*; flor, hojas y tallos de *Sambucus mexicana*, hojas de *Ipomoea batatas* y *Ilex paraguariensis*.
- Cuantificar el contenido de AT y FT de los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas*.
- Obtener perfil de los extractos concentrados de los AHCQ de las hojas de *Coffea robusta* y *Coffea canephora*; hojas descafeinadas de *Coffea robusta* y *Coffea*

*canephora*; flor, hojas y tallos de *Sambucus mexicana*, hojas de *Ipomoea batatas* y *Ilex paraguariensis*.

- Evaluar la estabilidad de las antocianinas *Ipomoea batatas* con la fuente con mayor contenido de AHCQ a distintas condiciones de temperatura y luz solar.
- Determinar la actividad antioxidante de los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas*.

## 7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 7.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental se realizó de acuerdo a lo descrito en la *Figura 19*.

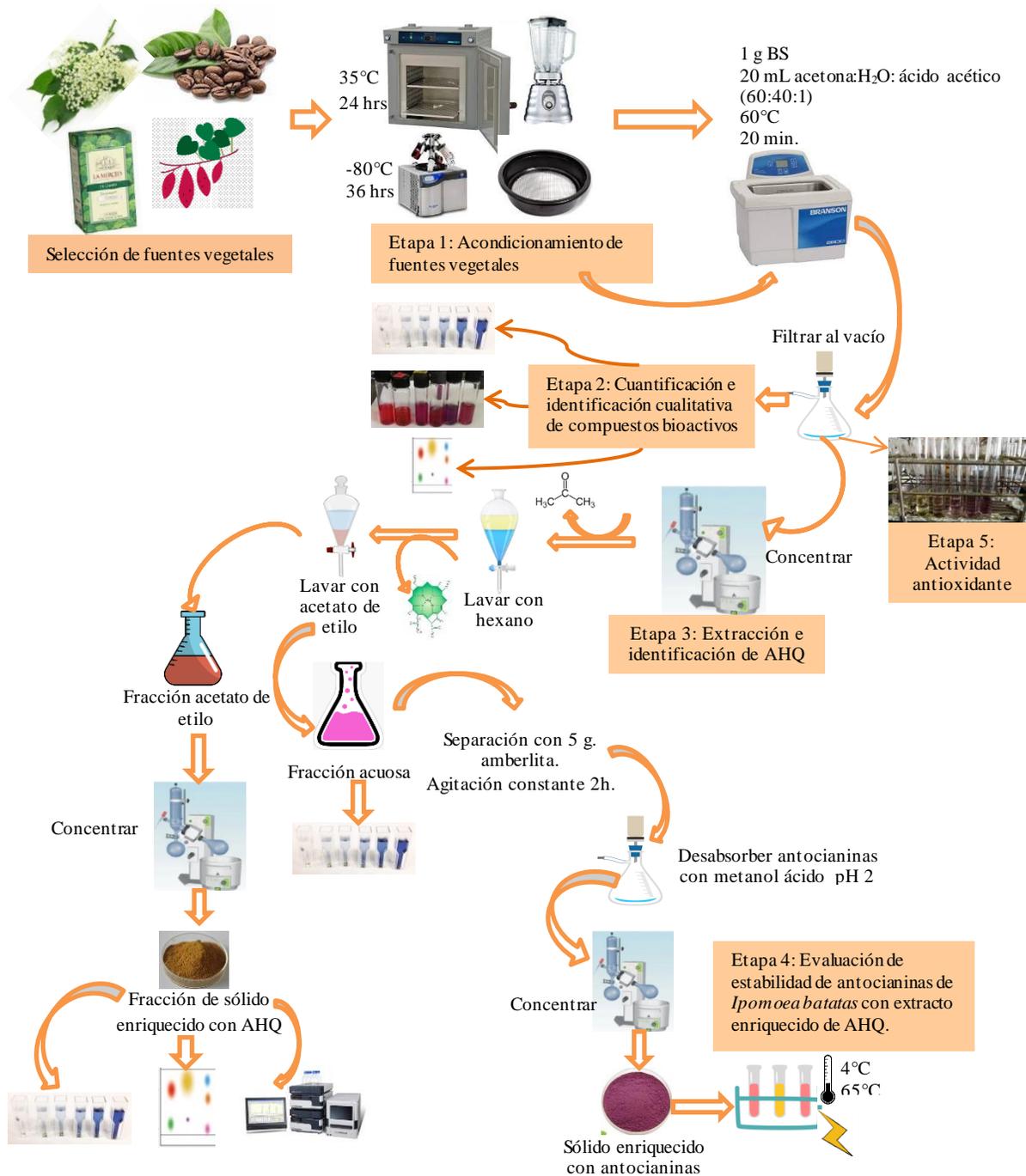


Figura 19. Esquema general de estrategia de experimental

## 7.2. Procedimiento experimental.

### 7.2.1. ETAPA 1. Acondicionamiento de fuentes vegetales.

Las fuentes vegetales que se utilizaron para extraer de AHCQ se encuentran en la *Tabla 1* indicando la procedencia y clasificación de cada una de ellas.

**Tabla 1. Lista de las fuentes vegetales seleccionadas para extraer los AHCQ, procedencia y clave**

Fuente	Procedencia	Clave
Hojas de <i>Coffea canephora</i> .	Empresa Dicafe, Estado de Veracruz	A1
Hojas de <i>Coffea arábica</i> .	Empresa Dicafe, Estado de Veracruz	A2
Hojas descafeinadas <i>Coffea canephora</i> .	Empresa Dicafe, Estado de Veracruz	A3
Hojas descafeinadas <i>Coffea arábica</i> .	Empresa Dicafe, Estado de Veracruz	A4
Flor de <i>Sambucus mexicana</i>	Ciudad Universitaria	B1
Hojas y tallos de <i>Sambucus mexicana</i>	Ciudad Universitaria	B2
Hojas y tallos de <i>Ilex paraguariensis</i>	Marca comercial "La Merced de Campo"	C1
Hojas de <i>Ipomoea batatas</i>	Empresa Dicafe, Estado de Veracruz	D1

Las hojas de *Coffea* de la variedad *canephora* y *arábica*, las hojas descafeinadas de *Coffea canephora* y *arábica*, flor, hojas y tallos de *Sambucus mexicana* y las hojas de *Ipomoea batatas* se secaron en la estufa a 35°C por 24 horas, se molieron en la licuadora y tamizaron en la malla número 60.

La raíz de *Ipomoea batatas* de la variedad morada de primera, segunda y tercera calidad se cortó en rebanadas de 5mm de espesor aproximadamente, se congeló a -80°C, se liofilizaron por 36 horas y la muestra se pulverizó en la licuadora.

### 7.2.2. ETAPA 2. Cuantificación e identificación cualitativa de compuestos bioactivos.

#### 7.2.2.1. Preparación del extracto

La preparación de extracto se realizó de acuerdo a la metodología previamente establecida por *Torres Alcalá, 2013* ya que bajo estas condiciones se obtiene la mayor concentración de fenoles; se pesó 1 gramo de la Base Seca acondicionadas de acuerdo al punto anterior y se diluyó en 20 mL de una disolución compuesta de acetona:agua (40:60) al 1% con ácido acético. Se sónico por 20 minutos a 60°C. Se filtró al vacío con papel filtro y celita. Los extractos se realizaron por triplicado

### 7.2.2.2. FT por el método de Folin-Ciocalteu

Se cuantificó por medio de la metodología descrita por Plaza M. et. al, 2018. Se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del extracto, se adicionaron 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% por dos minutos; se adicionó 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin Ciocalteu previamente diluido con agua en una proporción 1:1, se dejó reaccionar por 30 minutos, se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 750 nm. Se realizaron las curvas estándar de ácido tánico y ácido clorogénico (ANEXO 1).

### 7.2.2.3. AT por el método de pH diferencial.

Se llevó a cabo la medición de antocianinas totales de las partes del cultivo de camote morado por medio de la metodología de pH-diferencial reportada por Giusti & Wrolstad, 2005 el cual se basa en la reacción que ocurre cuando los pigmentos de antocianina sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio de pH, la forma de catión flavilio coloreada predomina a pH 1 y la forma de hemiacetal incolora a pH 4.5.

Se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de extracto y 1.8 mL de buffer de cloruros 0.025 M a pH=1, se leyó absorbancia a 520 y 700 nm.

Se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de extracto y 1.8 mL de buffer de acetatos 0.4 M a pH=4.5, se leyó absorbancia a 520 y 700 nm.

El blanco que se leyó a 520 y 700 nm es de agua destilada. Los resultados se expresaron en mg de cianidina-3-glucósido/gramo de muestra seca. La absorbancia corregida se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

Se calcula después la concentración de pigmento de antocianina monomérica en el extracto de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$CAM = \frac{A^* \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times 1}$$

Donde:

*CAM = Concentración de Antocianina monomérica*

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

$$FD = \text{Factor de Dilución} = 10$$

$$\varepsilon = \text{Absortividad molar de cianidina - 3 - glucósido} = 26900 \frac{L}{mg * cm}$$

#### **7.2.2.4. Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se cortaron placas de aluminio con gel sílice de 2 milímetros de espesor de 8 cm de ancho por 7 cm de altura; se eluyó con una mezcla de acetato de etilo:agua: ácido fórmico (85:10:15 v/v). Se corrieron además estándares de referencia de 5-CQA, rutina, una mezcla de AHCQ previamente identificadas y estudiadas en el laboratorio de las hojas de *I. batatas* variedad morada y AC.

### **7.2.3. ETAPA 3. Extracción e identificación de AHCQ.**

#### **7.2.3.1. Extracción de AHCQ.**

El procedimiento que se llevó a cabo para obtener extractos concentrados de la fracción enriquecida de los AHCQ de las fuentes antes mencionadas fue a partir del extracto del punto 7.2.2.1 a la cual se le denominó “Primera extracción” y se cuantificó los FT. Se evaporó la acetona en el rotavapor y se hicieron extracciones con 8 mL de hexano, se descartó la fase orgánica. La fase acuosa se le hizo cuatro lavados con 4 mL de acetato de etilo, el volumen de la fase orgánica se concentró a sequedad a este concentrado se le denominó “Fracción de sólidos”, se pesó para calcular el rendimiento de la extracción y se diluyó en 5 mL de metanol al 80% con 1% de ácido acético para medir la concentración de FT. La “Fase acuosa” se aforo a 20 mL con agua y se la midió la concentración de FT. Las extracciones se realizaron por triplicado.

#### **7.2.3.2. Identificación de AHCQ por CCF y HPLC**

De la fracción de sólidos concentrada se pesó 1 mg y se diluyó en 1 mL de metanol en un vial para HPLC. La metodología se realizó de acuerdo a lo reportado por Torres Alcalá, 2016. Se llevó a cabo por Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC) de fase inversa usando una columna Hipersil-Gold C18 (250x4.5 mm, 5µm), 20 µL de inyección, flujo de 1.2 mL/min; las fases móviles que se utilizaron fueron A: H<sub>2</sub>O/acetonitrilo/ácido fórmico (90:10:1 v/v) grado HPLC y la B: acetonitrilo 100% con los gradientes de elución

que se encuentran en la *Tabla 3*. Los cromatogramas se obtuvieron a una longitud de onda de 320 nm.

**Tabla 2. Gradientes de elución de la fase A y B por metodología HPLC**

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

De la misma disolución de 1 mg/ml de la fracción de sólidos se realizó una CCF de acuerdo a la metodología descrita en el punto 7.2.2.4.

#### **7.2.4. ETAPA 4. Evaluación de estabilidad de las antocianinas de *Ipomoea batatas* con extracto enriquecido de los AHCQ.**

##### **7.2.4.1. Preparación del extracto enriquecido de antocianinas *Ipomoea batatas***

Se extrajeron las antocianinas de la raíz del camote morado por la metodología descrita por *Torres Alcalá, 2016* para ello se preparó el extracto como se indica en el punto 7.2.2.1, se evaporó la acetona, se hicieron 3 lavados con hexano y se descartó la fase orgánica, a la fase acuosa se hizo lavados con acetato de etilo y se descartó la fase de acetato de etilo.

A la fase acuosa se le agrego 5 gramos de amberlita y se agitó durante 2 horas, se lavó la amberlita con agua y se desabsorbió con metanol ajustando el pH a 2 con ácido acético para mantener estable la disolución. Este extracto concentrado se evaporó el disolvente a sequedad y se pesó.

##### **7.2.4.2. Evaluación de la estabilidad de la antocianina a la luz y temperatura.**

Se prepararon dos disoluciones una control la cual contiene el extracto concentrado de antocianinas del *I. batatas* en una concentración de 26 mg/mL y otra del extracto concentrado de los AHCQ de la *I. paraguariensis* con una concentración de 2.6 mg/mL.

Se adicionaron 10 mL del extracto concentrado de la antocianina en un vial y en otro vial se adiciono 5 mL del extracto concentrado de antocianinas y 5 mL del extracto concentrado de la *I. paraguariensis*. Se prepararon por duplicado.

Para observar el efecto de la temperatura unos se pusieron en la estufa a 65°C y otros en refrigeración a 4°C. Para observar el efecto de la luz los frascos se expusieron a la luz.

Se cuantifico el contenido de AT por la metodología de pH diferencial durante 3 días.

### 7.2.5. Etapa 5: Actividad Antioxidante

Se cuantificó la actividad antioxidante de las distintas partes del cultivo de *Ipomoea batatas* por medio de la metodología de DPPH descrita por Mesa-Vanegas et al., 2015. Se preparó el reactivo de DPPH pesando 2.5 mg de DPPH y se aforó a 10 mL con metanol durante 30 minutos en la oscuridad, se hizo una dilución de 1:10 con metanol. Se tomaron 200 µL de extracto y se adicionaron 2000 µL de reactivo DPPH previamente preparado. Se realizó curva estándar de Trolox (ANEXO 1).

### 7.3. Lista de material y equipo.

✓ MATERIAL	✓ EQUIPO
✓ Matraz de Erlenmeyer de 50, 250 y 500 mL	✓ Estufa
✓ Matraz de Kitasato de 50 y 125 mL	✓ Licuadora marca Oster.
✓ Embudo de vidrio y Büchner	✓ Liofilizadora (Labconcon 7522900)
✓ Probeta de 10 mL	✓ Sonicador (Cole-Parmer)
✓ Micropipetas de 200 y 1000 µL (Brand)	✓ Rotavapor (BUCHI) R-215, baño de calentamiento B-491, bomba de vacío V-700
✓ Papel filtro	✓ Cámara de luz UV (UVP)
✓ Placas de aluminio sílice	✓ Balanza (OHAUS AP1105)
✓ Tubos de ensaye de 5 mL	✓ Espectrofotómetro (GBC-CINTRA 101)
✓ Gradilla	✓ Agitadora (LAB-LINE)
✓ Espátula	✓ Congelador -80°C Revco Harris
✓ Embudo de separación	✓ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC: auto inyector waters 2707, bomba waters 1525, detector UV waters 2478 y desgasificador.
✓ Celdas de plástico de 1 y 2 mL	
✓ Celdas de 1 mL de cuarzo	
✓ Viales de 20 mL	

#### **7.4. Análisis estadístico**

Las cuantificaciones que se realizaron en la Etapa 1 y 2 se hicieron por triplicado, se reportó el promedio y desviación estándar.

En la Etapa 2 los resultados obtenidos de la extracción de los ácidos hidroxicinamoil-quínicos se realizaron la prueba ANOVA de un solo factor para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre las muestras con un nivel de confianza del 95%. Para determinar que muestras eran estadísticamente diferentes se realizó la prueba Tukey con el programa Realstats en Excel con un nivel de confianza del 95%

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Etapa 2: Cuantificación de compuestos bioactivos

#### 8.1.1. Compuestos bioactivos en fuentes de AHCQ

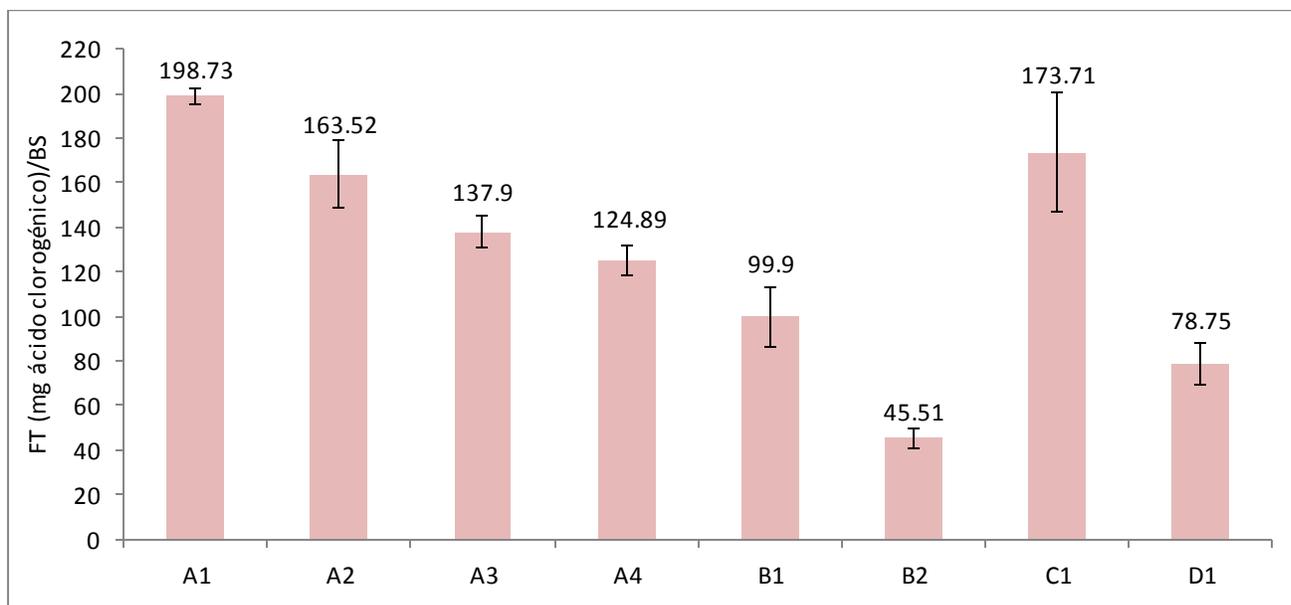
Para determinar el contenido de FT en cada una de las plantas y órganos estudiados, se llevó a cabo el método de Folin-Ciocalteu. En el *Gráfico 1* se encuentran los resultados experimentales expresados en mg de ácido clorogénico o FT/BS, en donde se observa que las las hojas de *Coffea canephora*(A1) fue la fuente con una alta concentración de FT, le sigue la *Ilex paraguariensis*(C1); hojas de *Coffea arábica*(A2), hojas descafeinadas *Coffea canephora*(A3), hojas descafeinadas *Coffea arábica*(A4), flor de *Sambucus mexicana*(B1), hojas de *Ipomoea batatas*(D1) y las de menor concentración fueron las hojas y tallos de *Sambucus mexicana*(B2).

Comparando estos resultados con datos reportados en la literatura (*Tabla 3*), las hojas de café de la variedad *canephora* es la fuente que reportan mayor concentración de FT ( $244.23 \pm 1.76$  FT/BS), valores por encima de los que se obtuvo en esta investigación ( $198 \pm 3.63$  FT/BS). Esa diferencia de valores es probable que sea a que el proceso de extracción se realizó con diferentes disolventes ya que en el caso de las hojas de la variedad *canephora* y *arábica* la cifra es mayor en la *Tabla 3* debido al uso de metanol como disolvente para extraer estos compuestos bioactivos (Kristiningrum et al., 2016), el uso de este disolvente tiene como limitante que su grado es no alimentario debido a la toxicidad que provoca al ser ingerido sin embargo es el más eficiente para extraer polifenoles de bajo peso molecular (Chen X. et al., 2019). Por otro lado, las hojas de café que tienen el proceso de descafeinado presentaron una concentración alta de FT; estos datos podrían ser de gran interés comercial ya que esta hojas descafeinadas son consideradas como residuos, tomando en cuenta que el compuesto de interés es la cafeína, sin embargo, aún siguen presente una concentración considerable de fenoles que pueden ser utilizados en las diferentes industrias.

Respecto a la flor de *Sambucus mexicana* (*Gráfico 1*) presentó una concentración de  $99.90 \pm 13.36$  FT/BS, la cual comparando con lo reportado en la literatura (*Tabla 3*) que corresponde a la variedad *Sambucus nigra* cuya concentración fue de 73.3 mg ácido

gálico/g muestra es superior considerándola una fuente prometedora de FT con respecto a la otra variedad.

En el caso de la *Ilex paraguariensis* y las hojas de *Ipomoea batatas* los valores del Gráfico 1 son mayores a los reportados en la literatura, esto se puede deber a que la concentración de FT depende de muchos factores como el tiempo de cultivo, el lugar, el tratamiento de la muestra y el proceso de extracción.



**Gráfico 1.** Contenido de FT/BS de las diferentes fuentes vegetales expresadas en mg de ácido clorogénico.

**Tabla 3.** Resultados reportados en la literatura de contenido de FT en hojas de *Coffea arábica*, hojas de *Coffea canephora*, *Ilex paraguariensis*, flor de *Sambucus nigra* y hojas de *Ipomoea batatas*.

Muestra	Contenido de F.T.	Fuente bibliográfica
Hojas de <i>Coffea arábica</i>	190.91±1.71 mg ácido clorogénico/BS	Kristiningrum N. et al., 2016
Hojas de <i>Coffea canephora</i>	244.23±1.76 mg ácido clorogénico/BS	Kristiningrum N. et al., 2016
<i>Ilex paraguariensis</i>	133.31 mg ácido clorogénico/BS	Frizon C. et al., 2015
<i>Sambucus nigra</i> (Flor)	73.3 mg ácido gálico/BS	Mohadese M. et al., 2012
Hojas de <i>Ipomoea batatas</i>	43.8 mg ácido clorogénico/BS	Fu Z-f et al., 2016

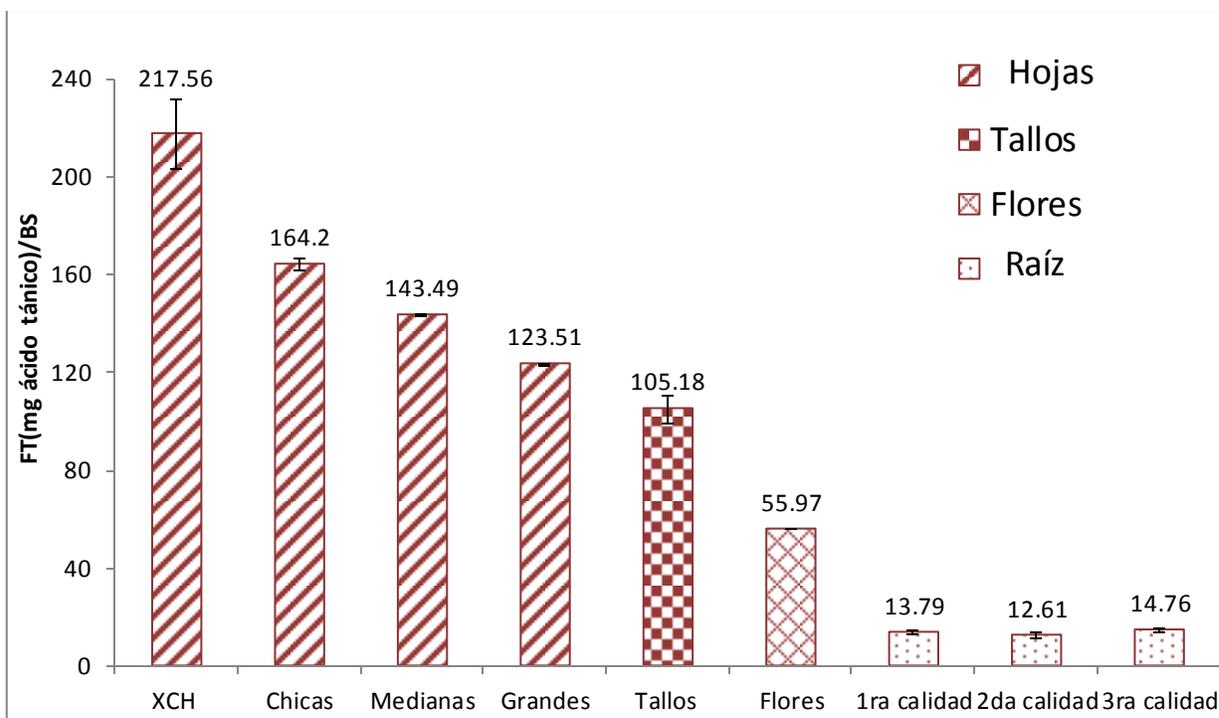
### 8.1.2. Compuestos bioactivos en el cultivo de *Ipomoea batatas*

Debido a que la planta de camote, es una de las muestra vegetales con mayor contenido de FT se procedió a cuantificarlos principales ácidos fenólicos presentes en cada órgano (las hojas, tallos, flores y raíz del camote morado). Adicionalmente, las hojas se clasificaron de menor a mayor tamaño en “XCH”, “Chicas”, “Medianas” y “Grandes”; en el caso de la raíz se clasificaron de acuerdo a la calidad siendo de primera, segunda y tercera.

De acuerdo con los resultados obtenidos las hojas es el órgano del cultivo que presenta mayor concentración de FT y la raíz la que menor. Las hojas de menor tamaño, (XCH) fueron las que presentaron la concentración más alta de  $217.56 \pm 14.11$  FT/BS y las “Grandes” presentaron la menor concentración de FT ( $123.51 \pm 0.34$  FT/BS). El comportamiento que se observó, respecto al tamaño de las hojas y el contenido de FT, se debió principalmente al estado de desarrollo, es decir, que en edad temprana las rutas metabólicas favorecen la formación de estos compuestos debido a la alta tasa de crecimiento, en el caso particular de las hojas grandes el metabolismo disminuye y por tanto la concentración de fenoles es menor (Ricco R.A. et al., 2011).

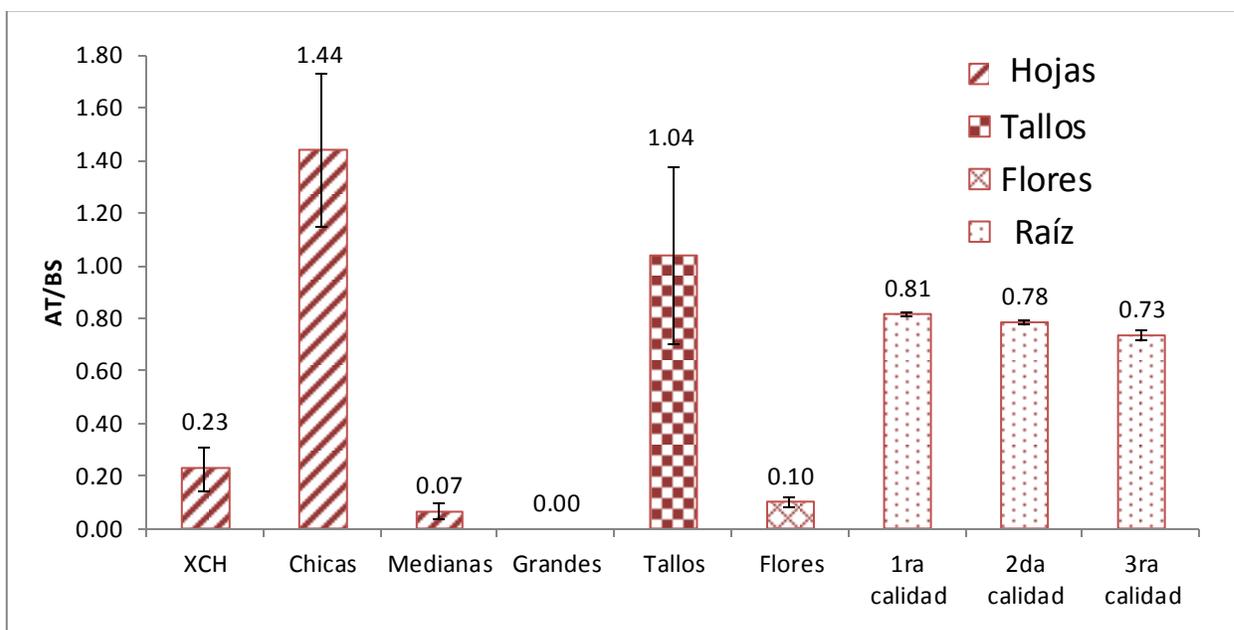
Comparando los resultados experimentales con los reportados en la literatura (*Tabla 4*), al igual que en la presente investigación las hojas fueron el órgano que presentaron los valores más altos de FT, seguido de la flor, tallos y por último las raíces.

En el caso de la raíz, los valores presentados de FT en esta investigación coinciden en el límite inferior con los previamente citados en la literatura (10.04-50.99 mg de ácido tánico por gramo de muestra), cabe destacar que estos resultados varían dependiendo del lugar de procedencia, el clima, el estado de madurez y del tratamiento de la muestra.



**Gráfico 2. Contenido de FT expresados en mg de ácido tánico por BS de los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas***

Se cuantificó el contenido de antocianinas totales expresados en AT/BS en el *Gráfico 3* se observan los resultados obtenidos de los distintos órganos de *Ipomoea batatas*, las hojas “Chicas” tuvieron una mayor concentración de  $1.44 \pm 0.293$  AT/BS seguido de los tallos  $1.04 \pm 0.334$  AT/BS y la raíz. En el caso de las tres calidades de la raíz la que presentó una concentración mayor de AT fue la de primera calidad seguida por la de segunda y por último la de tercera aunque cabe destacar que la diferencia no varió tanto entre dichas calidades, comparando los resultados experimentales con los de la *Tabla 4* que corresponden a los reportados en la literatura se encuentran cercanos sin embargo se esperaba que la raíz fuera el órgano que presentaría mayor concentración en comparación con las hojas.



**Gráfico 3. Contenido de AT/BS en los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas*.**

**Tabla 4. Resultados reportados en la literatura de antocianinas expresados en AT/BS y FT en mg de ácido tánico por BS**

Muestra	Contenido	Fuente bibliográfica
<b>Hojas</b>	Antocianinas: 0.038, 0.24 y 0.448 AT/BS	Su X. et al., 2019
	Fenoles: 77.63±2.64; 78.66 FT/BS	Torres A., 2016
<b>Tallos</b>	Antocianinas: 0.72±0.0025 AT/BS	Torres A., 2016
	Fenoles: 15.26±0.86 FT/BS	Torres A., 2016
<b>Flor</b>	Antocianinas: 1.49±0.089 AT/BS	Torres A., 2016
	Fenoles: 23.37±1.68 FT/BS	Torres A., 2016
<b>Raíz liofilizada</b>	Antocianinas: 0.13 AT/BS	Su X. et al., 2019
	Fenoles: 10.04-50.99 FT/BS	Torres A., 2016

### 8.1.3. CCF de los compuestos bioactivos de AHCQ.

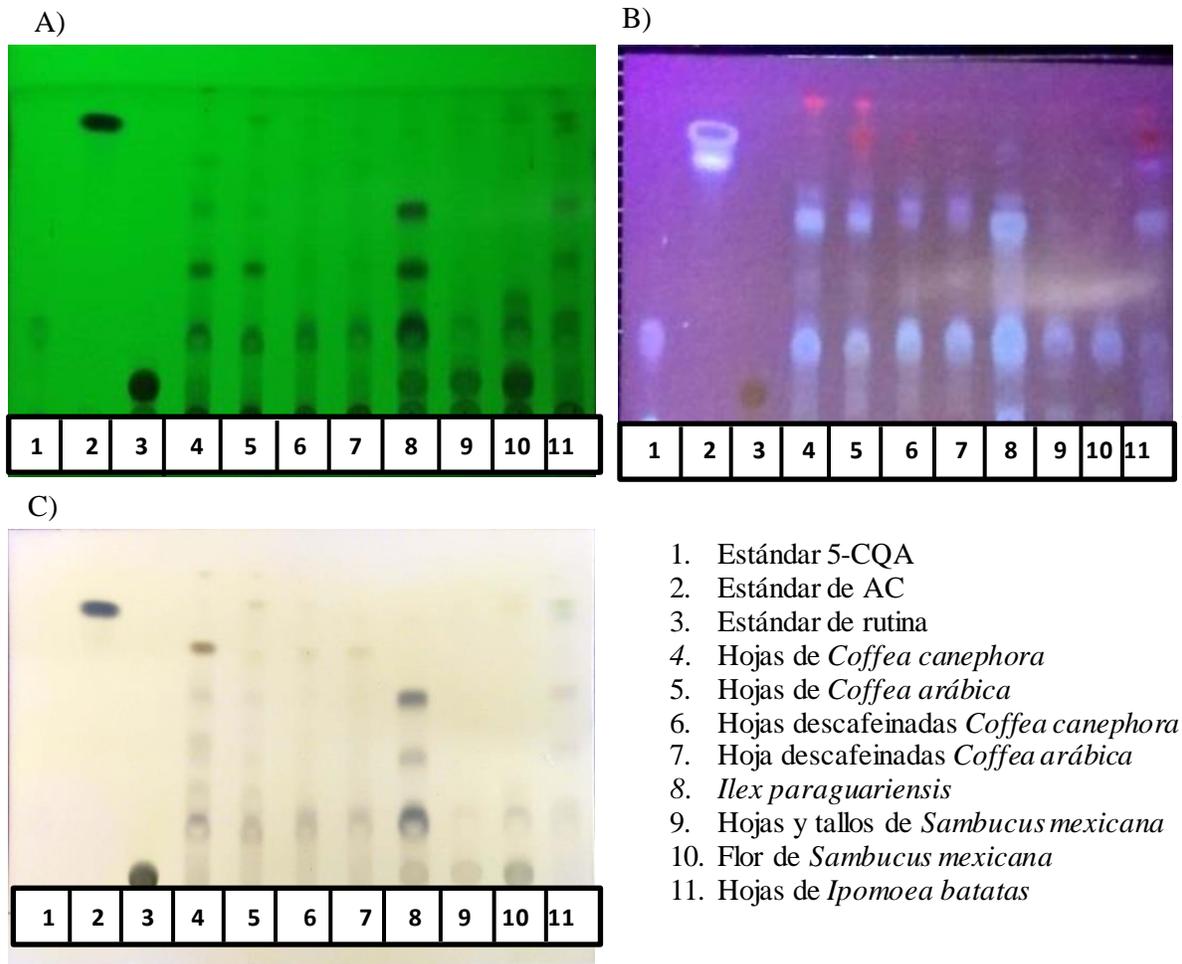
En la *Figura 20* se observa la CCF de los extractos que se obtuvieron al realizar la extracción con acetona:agua (40:60) al 1% con ácido acético donde además se corrieron estándares de referencia de 5-CQA(1), AC (2) y de rutina (3).

Todas las muestras analizadas en el presente estudio, presentaron un RF igual al estándar comercial de 5-CQA, sin embargo *Ilex paraguariensis* presentó una señal más intensa respecto al resto de las muestras.

En las hojas de *Coffea canephora* (4) y *Coffea arábica* (5), el perfil de AHCQ se observó que fue similar ya que presentaron las mismas bandas al ser reveladas a las diferentes longitudes de onda. Sin embargo, cuando se reveló con sulfato sérico (inciso C), se logró observar una mayor intensidad en las bandas de la variedad *canephora*, lo cual se le puede atribuir a que es la variedad con mayor concentración de FT.

Por otra parte, en la región que hay entre los RFs estándares comerciales de ácido clorogénico (1) y cafeico (2), es donde se encuentran los RFs de los isómeros de los ácidos di-cafeoilquínicos. En las muestras de hojas de *Coffea canephora*, *Coffea arábica*, las hojas descafeinadas de *Coffea canephora*, *Coffea arábica*, *Ilex paraguariensis* y hojas de *Ipomoea batatas* se observa una considerable intensidad de las bandas de dichos ácidos, por lo que se podría decir que los FT cuantificados por el método espectrofotométrico se debe principalmente a la presencia del ácido clorogénico y a los isómeros del di-cafeoilquínico.

Adicionalmente, se eluyó un estándar comercial de rutina, debido a que se ha descrito en la literatura que el perfil de polifenoles de la flor de *Sambucus nigra* el ácido clorogénico y la rutina son los principales compuestos bioactivos identificados (Milena V. et al., 2019). En el caso de *Sambucus mexicana* se obtuvo que las hojas, tallos (9) y las flores (10) presentaron de acuerdo al RF de rutina una banda intensa, siendo un poco superior en las flores como se observa en el inciso A) y en el inciso C). Cabe destacar que, la importancia de la rutina, también conocido como la quercetina-3-rutinósido (pertenece al grupo de los polifenoles es un flavonol glucósido), es que se ha reportado que presenta varias funciones clínicas debido a su benéfico potencial en prevenir enfermedades como cáncer, cardiovasculares neurodegenerativas, diabetes u osteoporosis (Gullón B. et al., 2017).



**Figura 20.** CCF de extractos de *Coffea canephora*, *Coffea arábica*, *Ilex paraguariensis*, *Sambucus mexicana* e *Ipomoea batatas*. A)  $\lambda$  larga, B)  $\lambda$  corta y C) revelada con sulfato sérico al 2%

## 8.2.Etapa 3: Extracción e identificación de compuestos bioactivos.

### 8.2.1. Extracción de AHCQ

En esta etapa se llevó a cabo la extracción con diferentes disolventes de los AHCQ de las fuentes vegetales estudiadas, utilizando la metodología descrita en el punto 7.2.3.1.

En la *Tabla 5* se observan los resultados obtenidos de cada una de las diferentes etapas de extracción. Además, se realizó la prueba estadística ANOVA a cada una de las columnas y la Prueba Tukey para determinar las fuentes que son estadísticamente diferentes (Anexo 2).

En la *Tabla 5* la columna que lleva por título “Primera extracción” la cual se realizó con acetona:agua:ácido acético (60:40:1) la concentración de FT que se obtuvo fue de

45.51±4.35 a 198.73±3.63 FT/BS; siendo las hojas y tallos de *Sambucus mexicana* las de menor concentración y las hojas de *Coffea canephora* las de mayor, esta última además de ser la fuente con mayor contenido de FT no presenta diferencia estadísticamente significativa con las hojas de *Coffea arábica* (163.52±15.20 FT/BS) y *Ilex paraguariensis* (173.71±26.89 FT/BS).

En la “Fracción acuosa” la concentración fue de 25.27±2.27 a 121.14±5.71 FT/BS; la concentración más baja corresponde a las hojas y tallos de *Sambucus mexicana* y la más alta a las hojas de *Coffea canephora*. A esta fracción se le cuantificó el contenido de FT debido a que como se observa en la *Figura 21* se realizó una CCF de la fracción acuosa y de acetato de etilo de las hojas de *Coffea canephora* y *Coffea arábica* en ambas fuentes se observa que cuando se reveló en la  $\lambda$  larga y corta de acuerdo al RF del 5-CQA esta permanece en la disolución de dichas fracciones.

Respecto a la “Fracción de acetato de etilo” de acuerdo a la CCF en *Figura 21A*) se corrió una solución de referencia de AHCQ de hojas de *Ipomoea batatas* previamente identificadas de acuerdo a los RF's los AHCQ permanecen en la disolución, en general de acuerdo a las propiedades químicas de los di-CQA los cuales son menos polares que los CQA se disuelven bien en acetato de etilo, acetato de butilo y acetona (Gil M. & Wianowska D., 2017). De acuerdo con la *Tabla 5* en la fracción de acetato de etilo la concentración que se obtuvo fue de 5.28±0.08 a 48.58±1.98 FT/BS, las fuentes con mayor concentración fueron las hojas de *Coffea arábica* (48.58±1.98 FT/BS), *Coffea canephora* (48.11±1.28 FT/BS) y *Ilex paraguariensis* (46.27±6.42 mg/g) estas no presentaron diferencia estadísticamente significativa en la prueba ANOVA y las hojas y tallos de *Sambucus mexicana* fue la fuente con menor concentración (5.28±0.08 FT/BS).

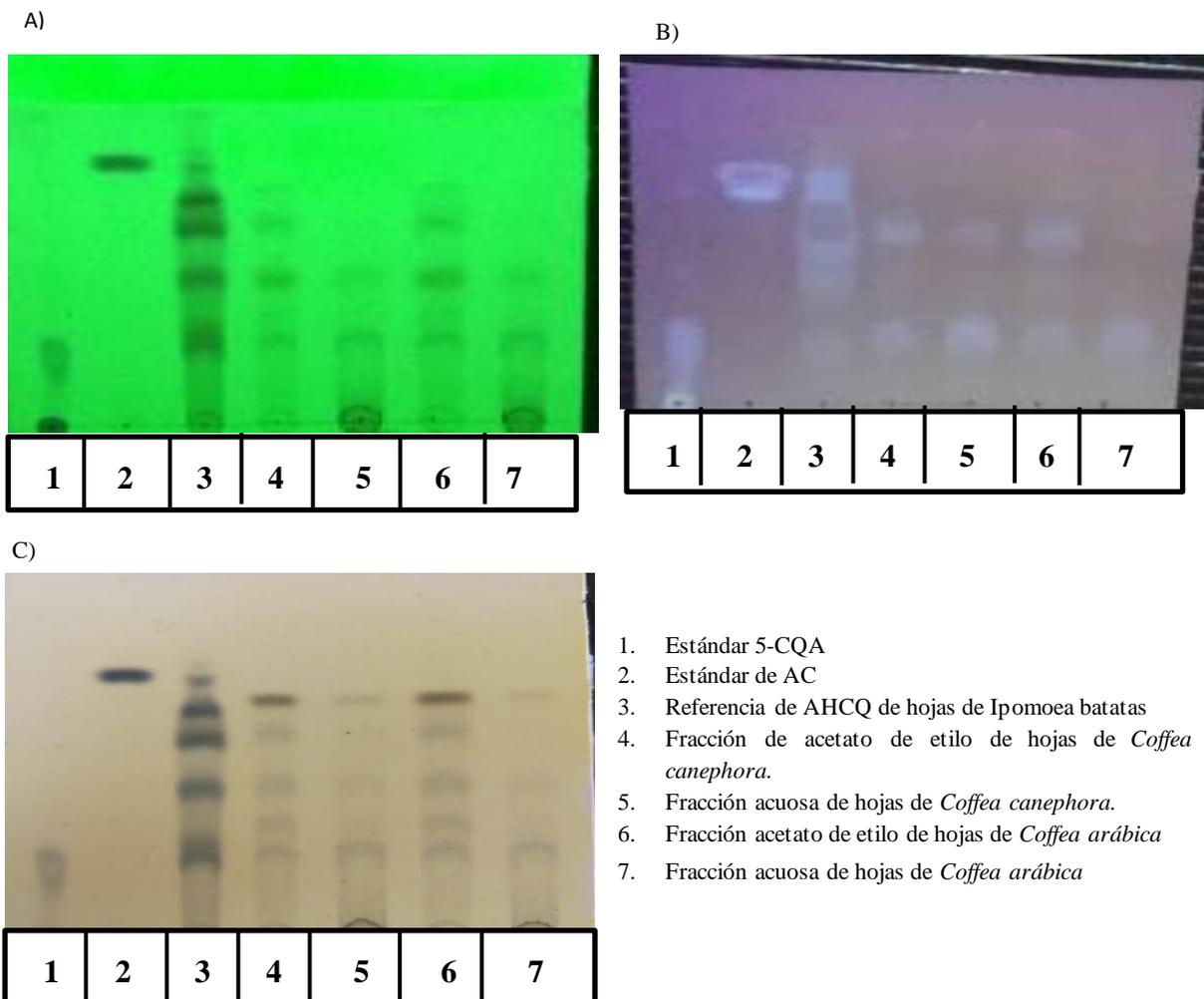
La columna de “Fracción de sólidos” es la que se obtuvo al secar el producto de la disolución de acetato de etilo de las diferentes fuentes, *Ilex paraguariensis* fue la fuente con un mayor rendimiento de extracción obteniendo 0.1018±0.0154 g o el 10.28% lo cual coincide con lo reportado en la literatura que cerca del 10% del peso seco de *I. paraguariensis* está compuesto de derivados del CQA principalmente 3,5-dicafeoil-quinico, 4,5-dicafeoil-quinico, 3,4-dicafeoil-quinico y ácidos clorogénicos con trazas de ácido cafeico y flavonoides (Bravo L. et al., 2007) de las otras fuentes el porcentaje de

rendimiento que se obtuvo fue de entre 0.80- 4.46% siendo las hojas de *Coffea canephora* (4.46%), las hojas de *Coffea arábica* ( 4.30%) y hojas de *Ipomoea batatas* (4.24%) las que presentaron un rendimiento considerablemente alto en comparación de las otras muestra.

**Tabla 5. Resultados del proceso de extracción de fracción concentrada de los AHCL en *Coffea canephora*, *Coffea arábica*, *Sambucus mexicana*, *Ilex paraguariensis* e *Ipomoea batatas*.**

Fuente	Primera extracción (FT /BS)	Fracción acuosa (FT/BS)	Fracción de acetato de etilo (mg/BS)	Fracción de sólidos (mg)	Rendimiento %
Hoja de <i>Coffea canephora</i>	198.73±3.63 <sup>a</sup>	121.14±5.71 <sup>g</sup>	48.11±1.28 <sup>a</sup>	44.6±0.0047 <sup>a</sup>	4.46
Hoja de <i>Coffea arábica</i>	163.52±15.20 <sup>a,b</sup>	87.70±9.49 <sup>a</sup>	48.58±1.98 <sup>a,b</sup>	43±0.0015 <sup>a,b</sup>	4.30
Hojas descafeinadas <i>Coffea canephora</i>	137.90±6.88 <sup>b,c</sup>	80.96±3.93 <sup>a,b</sup>	24.00±2.02 <sup>c</sup>	14.9±0.0022 <sup>c,d</sup>	1.49
Hojas descafeinadas <i>Coffea arábica</i>	124.89±6.85 <sup>b,c,d</sup>	70.26±3.67 <sup>a,b</sup>	30.87±5.02 <sup>c,d</sup>	19.7±0.0006 <sup>a,b,c,e</sup>	1.97
Flor <i>Sambucus mexicana</i>	99.90±13.36 <sup>c,d,f</sup>	47.62±3.29 <sup>c</sup>	13.35±1.41 <sup>c,e</sup>	174.4±0.0053 <sup>a,b,c,e,f</sup>	1.74
Hojas y tallos <i>Sambucus mexicana</i>	45.51±4.35 <sup>g</sup>	25.27±2.27 <sup>d</sup>	5.28±0.08 <sup>e</sup>	8±0.006 <sup>d,e,f</sup>	0.80
<i>Ilex paraguariensis</i>	173.71±26.89 <sup>a,b,c</sup>	43.73±11.89 <sup>c,d,f</sup>	46.27±6.42 <sup>a,b</sup>	102.8±0.0154 <sup>g</sup>	10.28
Hojas <i>Ipomoea batatas</i>	78.75±9.32 <sup>f,g</sup>	25.76±3.81 <sup>c,d,f</sup>	21.16±3.91 <sup>c,d,e</sup>	42.4±0.0136 <sup>a,b,e,f</sup>	4.24

a, b, c,...- Diferentes letras en el superíndice dentro de una columna denota diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 21.** CCF de las hojas de *Coffea canephora* y *Coffea arábica* revelada A)  $\lambda$  larga, B)  $\lambda$  corta y C) con sulfato sérico al 2%

### 8.2.2. Identificación de AHCQ

De la fracción de sólidos de la etapa de extracción se pesó 1 mg y se diluyó en 1 mL de metanol para identificar el perfil de AHCL de forma cualitativa por la técnica de CCF y HPLC de las diferentes fuentes.

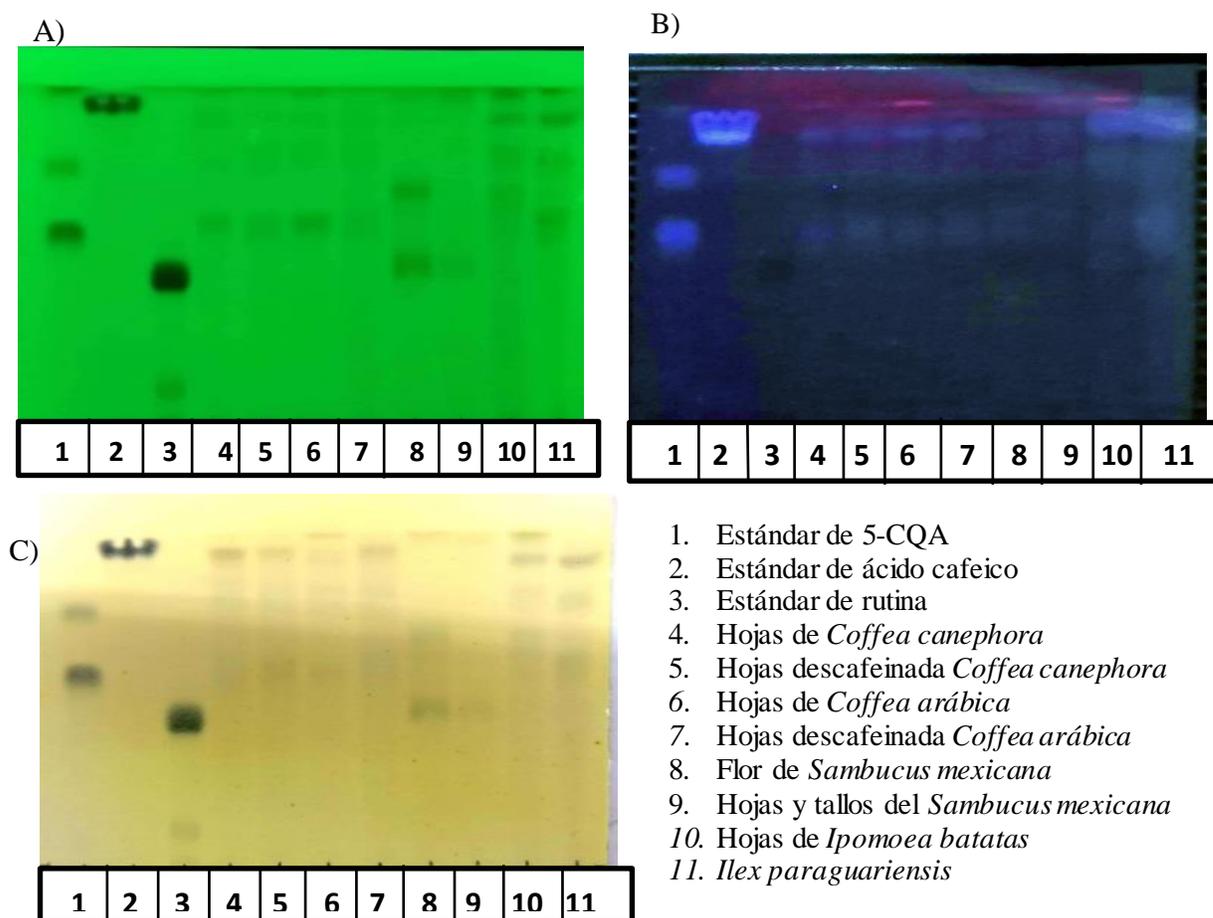
En la *Figura 22* de acuerdo a las CCF revelada en las distintas condiciones se observó que todas las fuentes presentaron la banda característica del RF del estándar del ácido clorogénico siendo las hojas *Coffea* sin tratamiento y descafeinadas de ambas variedades y *Ilex paraguariensis* las de mayor intensidad.

De acuerdo a los RF's de los di-CQA se observó en el caso de *Ipomoea batatas* e *Ilex paraguariensis* un perfil similar sin embargo *I. paraguariensis* presentó mayor intensidad

de acuerdo al inciso B que corresponde a la  $\lambda$  corta. En el caso de las hojas de *Coffea* sin tratamiento y descafeinadas de ambas variedades tuvieron presencia de bandas características de los ácidos di-CQA iguales de menor intensidad que en el caso del ácido clorogénico.

En el perfil de la CCF de *Sambucus mexicana* se observó que las bandas con mayor intensidad corresponden al RF del ácido clorogénico y la rutina, en el caso de los di-CQA de acuerdo con el RF's de estos la intensidad es menor que las otras fuentes.

En el caso del RF del ácido cafeico las hojas de *Coffea* sin tratamiento y descafeinadas de ambas variedades, *Ilex paraguariensis* y las hojas de *Ipomoea batatas* fueron las que presentaron una mayor intensidad en comparación con *Sambucus mexicana*



**Figura 22.** CCF de la fracción de sólidos en una concentración de 1mg/mL de las hojas de *Coffea canephora*, *Coffea arábica*, *Sambucus mexicana*, hojas de *Ipomoea batatas* y de *Ilex paraguariensis*. A)  $\lambda$  larga. B)  $\lambda$  corta y C) placa revelada con sulfato sérico.

En la *Figura 23, 24, 25 y 26* se encuentran las imágenes de los cromatogramas que se obtuvieron por la metodología de HPLC. El perfil de los AHCQ de las hojas de *Coffea canephora* (Fig.23a), de acuerdo con el área del pico el 5-CQA se encontró en mayor proporción en comparación con el AC y 3,5-diCQA en la literatura se reportó que los compuestos fenólicos más acumulados en las hojas de café fueron 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA 3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 4,5-diCQA, el 5-CQA representó entre el 80-94% de la mayoría de las especies de *Coffea* (Chen X., 2019). En el caso de las hojas descafeinadas de la variedad *canephora* (Fig.23b) el 5-CQA de acuerdo con el área del pico fue el que se encontró en mayor proporción en comparación al AC y 3,5-diCQA; sin embargo al comparar con las hojas sin tratamiento hubo una disminución en el área del pico que corresponde al AC debido muy probablemente al tratamiento del descafeinado.

Las hojas de *Coffea arábica* (Fig.24c) el 5-CQA se encuentra en mayor proporción seguido del 3,5-diCQA y AC. Haciendo una comparación entre variedad, ambas del inciso A y C de acuerdo con el área del pico se obtuvo una mayor proporción del ácido 5-CQA en la *canephora* y en la *arábica* la proporción fue mayor del 3,5-diCQA, en la literatura se encontró que las hojas de *C. arábica* acumulan más AHCQ en comparación con *C. canephora* que en porcentaje de hoja seca en la primera fue de 3.9% y en la última del 2.4% (Chen X., 2019).

En el caso de las hojas descafeinadas de *Coffea arábica* (Fig.24d) de acuerdo con el área del pico el ácido 3,5-diCQA (Pico 4) es evidente su disminución probablemente por efecto del proceso de descafeinado, debido al efecto de una hetero-asociación de la cafeína con los AHCQ, es decir cuando se eliminó la cafeína se fue parte del 3,5-diCQA asociado con esta molécula (D'Amelio N. et al., 2015).

Para el caso de *Sambucus mexicana* la flor (Fig.25e) presentó en mayor proporción el 5-CQA, seguido de 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3,4-diCQA y AC, las hojas y tallos (Fig.25f) presentan el mismo perfil de AHCQ aunque de acuerdo con el área de del pico la proporción de estos fue menor y disminuyó considerablemente para el caso del 3,5-diCQA. En la literatura no se ha reportado el perfil de *Sambucus mexicana* sin embargo la variedad de *S. nigra* muy particularmente del órgano de la flor se hizo un estudio del contenido de los ácidos mono-cafeoil-quinicos y di-cafeoil-quinicos cuya concentración de

mayor a menor fue: 5-CQA, 3,5-di-CQA, 4,5-diCQA, 3-CQA, 4-CQA, AC y 3,4-CQA (Meinhart A.D. et al., 2017)

El perfil de los AHCQ de las hojas de *Ipomoea batatas* (Fig.26g) fue de 5-CQA, AC, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA y 3,4,5-triCQA; el 3,5-diCQA fue el de mayor proporción de acuerdo al área debajo del pico en comparación con los otros. Haciendo la comparación con lo obtenido en la literatura (inciso ii) el perfil de estos es muy similar con la única diferencia que el 4,5-diCQA no se encontró presente en la muestra experimental. Investigaciones previas ya han identificado el perfil compuestos fenólicos en las hojas de camote reportando de mayor a menor concentración: 3,5-di-CQA, 3,4-di-CQA, 3-CQA, 4,5-di-CQA, AC, 4-CQA, 3,4,5-tri-CQA y 5-CQA (Toong L. et al. 2015). De igual forma el perfil de esta fuente destaca por la presencia del 3,4,5-tri-CQA, se ha comprobado que este compuesto tuvo una actividad antimutagénica y antidiabética más eficaz comparado con los derivados del mono y di-cafeoilquínico (Kurata R. et al., 2011).

Respecto con la yerba mate, (Fig.26h), el perfil de AHCQ fue de 5-CQA, 3,5-di-CQA, 3,4-di-CQA y AC, además de que cabe destacar que en comparación a las otras fuentes de la proporción de los AHCQ de acuerdo con el área del pico fue mayor en el caso del 5-CQA y 3,5-diCQA. En la literatura se reportó el contenido de los ácidos mono-cafeoil-quínico y di-cafeoil-quínico de las hojas y tallos cuya concentración de mayor a menor fue: que de 3,5-diCQA, 3-CQA, 5-CQA, 4,5-di-CQA, 4-CQA y 3,4-di-CQA. Además de que en este estudio que se realizó para determinar la concentración de los principales ácidos monocafeoil-quínicos y dicafeoil-quínicos fue la “yerba mate” la que obtuvo mayor concentración de estos comparándolo con plantas como *Sambucus nigra* (Flor de sauco), *Camellia sinensis* (té negro), *Matricaria chamomilla* (Flor de manzanilla), entre otras cuyas infusiones han sido muy consumidas y se recomienda su ingesta por su aporte nutricional (Meinhart A.D. et al., 2017).

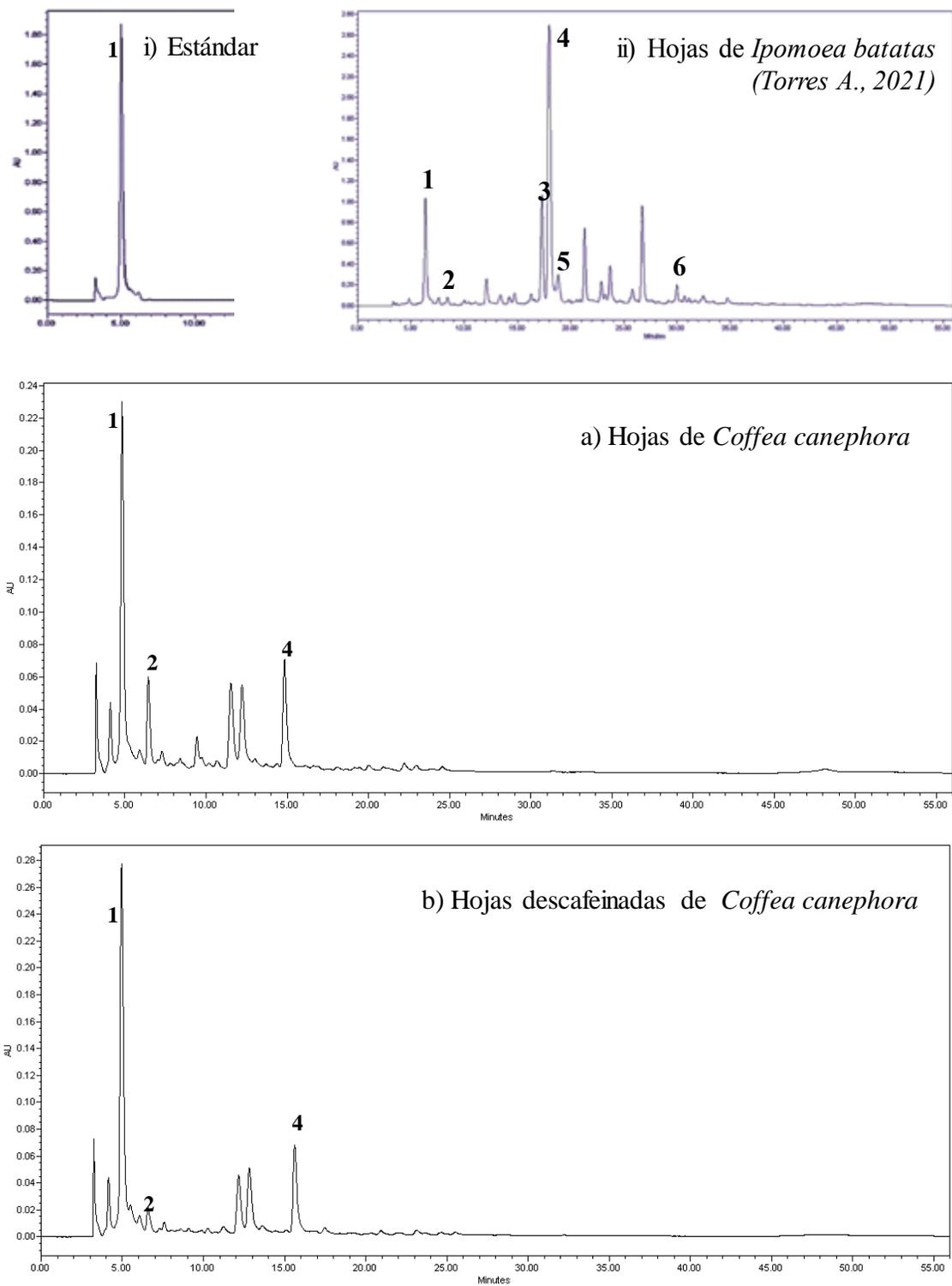


Figura 23. Cromatogramas de la fracción concentrada de sólidos a 320 nm de a) Hojas de *Coffea canephora*, b) Hojas descafeinadas de *Coffea canephora*, i) Estándar de 5-CQA y ii) HPLC literatura hojas de *Ipomoea batatas* [1] Estándar 5-CQA, 2) AC, 3) 3,4-diCQA, 4) 3,5-diCQA, 5) 4,5-diCQA, 6) 3,4,5-triCQA (Torres Alcalá, 2021)]

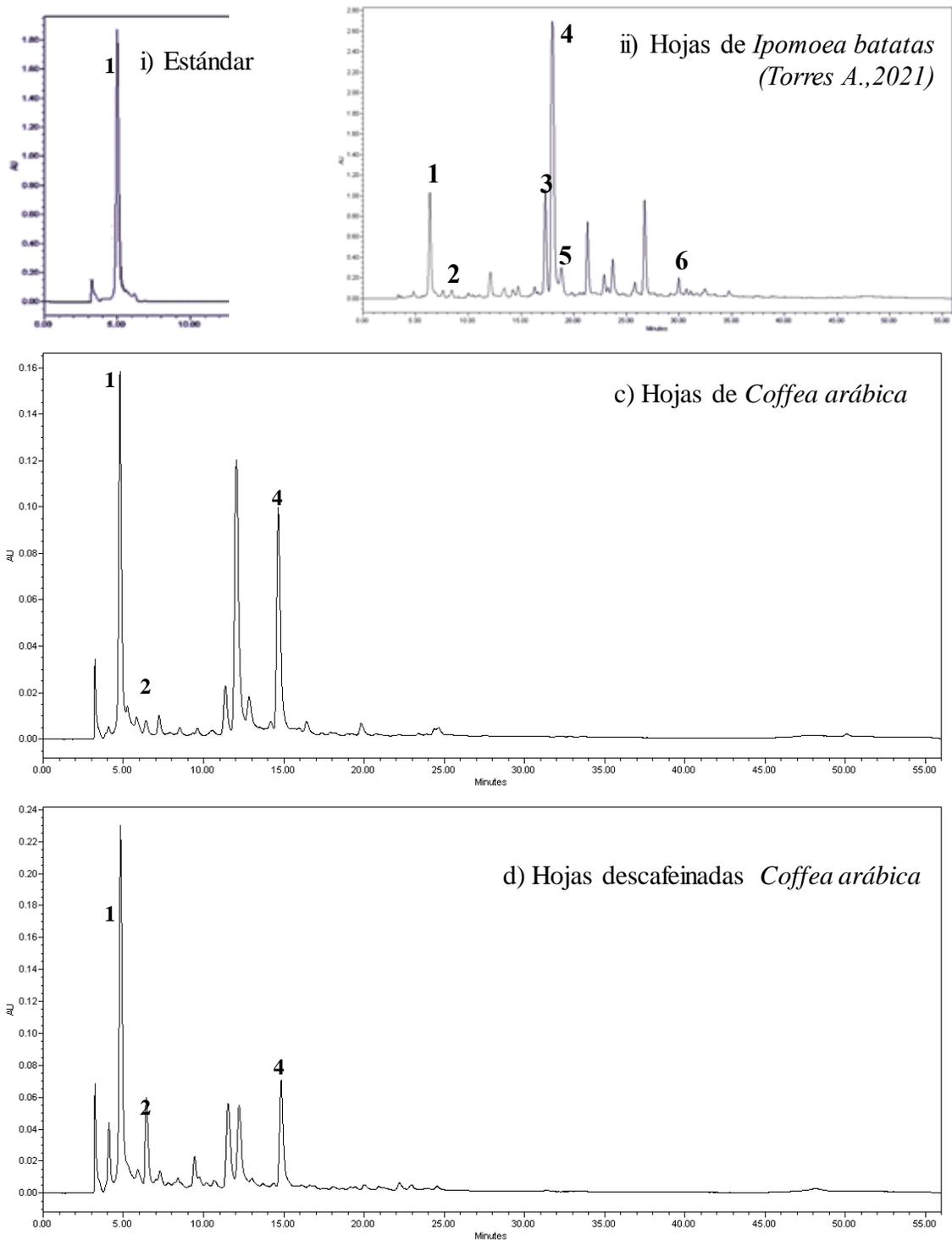


Figura 24 Cromatogramas de la fracción concentrada de sólidos de c) Hojas de *Coffea arabica*, d) Hojas descafeinadas de *Coffea arabica*. i) Estándar de 5-CQA y ii) HPLC literatura hojas de *Ipomoea batatas* [1] Estándar 5-CQA, 2) AC, 3) 3,4-diCQA, 4) 3,5-diCQA, 5) 4,5-diCQA, 6) 3,4,5-triCQA (Torres Alcalá, 2021)]

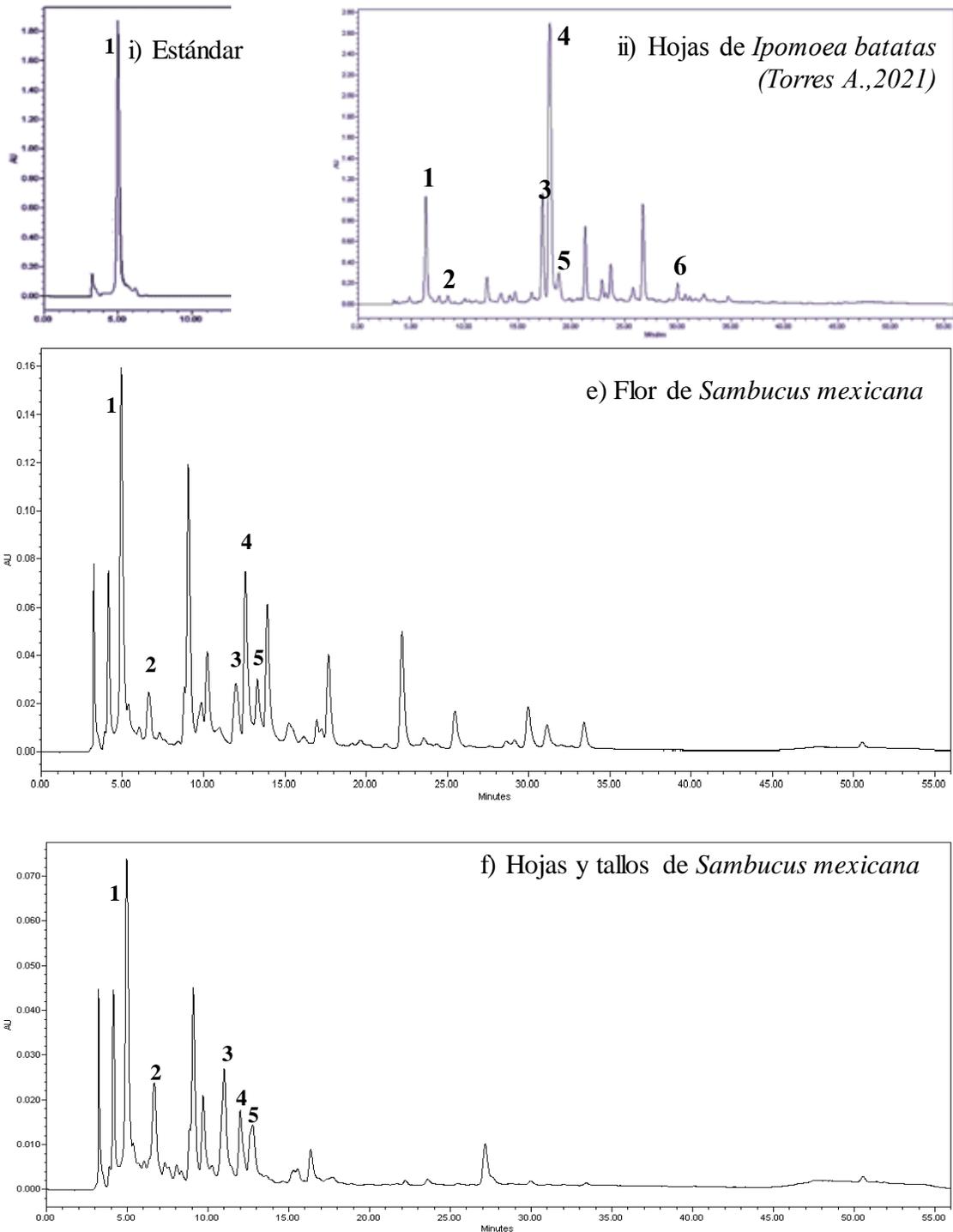


Figura 25. Cromatogramas de la fracción de sólidos a 320 nm de e) Flor de *Sambucus mexicana*, f) Hojas y tallos de *Sambucus mexicana*, i) Estándar de 5-CQA y ii) HPLC literatura hojas de *Ipomoea batatas* [1) Estándar 5-CQA, 2) AC, 3) 3,4-diCQA, 4) 3,5-diCQA, 5) 4,5-diCQA, 6) 3,4,5-triCQA (Torres Alcalá, 2021)]

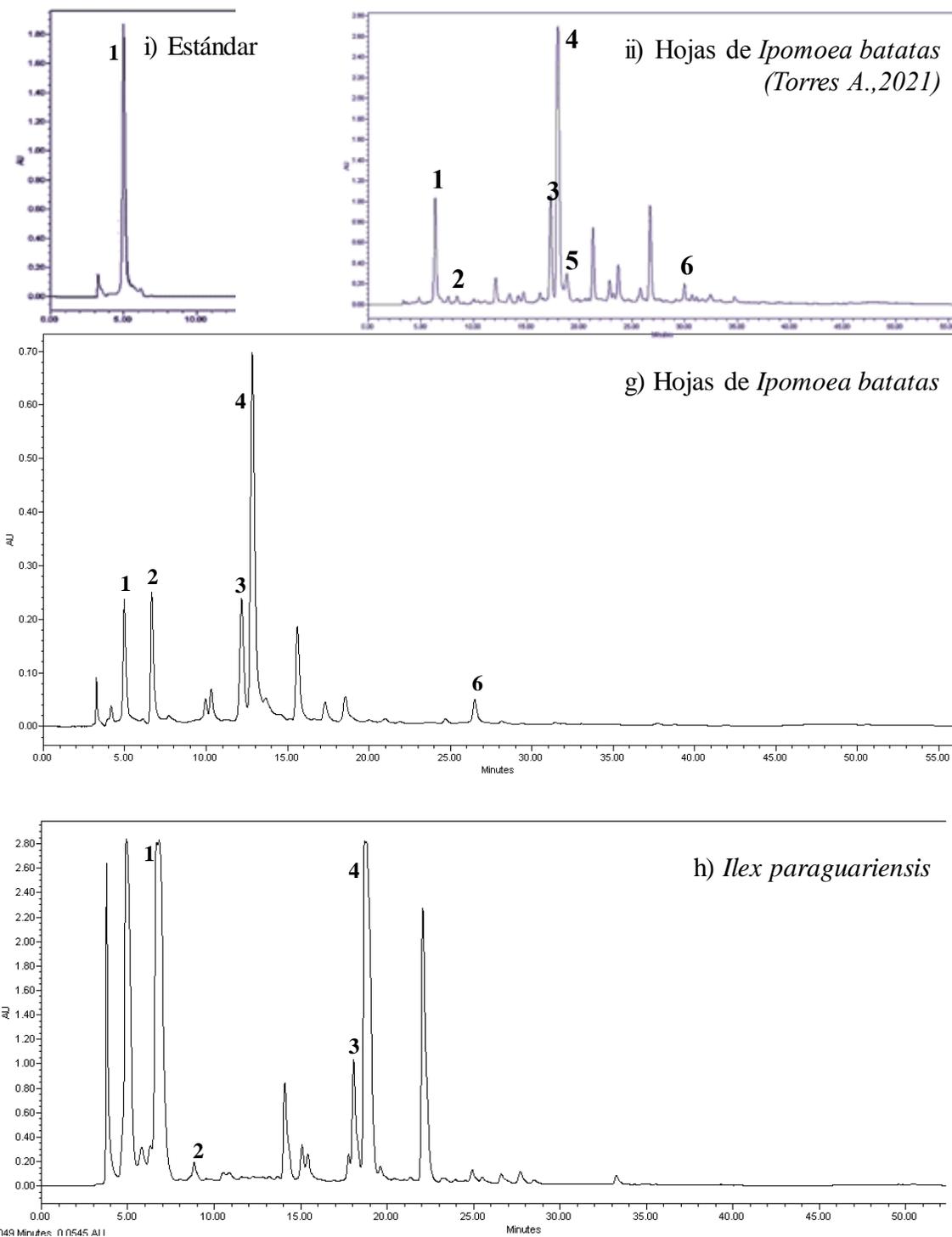


Figura 26. Cromatogramas de la fracción de sólidos a 320 nm de g) *Ilex paraguariensis*. f) Hojas de *Ipomoea batatas*, i) Estándar de 5-CQA y ii) HPLC literatura hojas de *Ipomoea batatas* [1] Estándar 5-CQA, 2) AC, 3) 3,4-diCQA, 4) 3,5-diCQA, 5) 4,5-diCQA, 6) 3,4,5-triCQA (Torres Alcalá, 2021)]

### 8.3.Etapa 4: Evaluación de estabilidad de las antocianinas de *Ipomoea batatas* con los AHCQ.

Las antocianinas son uno de los colorantes naturales más importantes en la naturaleza, sin embargo, su aplicación se ve limitada por la poca estabilidad que muestran frente al pH y temperatura, limitando así su uso en alimentos. Por lo que en esta investigación se propuso que una aplicación tecnológica que se le puede dar a los AHCQ es utilizándolos como copigmentantes, por las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los dos grupos de fenoles (antocianinas y AHCQ), es decir, estabilizando a las antocianinas. Y de esta manera, proporcionarán a los colorantes naturales aplicaciones más amplias y competitivas con los colorantes comerciales.

Las muestra de antocianinas que se empleó, fue la de la raíz *Ipomoea batatas* de primera calidad de debido que fue la fuente con mayor contenido de antocianinas totales (0.81 AT/BS), del proceso de extracción del punto 7.2.4.1.se obtuvieron 0.3198 g de extracto concentrado de antocianinas, el cual se diluyó en 120 mL de agua ajustando el pH a 2 siendo esta la disolución control y otra disolución se le agregó el extracto concentrado de la *Ilex paraguariensis* debido a que el perfil de AHCQ predominó el 5-CQA, 3,5-di-CQA y 3,4-di-CQA y además en la etapa de extracción el porcentaje de rendimiento fue mayor comparado con las otras fuentes (10.28%). Las variables a las que evaluó la estabilidad extracto de las antocianinas fueron la temperatura y la luz.



**Figura 27.** Imagen de extracto concentrado de antocianinas de la raíz primera calidad de *Ipomoea batatas*

### 8.3.1. Temperatura

En el *Gráfico 4* se observa el comportamiento del extracto concentrado de las antocianinas del *Ipomoea batatas* a temperatura de 4°C y 65°C, las disoluciones que se expusieron a la temperatura de 65°C fueron las que tuvieron una disminución significativa de su contenido de AT en comparación con las de 4 °C, en la *Figura 28* las imágenes que corresponden a la temperatura de 65 °C en el tiempo 0 en comparación a la de tiempo 3 hubo un cambio de coloración más notorio que aquellas que corresponden a la temperatura de 4 °C. Lo cual coincide en lo reportado previamente en la literatura, en donde se han realizado estudios de vida de anaquel de extractos concentrados de camote morado y se observó que aquellos que se sometían a altas temperaturas (55°C) en comparación a los de menor temperatura (4°C) perdían su estabilidad lo cual se ve reflejado en la coloración del pigmento (Chen C. et al., 2019).

Los extractos concentrados de antocianinas de *Ipomoea batatas* sin copigmentante fueron los que presentaron una mayor estabilidad indicando que las antocianinas del *I. batatas* por sí solas fueron más termoestables debido a su estructura química en la literatura se reportó que las principales antocianinas fueron la peonidina y la cianidina-3-soforósido-5-glucósido aciladas con el ácido p-hidroxibenzoico, ferúlico y cafeico propiedad que les confiere la ventaja de ser resistentes al pH, al calor y a presentar mayor estabilidad a la luz (Li A. et al., 2019).

En el caso de los extractos de *I. batatas* con *I. paraguariensis* en ambas temperaturas de 4 y 65°C no se favoreció el efecto de copigmentación intermolecular que se quería generar para que fueran más estables las antocianinas del camote morado sin copigmentante.

Esto se puede deber a varios factores, uno de ellos es debido a que la composición química de *Ilex paraguariensis* se ha reportado que tiene una alta concentración de alcaloides como la cafeína. La cafeína en medios acuosos se asocia fácilmente con los polifenoles por medio de enlaces de hidrógeno y efectos hidrófobos lo cual podría indicar que los AHCQ de la *I. paraguariensis* tuvieron una interacción más fuerte con la cafeína lo cual no le permitió interaccionar con las antocianinas del *I. batatas* y por tanto no se formó el copigmento, sería importante repetir el mismo procedimiento pero utilizando otra fuente como las hojas de *Coffea* descafeinadas y así comparar si fue este efecto el que no permitió dicha

copigmentación (Russell M. et al., 1986). Otro factor a considerar fue que solo se realizó a una concentración 1:10 (copigmento:antocianina) sería importante hacer pruebas variando concentración de la concentración de ambos grupos de fenoles para que se garantice que se mide directamente este efecto y no una co-oxidación de ambos.

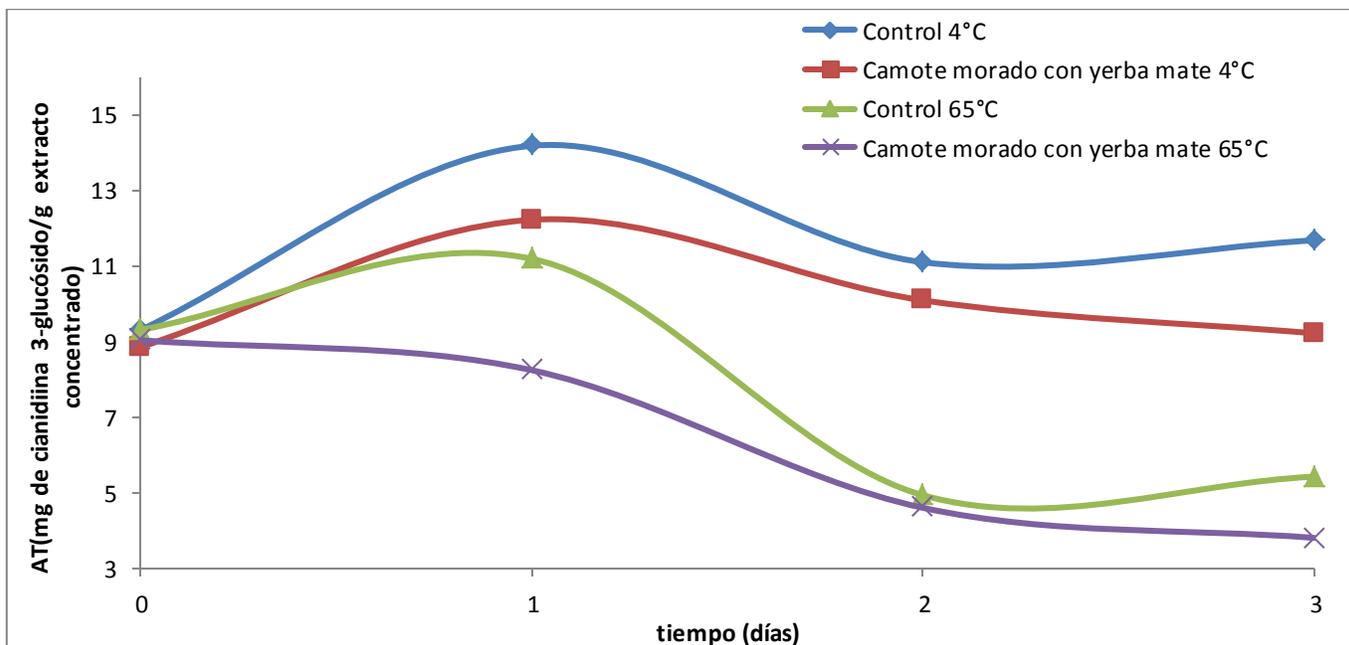
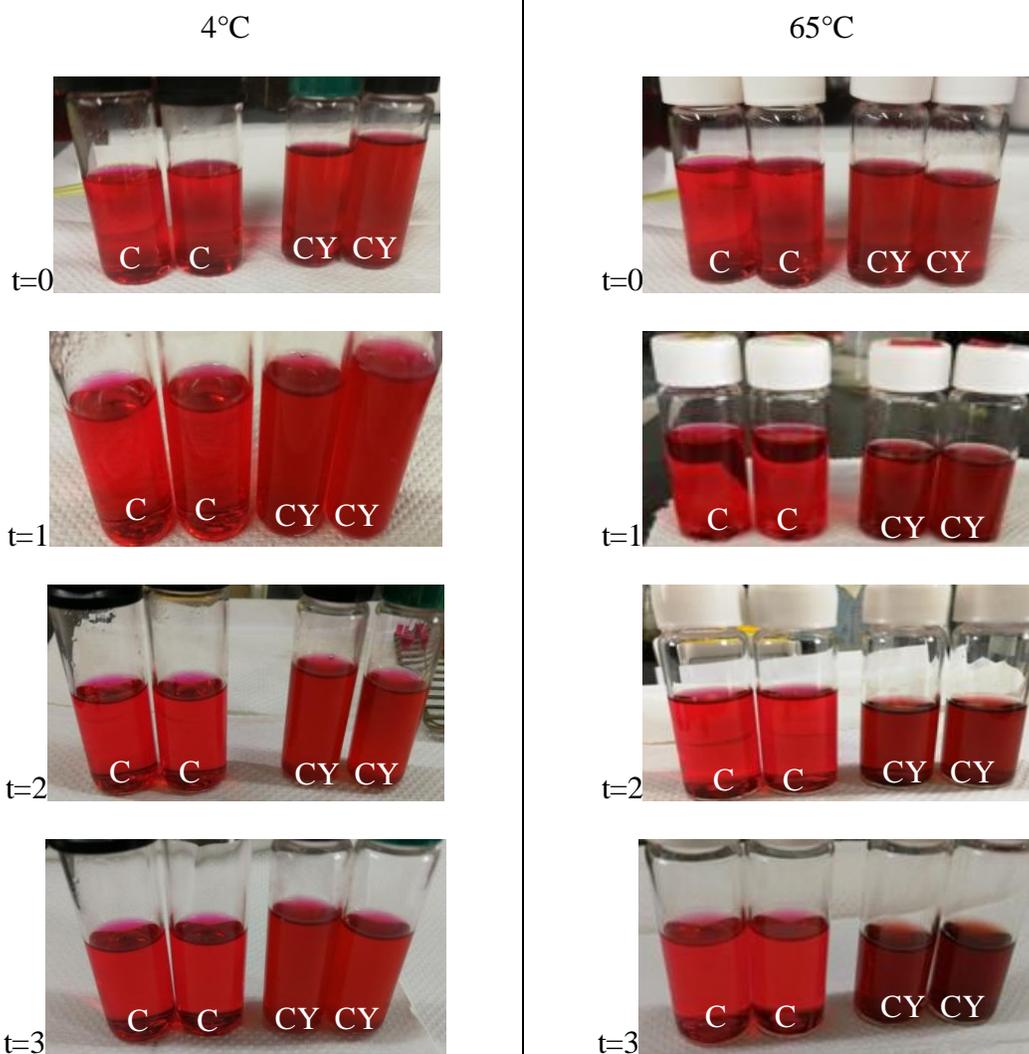


Gráfico 4. Evaluación de estabilidad de las antocianinas de *Ipomoea batatas* expresado en AT/BS concentrado en función al tiempo expresado en días a temperatura de 4°C y 65°C

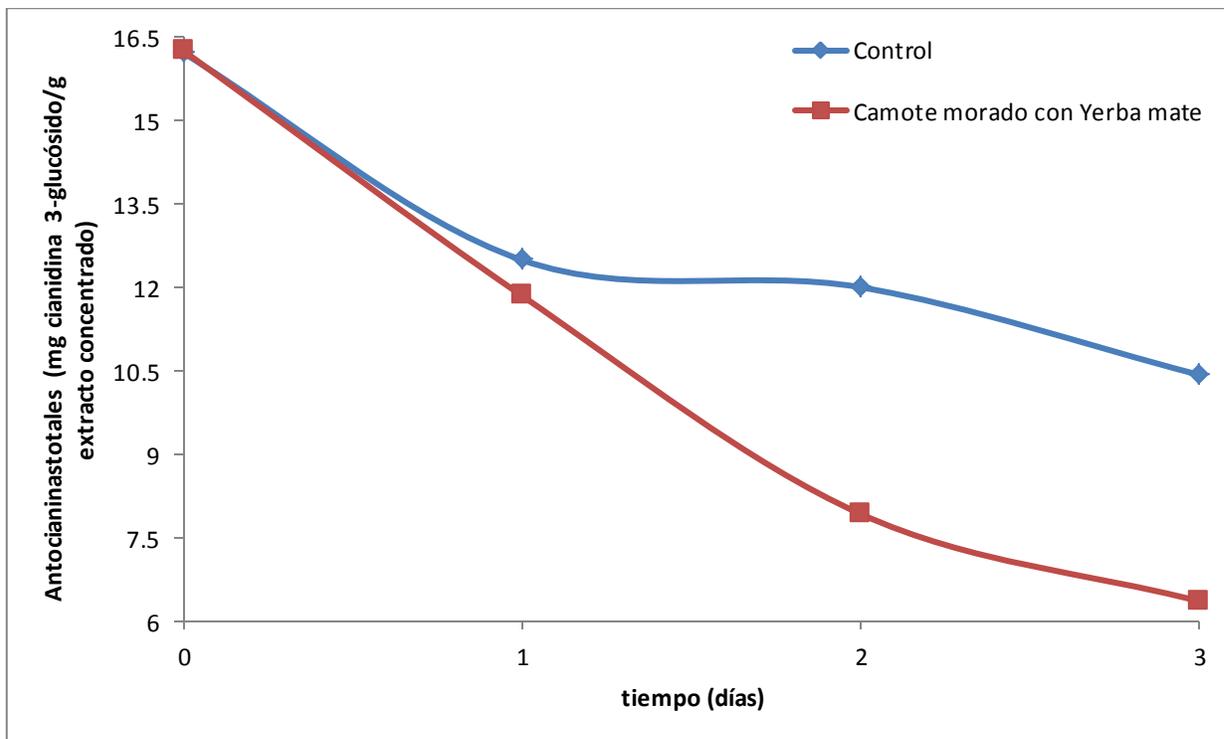


**Figura 28.** Imágenes de extractos de antocianinas de *Ipomoea batatas* control (C) y con copigmento de *Ilex parauariensis* (CY) a pH 2 a 4°C (izquierda) y 65°C (derecha) evaluado a diferentes tiempos en días (día 0, 1, 2 y 3).

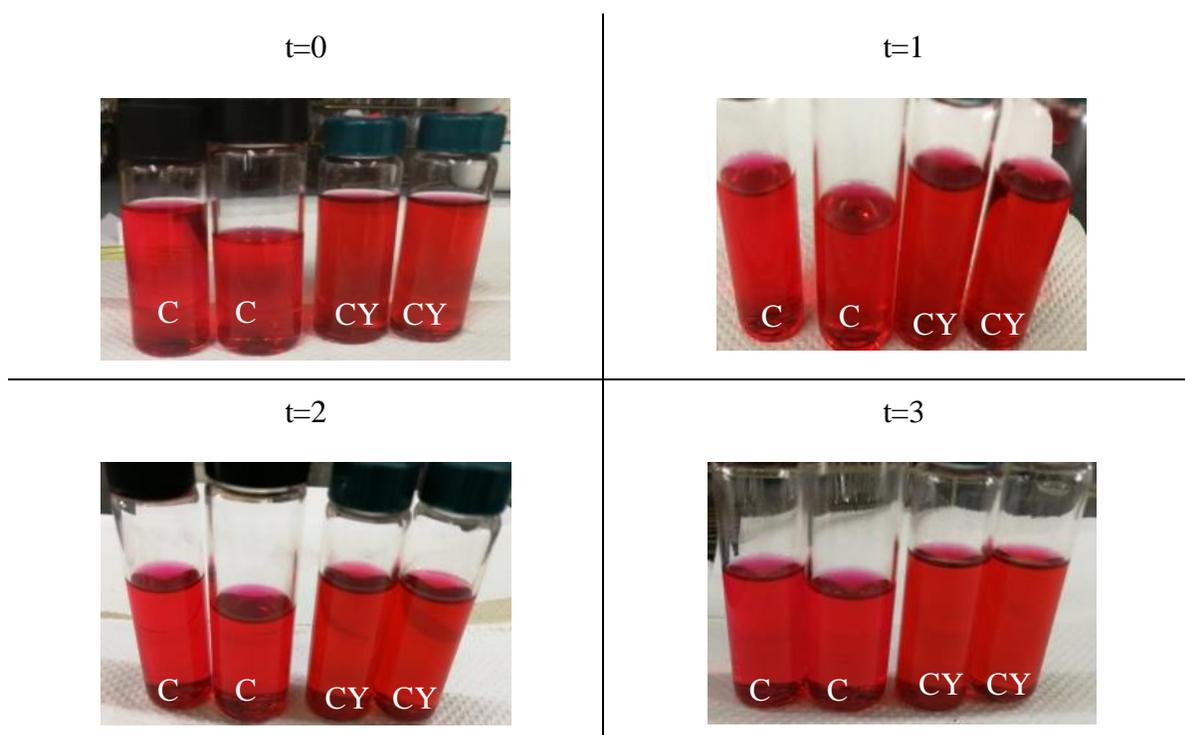
### 8.3.2. Luz

En el *Gráfico 5* se encuentra reportado el comportamiento de las antocianinas de *I. batatas* expuestos a la luz solar a pH 2, la muestra control presentó una mayor estabilidad en comparación con la muestra que se le agregó *I. paraguariensis* lo cual coincide con el mismo comportamiento de la prueba anterior con la variable temperatura, es decir, que cuando se agregó el copigmento no presentó un efecto positivo para estabilizar las antocianinas, en la *Figura 29* las imágenes que corresponden al tiempo 0 en comparación al tiempo 3 no se percibió una diferencia en el cambio de color a través del tiempo sin

embargo, las disoluciones con el extracto concentrado de antocianinas de *I. batatas* por sí solas fueron más estables debido a la interacción intramolecular que existe entre las antocianinas y los ácidos fenólicos presentes en la fuente lo cual ha comprobado que además de que fueron estables a la temperatura también lo fue a la luz solar. De igual forma sería importante repetir el experimento variando la concentración del copigmento y ver cual es la que favorece este efecto y usar una muestra descafeinada.



**Gráfico 5.** Evaluación de estabilidad de las antocianinas de *Ipomoea batatas* expresados AT/BS concentrado en función al tiempo expuesto en días expuestos a la luz solar.



**Figura 29.** Imágenes de extractos de antocianinas de *Ipomoea batatas* control (C) y con copigmento de *Ilex paraguariensis* (CY) a pH 2 evaluado a diferentes tiempos (día 0, 1, 2, 3)

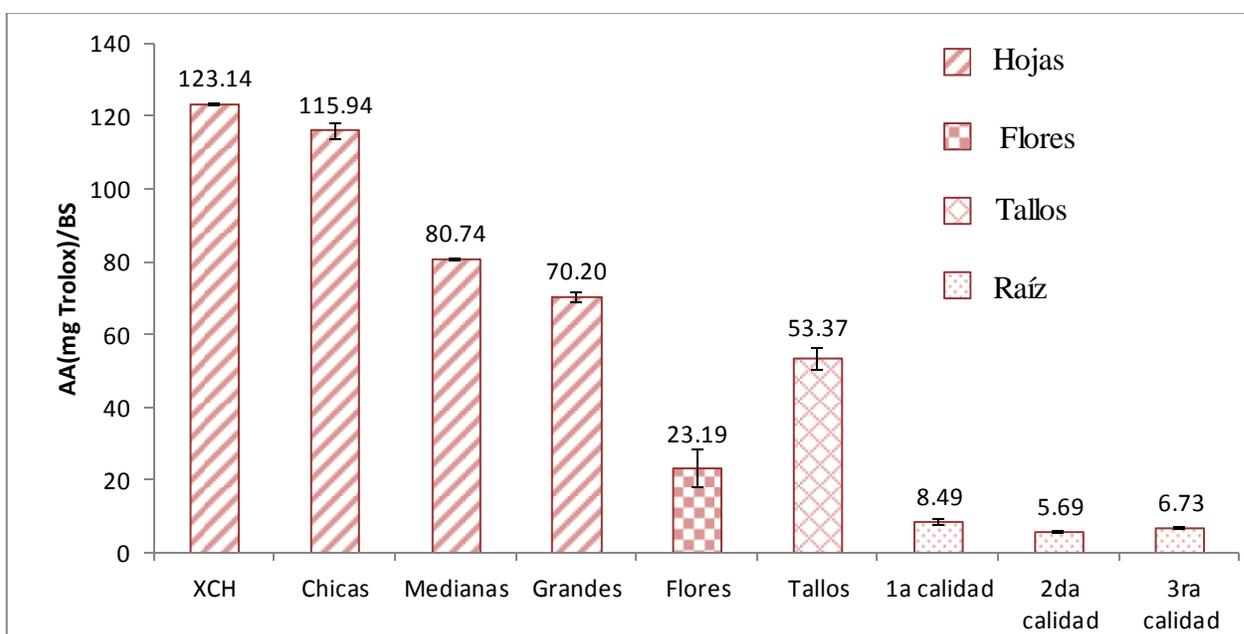
#### **8.4.Etapa 5: Actividad antioxidante**

Debido a que el cultivo de *Ipomoea batatas* fue una de las fuentes que presentó una mayor concentración y diversidad de AHCQ así como de antocianinas, se determinó por medio de la metodología de DPPH la actividad antioxidante de los distintos órganos del cultivo: hojas, tallos, flores y raíz.

En el *Gráfico 6* se encuentran los resultados obtenidos de la actividad antioxidante de las hojas de camote clasificadas por su tamaño, flores, tallos y la raíz de tres diferentes calidades. Las hojas son el órgano del cultivo cuya actividad antioxidante fue mayor, las “Hojas XCH” presentaron mayor actividad antioxidante y las “Hojas grandes” disminuyen considerablemente su actividad antioxidante con respecto al tamaño de las hojas tendencia que coincide con el contenido de FT que se determinó en el *Gráfico 2*, en la literatura se reportó que en hojas de camote se obtuvo una concentración entre  $64.74 \pm 3.78$  mg/g hasta  $237.90 \pm 1593$  mg/g (Toong L. et al., 2015).

Los tallos fueron otro órgano del cultivo que presentó actividad antioxidante importante seguida de las flores y por último la raíz. En los tallos se ha reportado un contenido de  $37.53 \pm 0.34$  mg trolox equivalente/g peso seco y en las flores  $44.60 \pm 0.59$  mg trolox equivalente/g peso seco (Toong, L. et al., 2015).

Se ha demostrado que el cultivo de *Ipomoea batatas* al tener una alta actividad antioxidante también ha presentado una alta actividad biológica debido a su alto contenido de polifenoles los cuales ayudan a eliminar los radicales libres teniendo propiedades benéficas en la salud de anti-envejecimiento, anti-cáncer, anti-bacterianas, antiinflamatorias, antihipertensivas y antidiabéticas (Krochmal-Marczak B. et al., 2020).



**Gráfico 6. Actividad antioxidante por metodología de DPPH de distintas partes del cultivo de *Ipomoea batatas* expresado en AA (mg Trolox)/BS**

## 9. CONCLUSIONES

Las hojas de *Ipomoea batatas*, flor, hojas y tallos de *Sambucus mexicana* se extrajo un extracto concentrado de AHCQ los cuales comparados con plantas de las hojas de *Coffea arábica*, *canephora* y la muestra comercial de *Ilex paraguariensis* comúnmente utilizadas en el mundo y destacadas por tener una concentración alta de ácidos fenólicos presentaron un perfil similar destacando cada fuente en la proporción de estos ácidos. En el caso de *Sambucus mexicana* tanto en la flor como en las hojas y tallos al igual que las otras fuentes su proporción del 5-CQA fue mayor seguido de 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA, 3,4-diCQA y AC; en el caso de *Ipomoea batatas* el de mayor concentración fue el 3,5-di-CQA, 5-CQA, 3,4-di-CQA, 3,4,5-tri-CQA y AC.

Al cuantificar el contenido de FT de las fuentes de los AHCQ los distintos órganos tuvieron una concentración de  $45.51 \pm 4.35$  a  $198.73 \pm 3.63$  FT/BS las hojas de *Coffea canephora* fueron las de mayor concentración y las de menor correspondieron a las Hojas y tallos de *Sambucus mexicana*.

De los distintos órganos del cultivo de *Ipomoea batatas* las hojas fueron el órgano del cultivo con mayor concentración de FT, el tamaño de las hojas estuvo relacionado con el contenido de FT debido al estado de desarrollo, las hojas de menor tamaño tuvieron una concentración de  $217.56 \pm 14.11$  FT/BS y las hojas de mayor tamaño tuvieron concentración de  $123.51 \pm 0.34$  FT/BS. Las hojas ( $1.44 \pm 0.29$  AT/BS), tallos ( $1.04 \pm 0.33$  AT/BS) y raíz ( $0.73-0.81$  AT/BS) fueron los órganos del cultivo con mayor concentración de antocianinas totales.

En la etapa de extracción de los AHCQ las hojas de *Coffea arábica*, las hojas de *Coffea canephora* y *Ilex paraguariensis* fueron las fuentes con mayor concentración de FT ( $48.58 \pm 1.98$ ,  $48.11 \pm 1.28$ ,  $46.27 \pm 6.42$  FT/BS), *Ilex paraguariensis* fue la fuente con mayor rendimiento de extracción (10.28%).

El perfil los AHCQ del proceso de extracción de las fuentes se identificó de acuerdo a los picos que se caracterizaron el 5-CQA, isómeros del di-CQA, 3,4,5-tri-CQA y AC; la mayoría de las fuentes a excepción de las hojas de *Ipomoea batatas* presentaron una alta

proporción de 5-CQA. *Ilex paraguariensis* fue la única fuente cuyo perfil tiene una alta proporción de 5-CQA y 3,5-di-CQA.

Cuando se evaluó la estabilidad de las antocianinas de la raíz de *Ipomoea batatas* estas por si solas fueron más estables que con la adición del copigmento de los AHCQ que provino de *Ilex paraguariensis*, con lo cual no se vio favorecido el efecto de copigmentación intermolecular que se quería formar entre dichos compuestos cuando se sometieron a temperatura 4°C, 65°C y se expusieron a la luz solar esto podría ser debido a que interaccionaron más fuerte de la molécula de la cafeína con los AHCQ por lo cual no pudo formar el complejo con las antocianinas de *Ipomoea batatas*.

El cultivo del *Ipomoea batatas* las hojas fue el órgano con mayor actividad antioxidante (123.14±0.19 AA/BS) seguido de los tallos (53.37±3.12 AA/BS), flores (23.19 AA/BS) y raíz (5.69-8.49 AA/BS).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Badiu, S. (2006). *Química de los Alimentos*. Ciudad de México: Pearson Educación, 420-421.
- Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2007). *Herbal Medicines* (Third edition ed.). Londres: Pharmaceutical Press.
- Belscak-Cvitanovic, A., Durgo, K., Hudek, A., Bacun-Druzina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. En C. M. Galanakis, *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* (págs. 3-44). Vienna, Australia: Woodhead Publishing.
- Bravo, L., Goya, L., & Lecumberri, E. (2007). LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*(40), 393-405.
- Burris, K., Harte, F. M., Davidson, M. P., Stewart, N. C., & Zivanovic, S. (2012). Composition and bioactive properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): Review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), 268-274..
- Butnariu, M., & Butu, A. (2015). Chemical Composition of Vegetables and their Products. *Handbook of Food Chemistry*, 627-692.
- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., & Paez-Hernández, M. (2009). Chemical studies of anthocyanins a review. *Food Chem*, 113, 859-871.
- Chen , C.-C., Lin, C., Chen, M.-H., & Chiang, P.-Y. (2019). Stability and Quality of Anthocyanin in Purple Sweet Potato Extracts. *Foods*, 8, 1-13.
- Chen, X. (2019). A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactives and applications. *Food Science and Nutrition*, 59(6), 1008-1025.
- Chen, X., Kitts, D., Ji, D., & Ding, J. (2019). Free radical scavenging activities of phytochemical mixtures and aqueous methanolic extracts recovered from processed coffee leaves. *Food Science and Technology*, 54, 2872-2879.

- CONABIO. (1 de Enero de 2020). *Enciclo vida*. Recuperado el 7 de Marzo de 2021, de Enciclo vida: <https://enciclovida.mx/especies/163424-sambucus-mexicana>
- CONABIO. (11 de Febrero de 2021). *Enciclo vida*. Recuperado el 07 de Marzo de 2021, de Encilo vida: <https://enciclovida.mx/especies/166998-coffea-arabica>
- Croge, C. P., Cuquel, F. L., & Matumoto Pintro, P. T. (2021). Yerba mate: cultivation systems, processing and chemical composition: A review. *Scientia Agricola*, 78(5), 1-11.
- D'Amelio N., Papamokos G., Dreyer J., Carloni P., Navarini L. (2015). NMR Studies of Hetero-Association of Caffeine with di-*O*-Caffeoylquinic Acid isomers in Aqueous Solution, *Food Biophysics*. 10. 235-243.
- Dennis, K., Liu, K., Uppal, K., Go, Y., & Jones, D. (2021). Distribution of phytochelatins, metal-binding compounds, in plant foods: A survey of commonly consumed fruits, vegetables, grains and legumes . *Food Chemistry*, 1-9
- EFSA (2013). Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA Journal*, 11(3), <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3145>
- FAO (2016). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Recuperado 01 de octubre de 2021; [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-48%252FWD%252Ffa48\\_14e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-711-48%252FWD%252Ffa48_14e.pdf)
- FAO. (2019). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Recuperado 30 de Septiembre de 2021; de [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B36-1989%252FCXG\\_036e.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B36-1989%252FCXG_036e.pdf)
- FAO. (2019). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Recuperado el 10 de Marzo de 2021, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Farah, A. (2019). Introduction to coffee plant and genetics. En A. Farah, *Coffee. Production, quality and chemistry* (págs. 3-8). Inglaterra: Royal Society of Chemistry.

- Fereidoon, S., Anoma, C., & Ying, Z. (2010). Bioactive Phytochemicals in Vegetables. En K. Nirmal, *Handbook of Vegetables & Vegetable Processing* (págs. 125-127). Delhi: Wiley-Blackwell.
- Frizon, C., Oliveira, G., Perussello, C., Peralta-Zamora, P., Camlofski, A., Rossa, U., y otros. (2015). Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. *LWT-Food Science and Technology*, 60, 795-801.
- Fu, Z.-f., Zhang, L., Wang, H., Wen, Q.-h., & Huang, T. (2016). Antioxidant activities and polyphenols of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves extracted with solvents of various polarities. *Food Bioscience*, 15, 11-18.
- Garzón, G. (2008). Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds: A review. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36.
- Gil, M. & Wianowska D. (2017). Chlorogenic acids – their properties, occurrence and analysis. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio AA (Chemia)*. 72(1), 61-104.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. (2005). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. En R. Wrolstad, T. Acree, E. Decker, M. Penner, D. Reid, S. Schwartz, y otros, *Handbook of Food Analytical Chemistry* (Vols. 2-2, págs. 19-31). Oregon, United States: Elsevier B.V.
- Gras, C. C., Nemetz, N., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2017). Anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and their color modulation by the addition of phenolic acids and food-grade phenolic plant extracts. *Food Chemistry*, 235, 265–274.
- Guan, R., Van Le, Q., Yang, H., Zhang, D., Gu, H., Yang, Y., y otros. (2021). A review of dietary phytochemicals and their relation to oxidative stress and human diseases. *Chemosphere*, 1-14.
- Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and

approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 220-235.

- Heck, C., & De Mejia, E. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science*, 72(9), 138-151.
- Human, Z. (1992). *Botánica Sistemática y Morfología de Plantas de Batatas o Camote*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP), 22.
- INECOL. (1 de Enero de 2020). *Instituto de Ecología*. Recuperado el 7 de Marzo de 2021, de Instituto de Ecología: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/planta-del-mes/37-planta-del-mes/912-sauco>
- Instituto Nacional de la Yerba Mate. (1 de Enero de 2019). *Yerba Mate Argentina*. Recuperado el 7 de Marzo de 2021, de Yerba Mate Argentina: <https://yerbamateargentina.org.ar/yerba-mate/cuales-son-sus-propiedades/>.
- Ishiguro K., Yahara S., & Yoshimoto M. (2007). Changes in Polyphenolic Content and Radical-Scavenging Activity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) during Storage at Optimal and Low Temperatures. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 11(27), 10773-10778
- Kopjar M., Jaksic K., Pilizota V. (2012). Influence of sugars and chlorogenic acid addition on anthocyanin content, antioxidant activity and color of blackberry juice during storage. *J. Food Process.*, 36, 545-552
- Kristiningrum, N., Cahyanti, Y., & Wulandari, L. (2016). Determination of total phenolic content and antioxidant activity in methanolic extract of Robusta and Arabica Coffee leaves. *Journal University of Jember*, 96-99.
- Krochmal-Marczak, B., Cebulak, T., Kapusta, I., Oszmianski, J., Kaszuba, J., & Zurek, N. (2020). The Content of Phenolic Acids and Flavonols in the Leaves of Nine Varieties of Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* L.) Depending on Their Development, Grown in Central Europe. *Molecules*, 25, 1-14.

- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*(24), 1-10.
- Kurata R. Yahara S., Yahakama O., Yoshimoto M. (2011). Simple High-yield Purification of 3, 4,5-tri-O-caffeoylquinic acid from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf and its inhibitory effects on aldose reductase. *Food Science and Technology Research, 17*(2), 87-92.
- Kuskoski, E., Asuero, G., Troncoso, M., Mancini-Filho, & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25*(4), 726-732.
- Laguerre M., Chen B., Lecomte J., Villeneuve P., McClements D.J, Decker E.A.(2011). Antioxidant properties of chlorogenic acid and its alkyl esters in stripped corn oil in combination with phospholipids and/or water. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 10361-10366.
- Li, A., Xiao, R., He, S., An, X., He, Y., Wang, C., y otros. (2019). Research Advances of Purple Sweet Potato Anthocyanins: Extraction, Identification, Stability, Bioactivity, Application and Biotransformation. *Molecules, 24*, 1-21.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2016). Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients, 8*(16), 1-20.
- Linares, E., Rosa-Ramírez, D., & Pereda-Miranda, R. (2008). El camote. *CONABIO Biodiversitas, 81*, 11-15.
- Londoño, J. (2012). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Ciudad México: Corporación Universitaria Lasallista, 129-162.
- Meinhart, A. D., Damin, F. M., Cldeirao, L., Ferreira Ferreira da Silveira, T., Teixeira Filho, J., & Teixeira Godoy, H. (2017). Chlorogenic acid isomer contents in 100 plants commercialized in Brazil. *Food Research International, 99*, 522-530.
- Mesa Vanegas, A., Zapata Uribe, S., Arana, L., Zapata, I., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 14*(1), 1-10.

- Milena, V., Tatjana, M., Gökhan, Z., Ivana, B., Aleksandra, C., Mohomoodally, F. M., y otros. (2019). Advantages of contemporary extraction techniques for the extraction of bioactive constituents from black elderberry (*Sambucus nigra* L.) flowers. *Industrial Crops & Products*, 136, 93-101.
- Miller, V., Mente, A., Dehghan, M., Rangarajan, S., Zhang, X., Swaminathan, S., Lear, S., (2017). Fruit, vegetable, and legume intake, and cardiovascular disease and deaths in 18 countries (PURE): a prospective cohort study. *Lancet* 390, 2037-2049. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)32253-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)32253-5).
- Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., & Łysiak, G. P. (2018). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food as pharmaceutical industry. *Journal of Funtional Foods*, 40, 377-390.
- Mohadese, M., Nastaran, K., & Atefeh, M. (2012). Total Phenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Sambucus nigra* L. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2(5), 275-283.
- Mussatto, S., Machado, E., Martins, S., & Teixeira, J. (2011). Production, Composition, and Application of Coffe and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol*, 4, 661-672.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo , P., Villa, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Plaza , M., Dominguez-Rodríguez, G., Castro-Puyana, M., & Marina, M. L. (2018). Polyphenols analysis and related challenges. En C. M. Galankis, *Polyphenols: Properties, Recovery and Applications* (págs. 195-209). Reino unido: Woodhead Publishing.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.

- Reis Giada, M. (2013). Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources, and Their Antioxidant Power. En J. A. Morales González, *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases: A Role for Antioxidants* (págs. 87-112). México: Intech Publisher.
- Ricco, R., Wagner, M., & Gurni, A. (2011). Dinámica de polifenoles de "Cedrón" (*Aloysia citrodora* Palau-Verbenaceae-) en relación al desarrollo foliar. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(1), 67-74.
- Rodriguez-Amaya, D. (2019). Update on natural food pigments- A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*(124), 200-205.
- Russell, M., Terence, H. L., Falshaw, C. P., Haslam, E., Begley, M. J., & Magnolato, D. (1986). The caffeine-potassium chlorogenate molecular complex. *Phytochemistry*, 26(1), 273-279.
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2017). Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*, 358(22), 1-21.
- Shalaby, E., & Shanab, M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42(5), 556-564.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2019). *Anuario Estadístico de Producción Agrícola*. Recuperado el 15 de Marzo de 2021, de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Su, X., Griffin, J., Xu, J., Ouyang, P., Zhao, Z., & Wang, W. (2019). Identification and quantification of anthocyanins in purple-fleshed sweet potato leaves. *Heliyon*, 5, 1-6.
- Taihua Mu, Hongnan Sun, Miao Zhang, & Cheng Wang. (2017). *Sweet Potato Processing Technology*. Beijing, China: Science Press Beijing, 284-285
- Toong, L., Lai, C. C., Liao, T. C., Lin, S. Y., & Sung, J. M. (2015). Effects of drying on caffeoylquinic acid derivative content and antioxidant capacity of sweet potato leaves. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 701-708.

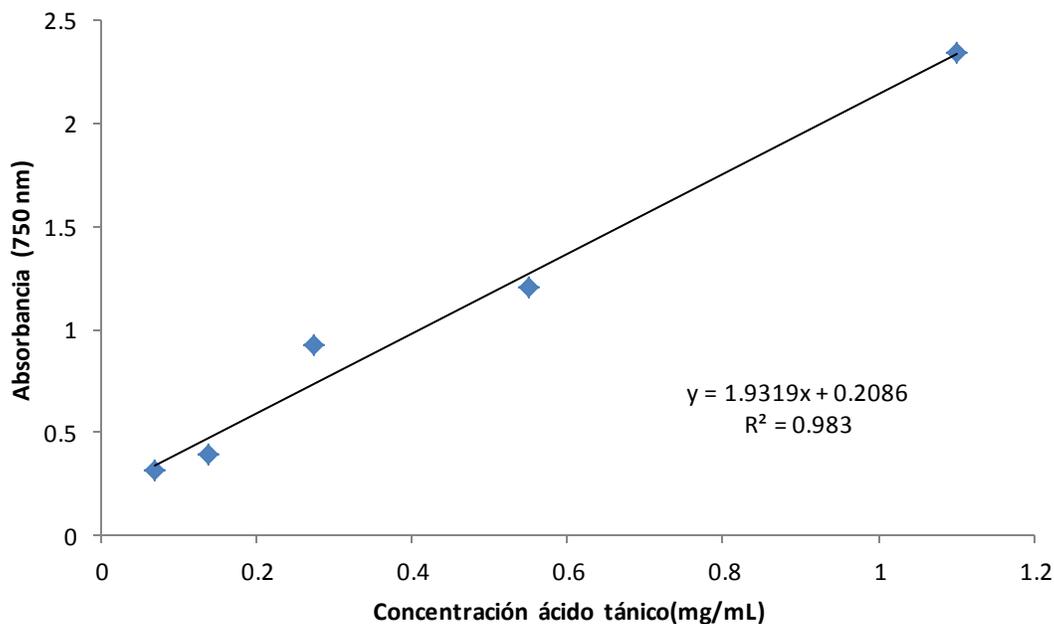
- Torres Alcalá, A. (2013). Extracción de antocianinas termoestables del camote morado (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) y su aplicación como biocolorante en alimentos. UNAM. Ciudad de México: Tesis de licenciatura.
- Torres Alcalá, A. (2016). Caracterización y cuantificación de compuestos bioactivos de *Ipomoea batatas* (L.) Lam variedad morada y en un snack de camote. UNAM. Ciudad de México: Tesis de maestría.
- Torres Alcalá, A. (2021). Caracterización de las oxidasas presentes en la planta *Ipomoea batatas* L. Lam variedad morada y su efecto sobre el perfil de sus metabolitos secundarios. UNAM. Ciudad de México.: Tesis de doctorado.
- Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, 1, 60-69.

## 11.ANEXO

### ANEXO 1. Curvas estándar de calibración

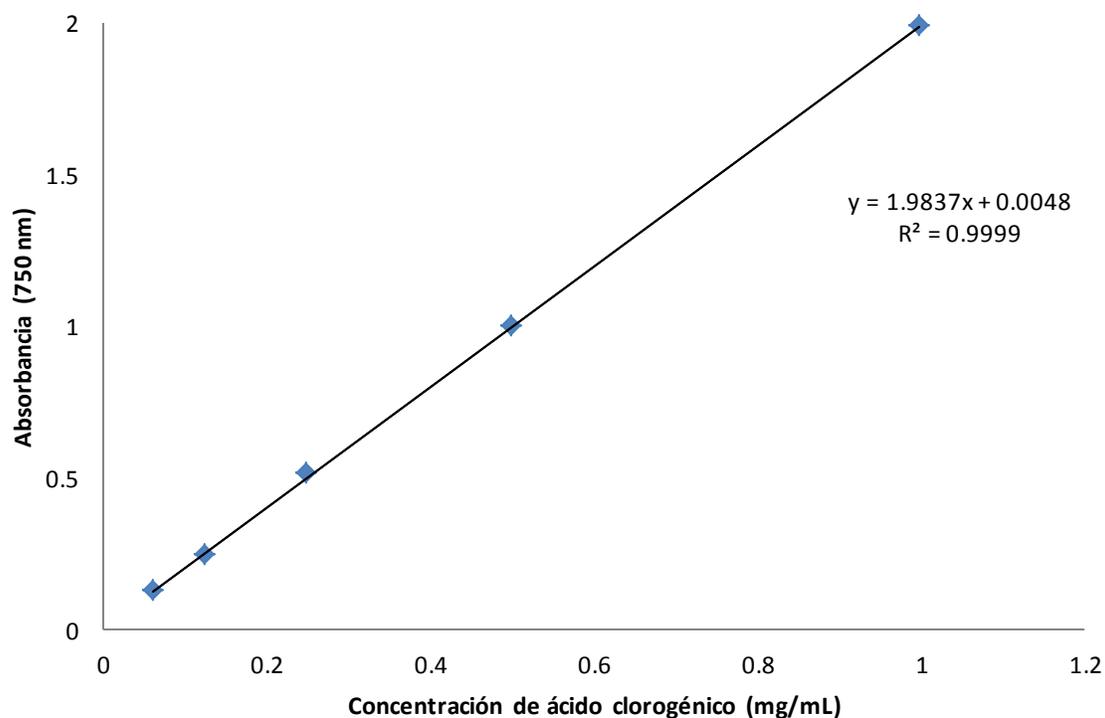
#### Curva estándar de ácido tánico

La curva estándar se realizó de acuerdo a la metodología de Folin-Ciocalteu para lo cual se pesó 1 mg de reactivo estándar de ácido tánico y se diluyó con 1 mL de metanol. De esta disolución stock se tomó 500  $\mu\text{L}$  y se diluyó en 500  $\mu\text{L}$  de metanol. Se repitieron tres veces estas disoluciones consecutivas tomando volumen de la última disolución que se preparó. Se procedió a realizar la metodología de medición de fenoles totales que se describe en el punto 7.2.2.2 para obtener las absorbancias correspondientes a 750 nm para trazar la regresión lineal, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.



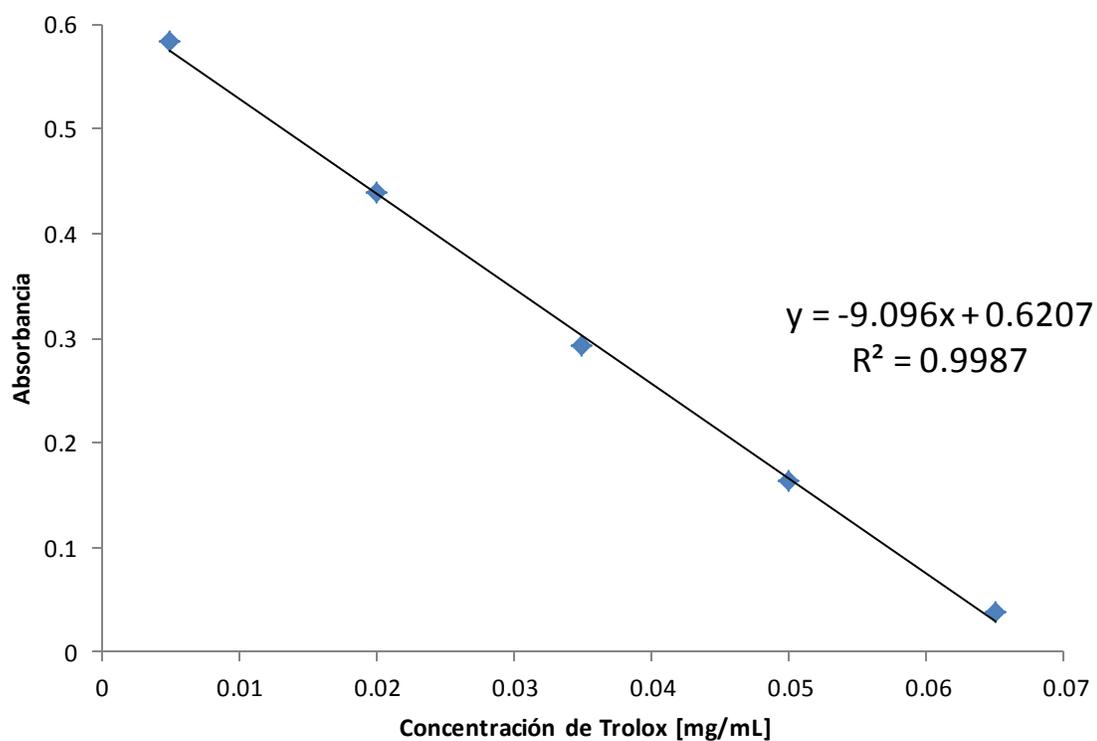
### Curva estándar de ácido clorogénico

La curva estándar se realizó de acuerdo a la metodología de Folin-Ciocalteu para lo cual se pesó 1 mg de reactivo estándar de ácido clorogénico y se diluyó con 1 mL de metanol. De esta disolución stock se tomó 500  $\mu\text{L}$  y se diluyó en 500  $\mu\text{L}$  de metanol. Se repitieron tres veces estas disoluciones consecutivas tomando volumen de la última disolución que se preparó. Se procedió a realizar la metodología de medición de fenoles totales que se describe en el punto 7.2.2.2 para obtener las absorbancias correspondientes a 750 nm para trazar la regresión lineal, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.



### Curva estándar de Trolox (DPPH)

La curva estándar se realizó preparando un stock pesando 25.32 mg de estándar de reactivo de Trolox y se diluyó en 5 mL de etanol. A partir de esta se tomaron cinco alícuotas para preparar concentraciones de 0.065, 0.050, 0.035, 0.020 y 0.005 mg/mL y se aforó a 1 mL. Se procedió a realizar la metodología de medición de actividad antioxidante por el método de DPPH que se describe en el punto 7.2.5 para obtener las absorbancias correspondientes a 571 nm para trazar la regresión lineal, obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación.



## ANEXO 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINAMOIL-QUÍNICOS

### Fenoles totales

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Hoja de café robusta	3	596.1918739	198.7306246	19.74449134	39.4889827	9.17004027	179.291008	218.170242
Hojas de café arábica	3	490.5612874	163.5204291	346.4063118	692.812624	9.17004027	144.080812	182.960046
Hoja de café robusta descafeinadas	3	413.6898801	137.8966267	70.915864	141.831728	9.17004027	118.45701	157.336244
Hoja de café arábica descafeinada	3	374.6835846	124.8945282	70.45817102	140.916342	9.17004027	105.454911	144.334145
Flor de sauco	3	299.6966818	99.89889393	267.5677096	535.135419	9.17004027	80.459277	119.338511
Hojas y tallos de sauco	3	136.5391691	45.51305636	28.36355309	56.7271062	9.17004027	26.0734394	64.9526733
Yerba mate	3	521.1440416	173.7146805	1084.448002	2168.896	9.17004027	154.275064	193.154297
Hojas de camote	3	236.2557401	78.75191335	130.2472221	260.494444	9.17004027	59.3122964	98.1915303

ANOVA

Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	55442.81344	7	7920.40192	31.39666217	3.4188E-08	2.6571966	3.23505086	0.89863865
Within Groups	4036.30265	16	252.2689156					
Total	59479.11609	23	2586.048526					

TUKEY HSD/KRAMER

Groups	mean	n	ss	df	q-crit
Hoja de café robusta	198.7306246	3	39.48898		
Hojas de café arábica	163.5204291	3	692.8126		
Hoja de café robusta descafeinadas	137.8966267	3	141.8317		
Hoja de café arábica descafeinada	124.8945282	3	140.9163		
Flor de sauco	99.89889393	3	535.1354		
Hojas y tallos de sauco	45.51305636	3	56.7271		
Yerba mate	173.7146805	3	2168.896		
Hojas de camote	78.75191335	3	260.4944		
		24	4036.303	16	4.896

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	sig-crit	Cohen d
Hoja de café robusta	Hojas de café arábica	35.2102	9.17004	3.8339699	-9.68632	80.10671	0.18722	44.89652	2.216851
Hoja de café robusta	Hoja de café robusta descafeinadas	60.834	9.17004	6.633995	15.93748	105.7305	0.004655	44.89652	3.830139
Hoja de café robusta	Hoja de café arábica descafeinada	73.8361	9.17004	8.051884	28.93958	118.7326	0.000683	44.89652	4.648757
Hoja de café robusta	Flor de sauco	98.83173	9.17004	10.77768	53.93521	143.7282	2.29E-05	44.89652	6.222495
Hoja de café robusta	Hojas y tallos de sauco	153.2176	9.17004	16.70849	108.3211	198.1141	6E-08	44.89652	9.646654
Hoja de café robusta	Yerba mate	25.01534	9.17004	2.728008	-19.8806	69.91246	0.552211	44.89652	1.575016
Hoja de café robusta	Hojas de camote	119.9787	9.17004	13.08377	75.08219	164.8752	1.82E-06	44.89652	7.553919
Hojas de café arábica	Hoja de café robusta descafeinadas	25.6238	9.17004	2.794296	-19.2727	70.52032	0.52472	44.89652	1.613287
Hojas de café arábica	Hoja de café arábica descafeinada	38.6259	9.17004	4.212184	-6.27062	83.52242	0.120132	44.89652	2.431906
Hojas de café arábica	Flor de sauco	63.62154	9.17004	6.937978	18.72502	108.5181	0.003067	44.89652	4.005643
Hojas de café arábica	Hojas y tallos de sauco	118.0074	9.17004	12.8688	73.11086	162.9039	2.28E-06	44.89652	7.429803
Hojas de café arábica	Yerba mate	10.19425	9.17004	1.11691	-34.7023	55.09077	0.991558	44.89652	0.641835
Hojas de café arábica	Hojas de camote	84.76852	9.17004	9.244072	39.872	129.665	0.000146	44.89652	5.337068
Hoja de café robusta descafeinadas	Hoja de café arábica descafeinada	13.0021	9.17004	1.417889	-31.8944	57.89862	0.967363	44.89652	0.818619
Hoja de café robusta descafeinadas	Flor de sauco	37.99773	9.17004	4.143682	-6.89878	82.89425	0.130628	44.89652	2.392356
Hoja de café robusta descafeinadas	Hojas y tallos de sauco	92.38357	9.17004	10.0745	47.48705	137.2801	5.26E-05	44.89652	5.816515
Hoja de café robusta descafeinadas	Yerba mate	35.81805	9.17004	3.905987	-9.07846	80.71457	0.173393	44.89652	2.255122
Hoja de café robusta descafeinadas	Hojas de camote	59.14471	9.17004	6.449777	14.2482	104.0412	0.005999	44.89652	3.72378
Hoja de café arábica descafeinada	Flor de sauco	24.99563	9.17004	2.725793	-19.9009	69.89215	0.553135	44.89652	1.573737
Hoja de café arábica descafeinada	Hojas y tallos de sauco	79.38147	9.17004	8.656611	34.48495	124.278	0.00031	44.89652	4.997897
Hoja de café arábica descafeinada	Yerba mate	48.82015	9.17004	5.323875	3.923635	93.71667	0.028171	44.89652	3.073741
Hoja de café arábica descafeinada	Hojas de camote	46.14261	9.17004	5.031888	1.246098	91.03913	0.041745	44.89652	2.905162
Flor de sauco	Hojas y tallos de sauco	54.38584	9.17004	5.930818	9.48932	99.28235	0.012272	44.89652	3.424159
Flor de sauco	Yerba mate	73.81579	9.17004	8.049669	28.91927	118.7123	0.000685	44.89652	4.647478
Flor de sauco	Hojas de camote	21.14698	9.17004	2.306095	-23.7495	66.0435	0.72709	44.89652	1.331424
Hojas y tallos de sauco	Yerba mate	128.2016	9.17004	13.98049	83.30511	173.0981	7.39E-07	44.89652	8.071638
Hojas y tallos de sauco	Hojas de camote	33.23886	9.17004	3.624723	-11.6577	78.13537	0.238265	44.89652	2.092735
Yerba mate	Hojas de camote	94.96277	9.17004	10.35578	50.06625	139.8593	3.76E-05	44.89652	5.978903

## Fase acuosa

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION	Alpha 0.05								
	Groups	Count	Sum	Mean	Variance	SS	StdErr	Lower	Upper
Hojas de café robusta	3	363.4182673	121.13942	48.88881278	97.77763	4.496276835	111.6077	130.6711	
Hojas de café arábica	3	263.1123897	87.70413	135.1743152	270.3486	4.496276835	78.17245	97.23581	
Hojas de café robusta descafeinada	3	242.888977	80.962992	23.1950311	46.39006	4.496276835	71.43131	90.49467	
Hojas de café arábica descafeinada	3	210.7736244	70.257875	20.23504392	40.47009	4.496276835	60.72619	79.78956	
Flor de sauco	3	142.8467997	47.6156	16.25045871	32.50092	4.496276835	38.08392	57.14728	
Hojas y tallos de sauco	3	75.82021664	25.273406	7.73265491	15.46531	4.496276835	15.74172	34.80509	
Yerba mate	3	131.1989871	43.732996	212.0002544	424.0005	4.496276835	34.20131	53.26468	
Hojas de camote	3	77.28231122	25.76077	21.7195579	43.43912	4.496276835	16.22909	35.29245	

ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit	RMSSE	Sq	
Between Groups	23350.45285	7	3335.779	55.0009166	5.21E-10	2.6571966	4.28178	0.940299	
Within Groups	970.392258	16	60.649516						
Total	24320.84511	23	1057.428						

TUKEY HSD/KRAMER						
alpha 0.05						
Groups	mean	n	ss	df	q-crit	
Hojas de café robusta	121.1394224	3	97.77763			
Hojas de café arábica	87.70412989	3	270.3486			
Hojas de café robusta descafeinada	80.96299232	3	46.39006			
Hojas de café arábica descafeinada	70.2578748	3	40.47009			
Flor de sauco	47.61559989	3	32.50092			
Hojas y tallos de sauco	25.27340555	3	15.46531			
Yerba mate	43.7329957	3	424.0005			
Hojas de camote	25.76077041	3	43.43912			
		24	970.3923	16	4.896	

## Q TEST

group 1	group 2	mean	stderr	q-stat	lower	upper	p-value	q-crit	Cohen's d
Hojas de café robusta	Hojas de café arábica	33.43529	4.496277	7.436218	11.42152	55.44906	0.001557	22.01377	4.293302
Hojas de café robusta	Hojas de café robusta descafeinada	40.17643	4.496277	8.935489	18.16266	62.1902	0.000216	22.01377	5.158907
Hojas de café robusta	Hojas de café arábica descafeinada	50.88155	4.496277	11.31637	28.86778	72.89532	1.23E-05	22.01377	6.533511
Hojas de café robusta	Flor de sauco	73.52382	4.496277	16.35216	51.51005	95.53759	8.18E-08	22.01377	9.440922
Hojas de café robusta	Hojas y tallos de sauco	95.86602	4.496277	21.3212	73.85225	117.8798	1.67E-09	22.01377	12.3098
Hojas de café robusta	Yerba mate	77.40643	4.496277	17.21567	55.39266	99.4202	3.9E-08	22.01377	9.939473
Hojas de café robusta	Hojas de camote	95.37865	4.496277	21.21281	73.36488	117.3924	1.81E-09	22.01377	12.24722
Hojas de café arábica	Hojas de café robusta descafeinada	6.741138	4.496277	1.493271	-15.2726	28.75491	0.956487	22.01377	0.865605
Hojas de café arábica	Hojas de café arábica descafeinada	17.44626	4.496277	3.880156	-4.56752	39.46003	0.178678	22.01377	2.240209
Hojas de café arábica	Flor de sauco	40.08853	4.496277	8.915939	18.07476	62.1023	0.000222	22.01377	5.14762
Hojas de café arábica	Hojas y tallos de sauco	62.43072	4.496277	13.88498	40.41695	84.4445	8.12E-07	22.01377	8.016498
Hojas de café arábica	Yerba mate	43.97113	4.496277	9.779454	21.95736	65.98491	7.53E-05	22.01377	5.646171
Hojas de café arábica	Hojas de camote	61.94336	4.496277	13.77659	39.92959	83.95713	9.04E-07	22.01377	7.953918
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas de café arábica descafeinada	10.70512	4.496277	2.380885	-11.3087	32.71889	0.69703	22.01377	1.374605
Hojas de café robusta descafeinada	Flor de sauco	33.34739	4.496277	7.416668	11.33362	55.36116	0.001598	22.01377	4.282015
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas y tallos de sauco	55.68959	4.496277	12.38571	33.67582	77.70336	3.8E-06	22.01377	7.150894
Hojas de café robusta descafeinada	Yerba mate	37.23	4.496277	8.280183	15.21623	59.24377	0.000505	22.01377	4.780566
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas de camote	55.20222	4.496277	12.27732	33.18845	77.21599	4.27E-06	22.01377	7.088313
Hojas de café arábica descafeinada	Flor de sauco	22.64227	4.496277	5.035783	0.628504	44.65605	0.041528	22.01377	2.907411
Hojas de café arábica descafeinada	Hojas y tallos de sauco	44.98447	4.496277	10.00483	22.9707	66.99824	5.73E-05	22.01377	5.776289
Hojas de café arábica descafeinada	Yerba mate	26.52488	4.496277	5.893298	4.511108	48.53865	0.012816	22.01377	3.405962
Hojas de café arábica descafeinada	Hojas de camote	44.4971	4.496277	9.896433	22.48333	66.51086	6.53E-05	22.01377	5.713709
Flor de sauco	Hojas y tallos de sauco	22.34219	4.496277	4.969043	0.328423	44.35597	0.045393	22.01377	2.868878
Flor de sauco	Yerba mate	3.882604	4.496277	0.863515	-18.1312	25.89638	0.998179	22.01377	0.498551
Flor de sauco	Hojas de camote	21.85483	4.496277	4.86065	-0.15894	43.8686	0.052407	22.01377	2.806298
Hojas y tallos de sauco	Yerba mate	18.45959	4.496277	4.105528	-3.55418	40.47336	0.136812	22.01377	2.370328
Hojas y tallos de sauco	Hojas de camote	0.487365	4.496277	0.108393	-21.5264	22.50114	1	22.01377	0.062581
Yerba mate	Hojas de camote	17.97223	4.496277	3.997135	-4.04155	39.986	0.155773	22.01377	2.307747

## Fase de acetato de etilo

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION						Alpha	0.05			
Groups	Count	Sum	Mean	Variance	SS	StdErr	Lower	Upper		
Hojas de café robusta	3	144.331962	48.11065387	2.472537	4.945074144	2.415558	42.9899	53.23141		
Hojas de café arábica	3	145.726822	48.57560726	5.86664	11.73327926	2.415558	43.45485	53.69636		
Hojas de café robusta descafeinada	3	72.0014705	24.00049017	6.116884	12.2337679	2.415558	18.87974	29.12124		
Hojas de café arábica descafeinada	3	32.6149355	30.87164515	37.78023	75.56046548	2.415558	25.75089	35.9924		
Flor de sauco	3	40.0652507	13.35508357	3.001954	6.0039072	2.415558	8.23433	18.47584		
Hojas y tallos de sauco	3	15.8507155	5.283571837	0.010204	0.020408374	2.415558	0.162818	10.40433		
Yerba mate	3	138.821311	46.27377018	61.77093	123.541867	2.415558	41.15302	51.39452		
Hojas de camote	3	63.5025628	21.16752092	23.01869	46.03737972	2.415558	16.04677	26.28827		

ANOVA									
Sources	SS	df	MS	F	P-value	Fcrit	RMSSE	Omega Sq	
Between Groups	5819.727062	7	831.3895803	47.49506	1.58084E-09	2.657197	3.978905	0.931324	
Within Groups	280.0761491	16	17.50475932						
Total	6099.803211	23	265.2088353						

TUKEY HSDIKRAMER							alpha	0.05	
Groups	mean	n	ss	df	q-crit				
Hojas de café robusta	48.11065387	3	4.945074						
Hojas de café arábica	48.57560726	3	11.73328						
Hojas de café robusta descafeinada	24.00049017	3	12.23377						
Hojas de café arábica descafeinada	30.87164515	3	75.56047						
Flor de sauco	13.35508357	3	6.003907						
Hojas y tallos de sauco	5.283571837	3	0.020408						
Yerba mate	46.27377018	3	123.5419						
Hojas de camote	21.16752092	3	46.03738						
		24	280.0761	16	4.896				

Q TEST									
group 1	group 2	mean	stderr	q-stat	lower	upper	p-value	q-crit	Cohen d
Hojas de café robusta	Hojas de café arábica	0.464953	2.415558	0.192483	-11.3616	12.29152	1	11.82657	0.11113 NO HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas de café robusta descafeinada	24.11016	2.415558	9.981199	12.28359	35.93673	5.89E-05	11.82657	5.762648 SI HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas de café arábica descafeinada	17.23901	2.415558	7.136657	5.412437	29.06558	0.002338	11.82657	4.120351 SI HAY DIF
Hojas de café robusta	Flor de sauco	34.75557	2.415558	14.38822	22.929	46.58214	4.97E-07	11.82657	8.307041 SI HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas y tallos de sauco	42.82708	2.415558	17.72969	31.00051	54.65365	2.55E-08	11.82657	10.23624 SI HAY DIF
Hojas de café robusta	Yerba mate	1.836884	2.415558	0.760439	-9.98969	13.66345	0.999188	11.82657	0.439039 NO HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas de camote	26.94313	2.415558	11.154	15.11656	38.7697	1.48E-05	11.82657	6.439765 SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas de café robusta descafeinada	24.57512	2.415558	10.17368	12.74855	36.40169	4.67E-05	11.82657	5.873778 SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas de café arábica descafeinada	17.70396	2.415558	7.32914	5.877391	29.53053	0.0018	11.82657	4.231481 SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Flor de sauco	35.22052	2.415558	14.5807	23.39395	47.04709	4.13E-07	11.82657	8.418171 SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas y tallos de sauco	43.29204	2.415558	17.92217	31.46546	55.11861	2.18E-08	11.82657	10.34737 SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Yerba mate	2.301837	2.415558	0.952922	-9.52473	14.12841	0.996646	11.82657	0.55017 NO HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas de camote	27.40809	2.415558	11.34648	15.58152	39.23466	1.19E-05	11.82657	6.550895 SI HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas de café arábica descafeinada	6.871155	2.415558	2.844542	-4.95542	18.69773	0.504125	11.82657	1.642297 NO HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Flor de sauco	10.64541	2.415558	4.407018	-1.18116	22.47198	0.094234	11.82657	2.544393 NO HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas y tallos de sauco	18.71692	2.415558	7.748487	6.890347	30.54349	0.001023	11.82657	4.473591 SI HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Yerba mate	22.27328	2.415558	9.22076	10.44671	34.09985	0.000151	11.82657	5.323608 SI HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas de camote	2.832969	2.415558	1.172801	-8.9936	14.65954	0.988494	11.82657	0.677117 NO HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Flor de sauco	17.51656	2.415558	7.25156	5.68999	29.34313	0.001999	11.82657	4.18669 SI HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Hojas y tallos de sauco	25.58807	2.415558	10.59303	13.7615	37.41464	2.84E-05	11.82657	6.115888 SI HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Yerba mate	15.40213	2.415558	6.376219	3.575554	27.2287	0.006639	11.82657	3.681312 SI HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Hojas de camote	9.704124	2.415558	4.017343	-2.12245	21.5307	0.152078	11.82657	2.319414 NO HAY DIF
Flor de sauco	Hojas y tallos de sauco	8.071512	2.415558	3.341469	-3.75506	19.89808	0.320727	11.82657	1.929198 NO HAY DIF
Flor de sauco	Yerba mate	32.91869	2.415558	13.62778	21.09212	44.74526	1.05E-06	11.82657	7.868001 SI HAY DIF
Flor de sauco	Hojas de camote	7.812437	2.415558	3.234217	-4.01413	19.63901	0.356456	11.82657	1.867276 NO HAY DIF
Hojas y tallos de sauco	Yerba mate	40.9902	2.415558	16.96925	29.16363	52.81677	4.8E-08	11.82657	9.797199 SI HAY DIF
Hojas y tallos de sauco	Hojas de camote	15.88395	2.415558	6.575686	4.057378	27.71052	0.005044	11.82657	3.796474 SI HAY DIF
Yerba mate	Hojas de camote	25.10625	2.415558	10.39356	13.27968	36.93282	3.59E-05	11.82657	6.000726 SI HAY DIF

## Masa (g)

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION	Alpha 0.05								
	Groups	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
Hojas de café robusta		3	0.1337	0.044566667	3.40033E-05	6.80067E-05	0.0055951	0.0327056	0.0564278
Hojas de café arábica		3	0.1285	0.042833333	3.56333E-06	7.12667E-06	0.0055951	0.0309722	0.0546944
Hojas de café robusta descafeinada		3	0.0448	0.014933333	7.70333E-06	1.54067E-05	0.0055951	0.0030722	0.0267944
Hojas de café arábica descafeinada		3	0.0591	0.0197	4.9E-07	9.8E-07	0.0055951	0.0078389	0.0315611
Flor de sauco		3	0.0523	0.017433333	4.22533E-05	8.45067E-05	0.0055951	0.0055722	0.0292944
Hojas y tallos de sauco		3	0.024	0.008	3.099E-05	6.198E-05	0.0055951	-0.003861	0.0198611
Yerba mate		3	0.3083	0.102766667	0.000354363	0.000708727	0.0055951	0.0909056	0.1146278
Hojas de camote		3	0.1272	0.0424	0.00027796	0.00055592	0.0055951	0.0305389	0.0542611

ANOVA								
Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	0.019363086	7	0.002766155	29.45355517	5.44566E-08	2.6571966	3.1333451	0.892461
Within Groups	0.001502653	16	9.39158E-05					
Total	0.02086574	23	0.000907206					

TUKEY HSD/KRAMER					
Groups	mean	n	ss	df	q-crit
Hojas de café robusta	0.044566667	3	6.801E-05		
Hojas de café arábica	0.042833333	3	7.127E-06		
Hojas de café robusta descafeinada	0.014933333	3	1.541E-05		
Hojas de café arábica descafeinada	0.0197	3	9.8E-07		
Flor de sauco	0.017433333	3	8.451E-05		
Hojas y tallos de sauco	0.008	3	6.198E-05		
Yerba mate	0.102766667	3	0.0007087		
Hojas de camote	0.0424	3	0.0005559		
		24	0.0015027	16	4.896

Q TEST										
group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	x-crit	Cohen d	
Hojas de café robusta	Hojas de café arábica	0.0017333	0.0055951	0.3097942	-0.02566	0.029127	0.9999981	0.0273937	0.1788598	NO HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas de café robusta descafeinada	0.0296333	0.0055951	5.2962896	0.0022397	0.057027	0.0292445	0.0273937	3.0578142	SI HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas de café arábica descafeinada	0.0248667	0.0055951	4.4443555	-0.002527	0.0522603	0.0898859	0.0273937	2.5659499	NO HAY DIF
Hojas de café robusta	Flor de sauco	0.0271333	0.0055951	4.849471	-0.00026	0.054527	0.0531864	0.0273937	2.7988434	NO HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas y tallos de sauco	0.0365667	0.0055951	6.5354665	0.009173	0.0639603	0.0053309	0.0273937	3.7732533	SI HAY DIF
Hojas de café robusta	Yerba mate	0.0582	0.0055951	10.401937	0.0308063	0.0855937	3.557E-05	0.0273937	6.0055609	SI HAY DIF
Hojas de café robusta	Hojas de camote	0.0021667	0.0055951	0.3872428	-0.025227	0.0295603	0.9999991	0.0273937	0.2235747	NO HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas de café robusta descafeinada	0.0279	0.0055951	4.9864954	0.0005063	0.0552937	0.0443509	0.0273937	2.8789545	SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas de café arábica descafeinada	0.0231333	0.0055951	4.1345613	-0.00426	0.050527	0.1320836	0.0273937	2.3870901	NO HAY DIF
Hojas de café arábica	Flor de sauco	0.0254	0.0055951	4.5396768	-0.001994	0.0527937	0.0795985	0.0273937	2.6209836	NO HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas y tallos de sauco	0.0348333	0.0055951	6.2256723	0.0074397	0.062227	0.0081718	0.0273937	3.5943936	SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Yerba mate	0.0599333	0.0055951	10.711731	0.0325397	0.087327	2.469E-05	0.0273937	6.1844207	SI HAY DIF
Hojas de café arábica	Hojas de camote	0.0004333	0.0055951	0.0774486	-0.02696	0.027827	1	0.0273937	0.0447149	NO HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas de café arábica descafeinada	0.0047667	0.0055951	0.8519341	-0.022627	0.0321603	0.9983274	0.0273937	0.4918644	NO HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Flor de sauco	0.0025	0.0055951	0.4468186	-0.024894	0.0298937	0.9999762	0.0273937	0.2579708	NO HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas y tallos de sauco	0.0069333	0.0055951	1.2391769	-0.02046	0.034327	0.9842838	0.0273937	0.7154391	NO HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Yerba mate	0.0878333	0.0055951	15.698226	0.0604397	0.115227	1.463E-07	0.0273937	9.0633751	SI HAY DIF
Hojas de café robusta descafeinada	Hojas de camote	0.0274667	0.0055951	4.9090468	7.3E-05	0.0548603	0.0491578	0.0273937	2.8342395	SI HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Flor de sauco	0.0022667	0.0055951	0.4051155	-0.025127	0.0296603	0.9999878	0.0273937	0.2338936	NO HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Hojas y tallos de sauco	0.0117	0.0055951	2.091111	-0.015694	0.0390937	0.8076489	0.0273937	1.2073035	NO HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Yerba mate	0.0830667	0.0055951	14.846292	0.055673	0.1104603	3.209E-07	0.0273937	8.5715108	SI HAY DIF
Hojas de café arábica descafeinada	Hojas de camote	0.0227	0.0055951	4.0571127	-0.004694	0.0500937	0.1450222	0.0273937	2.3423751	NO HAY DIF
Flor de sauco	Hojas y tallos de sauco	0.0094333	0.0055951	1.6859955	-0.01796	0.036827	0.9229121	0.0273937	0.9734099	NO HAY DIF
Flor de sauco	Yerba mate	0.0853333	0.0055951	15.251408	0.0579397	0.112727	2.199E-07	0.0273937	8.8054043	SI HAY DIF
Flor de sauco	Hojas de camote	0.0249667	0.0055951	4.4622283	-0.002427	0.0523603	0.0878695	0.0273937	2.5762687	NO HAY DIF
Hojas y tallos de sauco	Yerba mate	0.0947667	0.0055951	16.937403	0.067373	0.1221603	4.936E-08	0.0273937	9.7788143	SI HAY DIF
Hojas y tallos de sauco	Hojas de camote	0.0344	0.0055951	6.1482237	0.0070063	0.0617937	0.0090933	0.0273937	3.5496786	SI HAY DIF
Yerba mate	Hojas de camote	0.0603667	0.0055951	10.789179	0.032973	0.0877603	2.256E-05	0.0273937	6.2291356	SI HAY DIF