



Universidad Nacional
Federico Villarreal

VRIN | VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura

**METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA EN LA
CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMERICAS
TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO
LIOFILIZADO DEL CAMOTE (*Ipomoea batatas* (L.) lam.)**

Línea de Investigación: Ingeniería

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero

Alimentario

Autora

Villanueva Pari, Yanett Noemi

Asesora

Minaya Agüero, Carmen del Pilar

(ORCID: 0000-0002-4087- 9422)

Jurado

Marín Machuca, Olegario

Aldave Palacios, Gladis Josefina

Guzmán Loyola, Edmundo Eugenio

Lima - Perú

2023

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mis padres Carmen y Jesús, a mis abuelitos Juanita(in memoriam), María y Octavio (in memoriam), a mi hijita Jocelyn, por todos los ánimos, comprensión y motivación durante la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Divino, Creador y Sustentador de todo lo que existe, Dios Padre, Dios hijo y Dios Espíritu Santo, por todo lo que me ha dado y da en todo momento, y por permitirme llegar a este punto de mi vida.

A mis padres, Carmen y Jesús, a mis mamitas Juanita (in memoriam) y María, que siempre me incentivaron y motivaron a estudiar y a terminar la carrera.

A mi Alma Mater, Universidad Nacional Federico Villarreal, mi amada FOPCA y mi querida EPIA, por todo lo que aprendí en sus aulas.

A mis maestros, en especial a quien fue padrino de mi promoción de graduación, Mg. Víctor Terry Calderón (in memoriam), más que un profesor, fue para quien lo conoció como un padre que nos orientaba para la toma de decisiones a nivel profesional, aún recuerdo la clasemagistral que nos dio como si fuera ayer.

A mi asesora de tesis Ing. Carmen Minaya, por la confianza y apoyo en la culminación de este trabajo. Al Ing. José Candela por su apoyo incondicional y al y al Dr. Noe Pampa por sus valiosos aportes. Dios los bendiga y los guarde siempre.

A la Sra Liliana, por todo su apoyo en los tramites de la gestión de la tesis.

A la Profa. Dra. Glaucia Pastore por la asesoría externa y por disponibilizar el laboratorio de Bioaromas el Departamento de Bioquímica de Alimentos Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad Estadual de Campinas - UNICAMP para la realización de los análisis de la presente investigación.

INDICE GENERAL

| | |
|---|------|
| DEDICATORIA..... | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| INDICE GENERAL..... | IV |
| INDICE DE TABLAS | VII |
| INDICE DE FIGURAS | VIII |
| RESUMEN..... | IX |
| ABSTRACT | X |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. DESCRIPCIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA | 1 |
| 1.2. ANTECEDENTES | 2 |
| 1.3. OBJETIVOS | 5 |
| 1.3.1. <i>Objetivo general</i> | 5 |
| 1.3.2. <i>Objetivos Específicos</i> | 6 |
| 1.4. JUSTIFICACIÓN..... | 6 |
| 1.5. HIPÓTESIS | 7 |
| | |
| II. MARCO TEÓRICO | 7 |
| 2.1 BASES TEÓRICAS SOBRE EL TEMA DE INVESTIGACIÓN..... | 7 |
| 2.1.1. <i>Antocianinas</i> | 10 |
| 2.1.2. <i>Estructura química y propiedades</i> | 11 |
| 2.1.3. <i>Actividad biológica de las antocianinas</i> | 17 |

| | |
|---|----|
| 2.1.4. Capacidad antioxidante | 18 |
| 2.1.5. Extracción de antioxidantes naturales | 19 |
| 2.1.6. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) | 20 |
| 3.2.7.2..... | 23 |
| III. METODO..... | 25 |
| 3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN..... | 25 |
| 3.2. ÁMBITO TEMPORAL Y ESPACIAL | 25 |
| 3.3. VARIABLES | 25 |
| 3.3.1. Variables dependientes | 26 |
| 3.3.2. Variables independientes | 26 |
| 3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA..... | 26 |
| 3.5. INSTRUMENTOS..... | 26 |
| 3.5.1. Materiales..... | 26 |
| 3.5.2. Equipos..... | 27 |
| 3.6. PROCEDIMIENTOS TECNOLÓGICOS..... | 28 |
| 3.6.1. Obtención de harina liofilizada de camote morado..... | 28 |
| 3.6.2. Cuantificación de las antocianinas de harina liofilizada de camotemorado | 30 |
| 3.6.3. Determinación de Actividad Antioxidante | 31 |
| 3.7. DISEÑO DE EXPERIMENTOS ESTADÍSTICOS Y ANÁLISIS DE DATOS | 32 |
| IV. RESULTADOS..... | 35 |
| 4.1. OBTENCIÓN DE HARINA LIOFILIZADA DE CAMOTE MORADO PARA ANÁLISIS..... | 35 |
| 4.1.1. Rendimiento del extracto de camote morado liofilizado..... | 35 |
| 4.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS A PARTIR DE EXTRACTO DE CAMOTE MORADO LIOFILIZADO..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 4.2.1. Resultados de antocianinas monoméricas totales (AMT) por metodología de superficie de respuesta (MRS)..... | 36 |
| 4.3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE..... | 45 |
| 4.3.1. Capacidad de secuestrar radicales libres– DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) | 45 |
| 4.3.2. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) | 47 |
| V. DISCUSION DE RESULTADOS | 47 |
| VI. CONCLUSIONES | 51 |
| VII. RECOMENDACIONES..... | 52 |
| VIII. REFERENCIAS | 53 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----------|
| <i>Tabla 1 Valor Nutricional del Camote.....</i> | <i>9</i> |
| <i>Tabla 2 Antocianidinas Comunes Encontrados en la Naturaleza</i> | <i>12</i> |
| <i>Tabla 3 Estructura química de Antocianinas Aciladas en camote morado: Cianidina y Peonidina</i> | <i>14</i> |
| <i>Tabla 4 Variables Independientes Codificadas.....</i> | <i>24</i> |
| <i>Tabla 5 Diseño Experimental de Niveles Codificados y Decodificados</i> | <i>33</i> |
| <i>Tabla 6 Composición Química del Extracto Liofilizado de Camote Morado en 100g.</i> | <i>36</i> |
| <i>Tabla 7 Rendimiento del Extracto Liofilizado en Relación al Extracto del Camote Morado. 37</i> | <i>37</i> |
| <i>Tabla 8 Variables Independientes y Función Respuesta de Antocianinas de Camote Morado 38</i> | <i>38</i> |
| <i>Tabla 9 Cuantificación de AMT Usando Diseño Factorial Fraccionado 2³⁻¹.....</i> | <i>39</i> |
| <i>Tabla 10 Anova de AMT Usando Diseño Factorial Fraccionado (A).....</i> | <i>39</i> |
| <i>Tabla 11 Anova de AMT Usando Diseño Factorial Fraccionado (B).....</i> | <i>40</i> |
| <i>Tabla 12 Cuantificación de AMT empleando diseño de Box-Benhken</i> | <i>42</i> |
| <i>Tabla 13 ANOVA en la Cuantificación de AMT empleando diseño de Box-Benhken</i> | <i>43</i> |
| <i>Tabla 14 ANOVA de AMT empleando diseño de Box-Benhken.....</i> | <i>44</i> |
| <i>Tabla 15 Coeficientes de AMT empleando diseño de Box-Benhken.....</i> | <i>44</i> |
| <i>Tabla 16 Predicción de Respuesta Múltiple.....</i> | <i>48</i> |
| <i>Tabla 17 Factores y Niveles Optimizados y Ajuste de Variable Respuesta.....</i> | <i>48</i> |
| <i>Tabla 18 Tenor de Actividad Antioxidante del Extrato Liofilizado de Camote Morado</i> | <i>50</i> |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| <i>Figura 1 Camote Morado (Ipomoea batatas (L.) lam.....</i> | 8 |
| <i>Figura 2 Estructura General de la Molecula de Antocianinas R1 y R2 pueden ser H, OH ó OCH3.....</i> | 13 |
| <i>Figura 3 Estructura de Antocianinas en Camote Morado.....</i> | 4 |
| <i>Figura 4 Formas Estructurales de Antocianinas en Equilibrio y Solución Acuosa</i> | 17 |
| <i>Figura 5 El carácter Secuencial de la MSR... ..</i> | 22 |
| <i>Figura 6 Diseño Box–Behnken para la optimización de 3 variables.....</i> | 25 |
| <i>Figura 7 Diagrama de Flujo.....</i> | 31 |
| <i>Figura 8 Diagrama de Pareto de AMT del Diseño de Box Behnken.....</i> | 43 |
| <i>Figura 9 Superficie de respuesta y gráfico de contorno para AMT de Temperatura (°C) y Etanol</i> | 46 |
| <i>Figura 10 Superficie de Respuesta y Gráfico de Contorno de AMT a pH y Temperatura (°C)</i> | 47 |
| <i>Figura 11 Superficie de Respuesta y Gráfico de Contorno de AMT a pH y Etanol (%).....</i> | 48 |
| <i>Figura 12 Curva con valores optimizados.....</i> | 49 |
| <i>Figura 13 Curva Patrón de Porcentaje de Inhibición en Función de la Concentración del Extracto Liofilizado de Camote Morado.....</i> | 51 |
| <i>Figura 14 Curva Padrón de Concentración Trolox para ORAC.....</i> | 52 |

RESUMEN

El extracto de camote morado es rica fuente de compuestos antioxidantes como las antocianinas y compuestos fenólicos los cuales han sido asociados con la protección de células y tejidos en el organismo previniendo y reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas degenerativas. El objetivo del presente trabajo fue cuantificar las antocianinas monoméricas totales aplicando la metodología de superficie de respuesta, y determinar la actividad antioxidante del extracto liofilizado del camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Para la optimización de la extracción de antocianinas, primero fue determinada a través de un diseño factorial fraccionado 2^{3-1} , que permitió verificar los factores más influyentes en la extracción de las antocianinas y la significancia de la curvatura, para su posterior optimización mediante la metodología de superficie respuesta de Box Behnken. Los factores significativos fueron la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), concentración de etanol (%) y pH en los puntos centrales dando como resultado experimental con contenido de antocianinas monoméricas totales de 345.64 mg/100g. El modelo cuadrático presentó un adecuado coeficiente de determinación de 95.79% presentando ser el ajuste significativo, representativo y predictivo, permitiendo un contenido optimizado de antocianinas de 348.1 mg/100g b.s, con parámetros óptimos de temperatura de 79 $^{\circ}\text{C}$, etanol a 51 % y pH 2. En la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* a través del DPPH expresado en IC_{50} fue de 5,61 $\mu\text{g/mL}$ y expresado en Trolox equivalente fue de 150 mgTE/g b.s y la actividad antioxidante con ORAC fue de 141,89 $\mu\text{molTE/g}$ de extracto liofilizado.

Palabras clave: Metodología de superficie de respuesta, camote morado, antioxidantes

ABSTRACT

Purple sweet potato extract is a rich source of antioxidant compounds such as anthocyanins and phenolic compounds, which have been associated with the protection of cells and tissues in the body, preventing and reducing the risk of chronic degenerative diseases. The objective of the present work was to quantify the total monomeric anthocyanins applying the response surface methodology, and to determine the antioxidant activity of the lyophilized extract of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). For the optimization of the anthocyanin extraction, it was first determined through a 2³-1 fractional factorial design, which allowed verifying the most influential factors in the extraction of anthocyanins and the significance of the curvature, for its subsequent optimization through the methodology of Box Behnken's response surface. The significant factors were temperature (°C), ethanol concentration (%) and pH at the central points, giving as an experimental result a total monomeric anthocyanin content of 345.64 mg/100g. The quadratic model presented an adequate coefficient of determination of 95.79%, presenting the significant, representative and predictive fit, allowing an optimized content of anthocyanins of 348.1 mg/100g b.s, with optimal parameters of temperature of 79 °C, ethanol at 51% and pH 2. In the determination of in vitro antioxidant activity through DPPH expressed in IC₅₀ was 5.61 µg/mL and expressed in Trolox equivalent was 150 mgTE/g b.s and antioxidant activity with ORAC was 141.89 µmolTE /g of lyophilized extract.

Keywords: Response surface methodology, sweet potato, antioxidants.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y formulación del problema

Las antocianinas son pigmentos naturales, que pertenecen a la familia de los flavonoides, responsables del atractivo color de muchas frutas y vegetales que les da el color rojo, azul y morado. Estudios han demostrado que presenta la capacidad de neutralizar los radicales libres, que son generados en el cuerpo humano a través de la respiración aeróbica, de esta forma las antocianinas pueden ayudar a reducir el riesgo de enfermedades crónicas degenerativas. Por tanto, para prevenir estas enfermedades es importante el consumo de frutas y vegetales ricos en antocianinas. Teow et al. (2005), mencionó que el camote morado es un alimento rico en fibra, minerales, vitaminas y antioxidantes como ácidos fenólicos, carotenos y antocianinas. Furuta et al. (1998), Yi et al. (2010), y Miyasaki et al. (2008) evaluaron el potencial antioxidante in vivo del extracto de antocianinas de camote morado demostrando que pueden inhibir la oxidación de LDL (Chang et al., 2006). Por otro lado, las antocianinas del camote morado a diferencia de otras fuentes vegetales, tienen sus antocianinas mayoritarias aciladas. Recientes investigaciones han mostrado que las antocianinas aciladas son más estables durante el procesamiento y almacenamiento del alimento (Giusti y Wrolstad, 2003; Cevallos - Casals y Cisneros-Zevallos, 2002).

Actualmente se viene usando las antocianinas del camote morado en sustitución de pigmentos sintéticos en productos como bebidas, jugos, mermeladas, confitería, pan, snacks y tallarines, debido a la alta estabilidad del pigmento frente al calor y a la luz.

La estabilidad de las antocianinas, además de depender de su estructura y concentración del pigmento depende de otros factores como el pH y la temperatura en el

proceso de extracción. Por tal motivo, es importante enfocarse a analizar la extracción. Actualmente, según Fan et al. (2008), existe poca información disponible sobre la optimización de las condiciones del proceso de extracción de antocianinas de camote morado.

En la extracción de antocianinas varios métodos han sido propuestos (Fan et al. (2008); Teow (2005); Guerrero (2003). Sin embargo, el uso de antocianinas es limitado debido al poco rendimiento de la extracción, baja calidad del extracto, inestabilidad térmica y oxidativa, composición del disolvente, de esta forma es necesario estudios sobre el análisis de las condiciones de obtención de un extracto con alto tenor de antocianinas. Para ello, la herramienta estadística, metodología de superficie de respuesta (MSR), permite investigar las condiciones de operación óptimas de un proceso, con valores óptimos para la extracción de AMT (antocianinas monoméricas totales), tales como la composición del disolvente, relación solvente – sólido, pH, tiempo, temperatura de extracción, la interacción y su significancia estadística. Asimismo, se construye un modelo matemático que describa con precisión el proceso (Myers, Montgomery y Cook, 2016). También, MSR nos permite analizar los efectos de varias variables independientes (Myers, Montgomery y Cook, 2016), de esta forma nos ayuda a investigar el efecto interactivo de las variables del proceso la extracción de las antocianinas.

La extracción del pigmento en la industria de alimentos es importante a fin de substituir los colorantes artificiales por pigmentos naturales antioxidantes, de esta forma el uso de antocianinas podría dar soluciones sustentables para el uso como ingredientes en sistemas de alimentos.

1.2. Antecedentes

Las antocianinas son pigmentos flavonoides, que se encuentran en la naturaleza como glucósidos de geninas antocianidinas, o aciladas a diversos ácidos orgánicos. Se estima que en la naturaleza existan más de 400 tipos de antocianinas y 23 antocianidinas, siendo seis más comúnmente encontradas: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Jing y Giusti, 2007).

En relación a las fuentes de antocianinas en la dieta, se destacan el açaí, la ciruela, la uva, el repollo-morado, la berenjena, el camote morado, entre otros alimentos. El camote morado (*Ipomoea batatas* (L.) lam), es una raíz amilácea comestible, rica en fibra dietética, minerales, vitaminas y compuestos bioactivos como carotenos, ácidos fenólicos y antocianinas, que le da el color morado a la pulpa (Teow, 2005).

Reportes científicos han mostrado que el tenor de antocianinas puede variar de acuerdo a factores genéticos y condiciones de cultivo (Cascón, 1984). Además, tanto la pulpa como la cáscara del camote morado presentan mejor actividad antioxidante que las variedades blanca y amarilla debido a la presencia de pelargonidina-3-rutinosídeo-5-glicosídeo, una antocianina muy común en variedades de papa roja (Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos, 2002). Estudios también afirman que la antocianina del camote morado contiene una alta proporción de antocianinas aciladas, dándole mayor estabilidad al pigmento que otras antocianinas de otras fuentes alimenticias con bajos niveles de acilación (Hayachi et al., 1996).

En los últimos años viene aumentando muchas formas diferentes para la extracción de antocianinas. En un estudio realizado por Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos (2002), utilizó, en la extracción de antocianinas del camote morado, como solvente etanol al 95% acidificada con 1.5 N de HCl. Así también, Teow (2005), realizó la extracción de antocianinas de camote morado de varios cultivos, usando dos tipos de

solventes, hexano en un primer momento de extracción y en un segundo momento metanol acidificado al 7%. Asimismo, Jiao et al. (2012), extrajo antocianinas usando sólo etanol. Fan et al. (2008), extrajo antocianinas de camote morado usando etanol acidificado.

De esta forma, de acuerdo a las variables que afectan a la estabilidad de las antocianinas: como el pH, estructura, concentración del pigmento y temperatura del proceso de extracción, la forma de extracción del pigmento va depender del tipo de proceso tecnológico (Fan et al., 2008).

En el estudio del mecanismo antioxidante de las antocianinas de camote morado, varios autores como Cevallos-Casals y Cisneros-Zevallos (2003), Teow (2005) y Jiao et al. (2012) han realizado la determinación de la actividad antioxidante in vitro, mostrando elevado potencial antioxidante frente a otras variedades de camote como la blanca, la amarilla y la anaranjada.

Así también, Chang et al. (2006) realizaron la determinación de la actividad antioxidante in vivo, demostrando que las antocianinas pueden inhibir la oxidación del LDL y prevenir la muerte prematura de macrófagos.

Yi et al. (2010) mostró que las antocianinas podrían inhibir la injuria oxidativa de células del endotelio en virtud de sus estructuras, ejerciendo un efecto protector contra la oxidación del LDL.

Miyazaki et al. (2008) evaluó la protección potencial de las antocianinas de camote morado del cultivo Ayamurasaki (APSP), contra la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) in vitro y el desenvolvimiento de la lesión arterioesclerótica en ratones con deficiencia de apolipoproteína E, y les fue dado una dieta enriquecida con

colesterol y grasa, con y sin 1% de APSP adicionado por 4 semanas en la dieta de camundongos con 6 semanas de edad. Las antocianinas de APSP fueron capaces de aumentar la resistencia de LDL a oxidación, comparado al ácido L-ascórbico. Los animales que recibieron la dieta suplementada con antocianinas de camote morado presentaron una reducción en las lesiones arterioscleróticas (45%), en los niveles de TBARS (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico) en el hígado y en los niveles plasmáticos de VCAM-1 (molécula-1 de adhesión de la célula vascular). Pero, el APSP no mostró efecto en el perfil lipídico en el plasma y hígado.

Actualmente las antocianinas son usadas como sustituto de pigmentos sintéticos por su atractivo color y fisiológicas funcionalidades, debido a que muchos estudios han demostrado la habilidad que tiene este pigmento de proteger al ser humano de muchas enfermedades degenerativas como disfunción del hígado, hipertensión, desórdenes de la visión, infecciones y diarrea (Fan et al., 2008). A su vez posee importantes aplicaciones tecnológicas, es por ello la búsqueda de nuevas formas de extracción del pigmento que no comprometan la estabilidad de las antocianinas.

El camote morado contiene una alta concentración del pigmento antocianina en comparación de otras variedades de camote, además tiene una alta actividad antioxidante (Cevallos- Casals y Cisneros – Zevallos, 2004; Fan et al., 2008).

Asimismo, una dieta rica en antioxidantes es importante para una buena salud, protegiendo al cuerpo del estrés oxidativo que es caracterizado por un desequilibrio entre agentes oxidantes, como los radicales libres y moléculas antioxidantes, favoreciendo el aumento de especies oxidantes en el sistema biológico, los oxidantes pueden provocar daños en estructuras celulares, como los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Scandalios, 2005).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Aplicar la metodología de superficie de respuesta para la cuantificación de antocianinas monoméricas totales y determinar la actividad antioxidante del extracto liofilizado del camote (*Ipomoea batatas* (L.) lam.)

Evaluar los parámetros para la cuantificación de antocianinas monoméricas totales de *Ipomoea batatas* (L.) lam. empleando diseño de experimentos de superficie de respuesta de Box-Behnken.

1.3.2. Objetivos Específicos

Determinar los parámetros de temperaturas, pH y etanol: agua, que optimicen el proceso de extracción aplicando superficie de respuesta de Box-Behnken en la cuantificación de antocianinas del extracto liofilizado.

Determinar la actividad antioxidante del extracto liofilizado mediante el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ORAC (Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno).

1.4. Justificación

Ante la necesidad de enfrentar las enfermedades crónico-degenerativas debido al escaso consumo de compuestos antioxidantes en la dieta en nuestro país, el consumo de vegetales y frutas han demostrado tener propiedades antioxidantes in vitro y in vivo, por tanto, es relevante presentar alternativas de extracción de estas fuentes vegetales usando metodologías que ayuden a obtener los mejores parámetros de extracción del proceso.

Teniendo en cuenta la importancia del conocimiento de la obtención de extractos

naturales y su impacto beneficioso en la salud, es posible obtener un extracto con parámetros que garanticen las propiedades antioxidantes de antocianinas. Haciendo uso de las herramientas estadísticas como la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) de Box-Behnken. permitirá determinar las variables más influyentes en el proceso de extracción del pigmento.

La investigación busca encontrar los parámetros óptimos para la obtención un el mayor tenor del pigmento a su vez proporcionar información al consumidor que le será útil al escoger

alimentos que le brinde grandes beneficios a la salud. Asimismo, la extracción del pigmento puede ser una promisorio alternativa para la industria de pigmentos naturales en búsqueda de obtener extractos naturales en reemplazo de los colorantes sintéticos, causantes sobre todo de comportamientos adversos y efectos neurológicos en niños.

1.5. Hipótesis

La aplicación del Diseño de Superficie Respuesta contribuirá positivamente en la cuantificación de antocianinas monoméricas totales.

El extracto liofilizado del camote morado de origen brasileña (*Ipomoea batatas* (L.) lam) tiene compuestos antioxidantes capaces de combatir los compuestos oxidantes in vitro.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.2.1 El camote

El camote morado está entre las principales fuentes de subsistencia cultivados en todo el mundo (Monteiro, 2007). Este cultivo tiene una amplia adaptación a diferentes condiciones ambientales, como áreas geográficas de baja fertilidad y posee varias formas de aprovechamiento (CIP, 2015), por ello es un cultivado en diversas partes del mundo, inclusive en el Brasil. El camote es cultivado en 111 países, con 83,1% de la producción localizada en Asia, 13,3% en África, 2,9% en las Américas, 0,7% en Oceanía y 0,1% en Europa. Siendo que la China se destacó como el principal productor mundial en 2010 (81 175 660 t) llegando a una productividad media 22,0 t ha⁻¹. Brasil fue el principal productor, correspondiendo a una producción media anual de 479 200 toneladas, obtenidas en un área plantada de 42 600 hectáreas en el año 2010 (FAO, 2013), lo que resultó en una productividad media de 11,18 tha⁻¹.

Figura 1

Ipomoea batatas (L.) lam



Fuente: Propia

Mohanraj y Sivasankar (2014) mencionaron que *Ipomoea batatas* (L.) lam, conocido como camote (Figura 1), pertenece a la familia Convolvulaceae y es una raíz tuberosa, se caracteriza por ser un cultivo perenne de corto periodo de crecimiento (entre 90 a 120 días).

Es un cultivo originario de las Américas Central y del Sur, siendo encontrada desde a Península de Yucatán, en México, hasta Colombia. Relatos de su uso remontan de más de diezmil años, con base en análisis de camotes secos encontrados en las cavernas localizadas en losvalles de Chilca y Cayón, en Perú, y en evidencias contenidas en los escritos arqueológicos encontrados en la región ocupada por los Mayas, en América Central (Ugent y Peterson., 1988).

A pesar de ser un cultivo originario de América central y del sur, es poco consumido por estas áreas geográficas, por falta de conocimiento de sus potenciales beneficios a la salud, actuando como un alimento antidiabético, con actividad anti – inflamatoria y anticáncer (Mohanraj y Sivasankar, 2014).

Woolfe (1992) mencionó que el camote morado es una excelente fuente de compuestos antioxidantes, como polifenoles que incluyen los ácidos fenólicos, antocianinas, carotenoides y tocoferoles. Además de ser una fuente de compuestos antioxidantes, también es un vegetal con un alto valor energético, ya que alrededor del 80% de materia seca del camote es carbohidrato, siendo el principal componente el almidón, también contiene fibra dietética, minerales como el potasio y fosforo, vitaminas como a tiamina, vitamina A, beta-caroteno, vitamina B2, vitamina C e vitamina E (Mohanraj y Sivasankar, 2014). La composición química del camote varía con el cultivo, condiciones climáticas, época da cosecha, duración y condiciones de almacenamiento (Risso, 2014).

Tabla 1*Valor Nutricional del Camote*

| Valor nutricional del camote por 100 g | |
|--|--------------------|
| Energía | 86 kcal |
| Carbohidratos | 20.1 g |
| almidón | 12.7 g |
| Azúcares | 4.2 g |
| Fibra dietética | 3.0 g |
| Grasas | 0.1 g |
| Proteína | 1.6 g |
| Vitamina A equivalente | 709 µg (89%) |
| Beta - caroteno | 8509 µg (79%) |
| Tiamina | 0.1 mg (9%) |
| Riboflavina | 0.1 mg (8%) |
| Niacina | 0.61 mg (4%) |
| Acido pantoténico | 0.8 mg (16%) |
| Vitamina B6 | 0.2 mg (15%) |
| Folato (Vit 9) | 11 µg (3%) |
| Vitamina C | 2.4 mg (3%) |
| Vitamina E | 0.26 mg (2%) |
| Calcio | 30.0 mg (3%) |
| Hierro | 0.6 mg (2%) |
| Magnesio | 25 mg (7%) |
| Fosforo | 47mg (7%) |
| Potasio | 337 mg (7%) |
| Sodio | 55 mg (4%) |
| <u>Zinc</u> | <u>0.3 mg (3%)</u> |

Fuente: Tomado de “Sweet Potato (*Ipomoea batatas* (L.) lam) - A Valuable Medicinal Food: A Review” (p. 2), por Mohanraj, R. & Sivasankar, S. (2014). *Journal of Medicinal Food*, 17(3).

En virtud de sus características y valor nutricional, el camote fue seleccionado por la Agencia Espacial Americana (National Aeronautics and Space Administration - NASA) como uno de los alimentos incluidos en la dieta de los astronautas en misiones espaciales (Bovell- Benjamín, 2007).

En relación a la variedad de camote morado, contiene altos niveles de

antocianinas, comparado con la blanca, amarilla y anaranjada, y el tenor de antocianinas es diferente dependiendo de la variedad. La estabilidad de las antocianinas de camote morado depende de varios factores: la estructura química de las antocianinas, pH, temperatura, luz, presencia de oxígeno, degradación enzimática y las interacciones entre los componentes de los alimentos, tales como ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares y copigmentos (Francis, 1989).

2.1.1. Antocianinas

Las antocianinas, son pigmentos que pertenecen al grupo de flavonoides, subgrupo de los compuestos fenólicos, encontrados ampliamente en la naturaleza. A diferencia de los flavonoides las antocianinas poseen una carga positiva en el anillo (Revilla et al., 1998).

El término antocianina, denominado por Marquart en 1853, es derivado del griego y significa flor y azul (anthos = flores; kianos = azul) (Brouillard et al., 2010). Estos pigmentos contribuyen al crecimiento, desenvolvimiento y reproducción de plantas, y son responsables del color rojo-anaranjado y azul-violeta de muchas raíces, hojas, flores y frutos como uvas rojas, frutos rojos, col morada, camote morado entre otros (Marco et al. 2010; Lim 2012;

Castañeda-Ovando et al. 2008). El color que exhiben fue explicado por Pauling (1939), quien propuso que la estructura resonante del ion flavílio causa la intensidad del color (Wrolstad et al., 2005).

2.1.2. Estructura química y propiedades

Existen dos tipos de flavonoides antociánicos: los pigmentos glucosilados, denominados de antocianinas, que son actualmente más de 500 antocianinas segundo

Andersen y Jordheim (2006), y están unidas a los azúcares (D-glicosa, D-ramnosa, D-galactosa, D-xilosa, rutinosa y arabinosa) (Costa, 2010), pudiendo ser monoglucósidos, diglucósidos y triglucósidos glucosilados directamente en la aglicona (Malacrida y Motta, 2006) y frecuentemente acilados con los ácidos fenólicos (p-cumárico, cafeico y ferúlico). Los pigmentos no glucosilados se denominan agliconas o antocianidinas (unidad estructural de las antocianinas), que por lo general son penta o hexa sustituida con grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B del catión flavilium, los cuales se diferencian entre ellos por la estructura y en número de esos grupos (Rein, 2005). Son 23 antocianidinas conocidas (Andersen y Jordheim, 2006; Kong et al., 2003; Rein, 2005) de cuales seis son los más comunes: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina (Francis, 1989).

Tabla 2

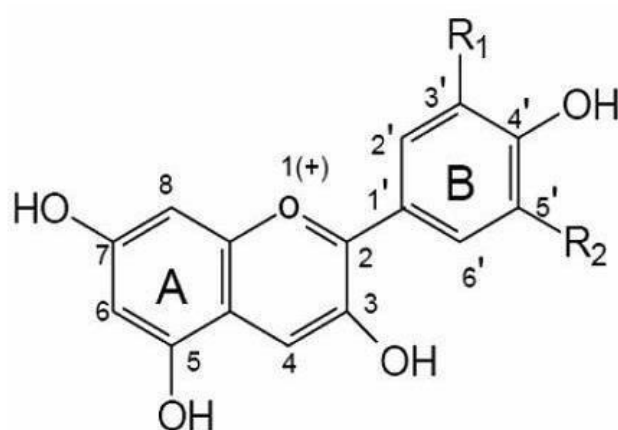
Antocianidinas Comunes Encontrados en la Naturaleza

| | | | |
|-------------|------------------|------------------|---------------|
| Pelargonid | | | |
| Cianidina | | | |
| Delfinidina | OH | | |
| Peonidina | OCH ₃ | H | |
| Petunidina | OCH ₃ | OH | 508/a |
| Malvidina | OCH ₃ | OCH ₃ | 510/azul-rojo |

Fuente: Tomado de “Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems” (p. 218), por M. Giusti y R. Wrolstad, 2003, *Biochemical Engineering Journal*, 14(3).

Figura 2

Estructura General de la Molecula de Antocianinas R_1 y R_2 , pueden ser H, OH o OCH_3



Fuente: Tomado de “Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems” (p. 218), por M. Giusti & R. Wrolstad, 2003, *Biochemical Engineering Journal*, 14(3).

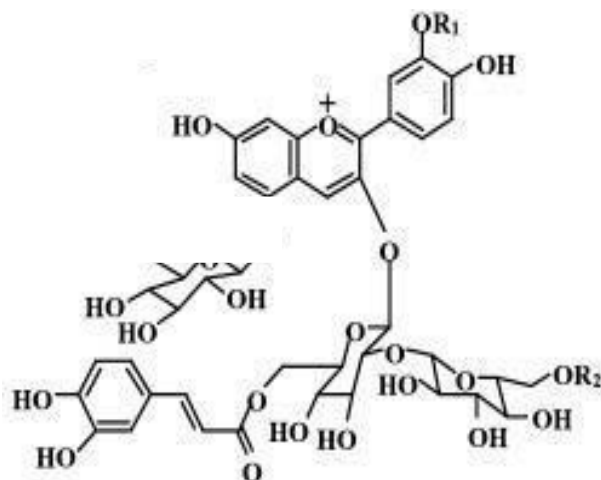
Las principales diferencias entre las antocianinas son: su estructura química, el número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo en la aglicona, su naturaleza, el número y la posición de azúcares vinculados a la antocianina y la presencia de ácidos aromáticos o alifáticos enlazados a la aglicona. La intensidad del color de las antocianinas va depender del número de grupos metoxilo y hidroxilo, de esta forma, al aumentar el grado de hidroxilación será más azul, y al aumentar el grado de metoxilación será más rojo (Roy y Rhim, 2020).

Actualmente, investigaciones se centran en la búsqueda de mejores fuentes de antocianinas, y en la mejora de la eficiencia de extracción y estabilidad. Es así que las antocianinas de camote morado han demostrado tener una alta estabilidad debido a su estructura química. Teow (2005) mencionó que existen ocho tipos de antocianinas en camote morado, que están categorizadas en dos principales grupos: peonidina y cianidina. La diferencia entre estos dos grupos es la presencia o ausencia del grupo metil

en el 3` anillo aromático (Goda et al., 1997). Esos pigmentos pueden estar en la forma mono o diacilados de cianidina y peonidina, como muestra la Figura 3.

Figura 3

Estructura de Antocianinas en Camote



Fuente: Adaptado de “Physiological functionality of purple-fleshed sweetpotatoes containing anthocyanins and their utilization in foods” (p. 168), por I. Suda et al, 2003, *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37.

Tabla 3

Estructura química de Antocianinas Aciladas en camote morado:

Cianidina y Peonidina

| <u>Cianidina</u> R1=H | <u>Peonidina</u> R1=CH ₃ | R ₂ |
|--------------------------|--|-------------------------|
| YGM-1b | YGM-4b | Ácido cafeico |
| YGM-1a | YGM-5a | Ácido p-hidroxibenzoico |
| YGM-2 | YGM-5b | H |
| YGM-3 | YGM-6 | Ácido ferúlico |

Nota. Adaptado de Suda et al. (2003)

Según Teow (2005) dentro de los ocho tipos de antocianinas en camote morado,

dos de ellos son monoacilados con ácido cafeico y los otros son diacilados solamente por ácido cafeico y ácido hidroxibenzoico, ácido cafeico y ácido ferúlico. Está enlazado a por lo menos un grupo cafeoil a las antocianinas, lo cual indica que son buenos secuestradores de radicales libres.

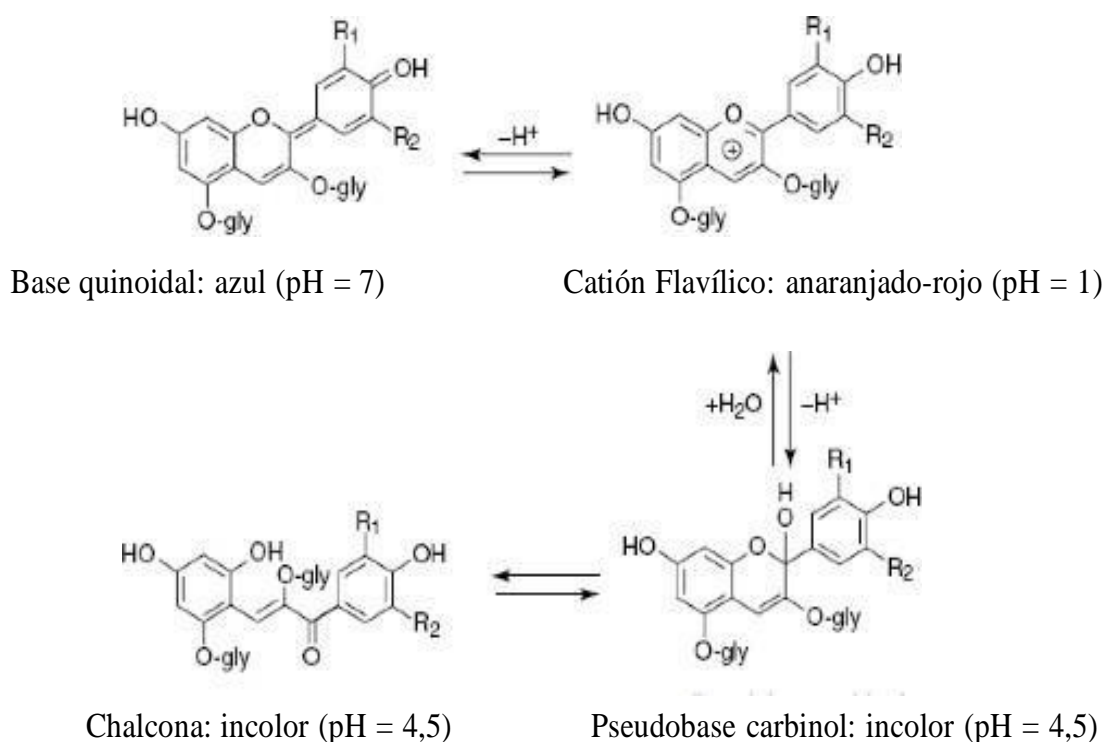
La relación peonidina: cianidina en el camote morado afecta el color de la raíz tanto cruda como cocida. Estudios indican que el camote morado con alto grado de peonidina tiene un color enrojecido. Por otro lado, camote morado rico en cianidina tiene un alto grado de color azulada (Yoshinaga et al., 1999).

Las antocianinas son compuestos muy reactivos y de fácil deterioro debido a su deficiencia electrónica del anillo flavilium, lo cual se muestran en la Figura 4 las cuatro formas estructurales de antocianinas en equilibrio y en solución acuosa: el catión flavílico (AH^+), la base quinoidal (A), la pseudobase carbinol (B) y la chalcona (C). Las antocianinas son relativamente estables en soluciones ácidas que en neutras y alcalinas (Giusti y Wrolstad, 2001).

En condiciones ácidas ($pH < 2$), las antocianinas existen primariamente en la forma de catión flavílico, mostrando color rojo. Aumentando el pH, ocurre la pérdida de un protón para producir la forma quinoidal, azul. Paralelamente, ocurre la hidratación del catión flavílico, generando la pseudobase carbinol, incoloro, que llega al equilibrio lentamente con la chalcona, también incolora. La pérdida de color también es influenciada por la presencia del oxígeno, enzimas, altas temperaturas, y luz (Giusti y Wrolstad, 2001; Lim, 2012).

Figura 4

Formas Estructurales de Antocianinas en Equilibrio y Solución Acuosa



Fuente: Tomado de “Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy” (p.2), por M. Giusti y R. Wrolstad, 2001, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.

La pulpa del camote morado fue evaluada por ser rica fuente de antocianinas con concentraciones que varían entre 108,1 a 502,6 mg/100g de materia seca (Zhu et al., 2010), dependiendo de los factores genéticos y del cultivo.

Recientes investigaciones mostraron que antocianinas con sustituyentes acilados comolas antocianinas del camote morado, son más estables durante el procesamiento y almacenamiento (Giusti y Wrolstad, 2003; Cevallos- Casals y Cisneros – Zevallos, 2002). El grado de la estabilidad de las antocianinas da camote morado después del

calentamiento y radiación de luz ultravioleta está asociada con la acilación de especies de antocianinas en el pigmento (Hayashi et al., 1996). Debido a la presencia de una alta proporción de antocianinas aciladas, las antocianinas de camote morado son más estables que las antocianinas con bajos niveles de acilación (Hayashi et al., 1996).

Asimismo, el alto contenido de antocianinas combinado a la alta estabilidad del color proporciona una saludable alternativa al uso de colorantes sintéticos (Bovell-Benjamin, 2007). El uso de antocianinas en alimentos, como un sustituto de pigmentos sintéticos debido a su atractivo color ha sido limitado por su baja estabilidad e interacciones con otros componentes de la matriz del alimento.

La pulpa del camote morado fue evaluada por ser rica fuente de antocianinas con concentraciones que varían entre 108,1 a 502,6 mg/100g de materia seca (Zhu et al., 2010), dependiendo de los factores genéticos y del cultivo.

Recientes investigaciones mostraron que antocianinas con sustituyentes acilados como las antocianinas del camote morado, son más estables durante el procesamiento y almacenamiento (Giusti y Wrolstad, 2003; Cevallos- Casals y Cisneros – Zevallos, 2002). El grado de estabilidad de las antocianinas de camote morado después del calentamiento y radiación de luz ultravioleta está asociada con la acilación de especies de antocianinas en el

pigmento (Hayashi et al., 1996). Debido a la presencia de una alta proporción de antocianinas aciladas, las antocianinas de camote morado son más estables que las antocianinas con bajos niveles de acilación (Hayashi et al., 1996).

Asimismo, el alto contenido de antocianinas combinado a la alta estabilidad del

color proporciona una saludable alternativa al uso de colorantes sintéticos (Bovell-Benjamin, 2007). Por ello, el uso de antocianinas en alimentos, está siendo usado como sustituto de pigmentos sintéticos debido a su atractivo color, pero ha sido limitado por su baja estabilidad e interacciones con otros componentes de la matriz del alimento.

2.1.3. Actividad biológica de las antocianinas

Estudios mostraron que las antocianinas tienen funciones fisiológicas como antimutagénica, hepatoprotectora, antihiperlipidémica (Suda et al; 2003). Además, He y Giusti (2009) mencionaron que las antocianinas tienen propiedades antioxidantes demostrando su acción contra las enfermedades crónicas degenerativas. En contraste, el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y malonaldehídos, y la disminución en la actividad de la expresión de enzimas antioxidantes, como el superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), entre otros, están relacionados con los procesos oxidativos (Arruda et al; 2021). El proceso oxidativo es caracterizado por un desequilibrio entre agentes oxidantes, como los radicales libres y moléculas antioxidantes (Halliwell, 2000 & Liu, 2004).

El organismo humano posee mecanismos de defensa antioxidante, los cuales actúan intracelular y extracelularmente y mantienen el equilibrio redox de la célula, asegurando que el aumento de ERO sea transitorio (Ribeiro, 2008). Además, el consumo de compuestos bioactivos a través de la dieta es un factor protector adicional para mantener el equilibrio del estado redox de la célula. El sistema de protección antioxidante, endógeno y exógeno, interactúa entre sí y actúa sinérgicamente para neutralizar los radicales libres (Kaliora et al., 2006).

Muchos beneficios a la salud se han visto en ensayos clínicos, donde un grupo de diabéticos y pre diabéticos, después del consumo de 320 gramos de antocianinas

purificadas por 12 semanas, tuvieron una mejora en la secreción de insulina, sensibilidad de la insulina y perfil lipídico. También otros estudios, mostraron que pacientes con síndrome del metabolismo, pudieron reducir significativamente la inflamación y mejorar el perfil lipídico, evidenciando una disminución del colesterol sérum, colesterol LDL, triglicéridos, glucosa y biomarcadores antiinflamatorios después del consumo diario de 320 mg de antocianinas por 4semanas (Arruda et al; 2021).

Asimismo, Furuta et al (1998), Yi et al. (2010) y Miyazaki et al. (2008) demostraron que las antocianinas de camote morado pueden inhibir la oxidación del LDL. De esta forma el consumo de antocianinas de camote morado en comparación con otras variedades como la blanca, amarilla y anaranjada puede ser capaz de aumentar la resistencia al LDL y a la oxidación celular.

Kšonžeková et al (2016) mencionó que las actividades biológicas de las antocianinas son dependientes de la cantidad de grupos hidroxilos presentes en la estructura molecular, a más grupos hidroxilos se incrementará su eficiencia contra células cancerígenas, en comparación con otras antocianinas, como la cianidina.

2.1.4. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante puede ser considerada un marcador sensible y efectivo para detectar cambios en el estrés oxidativo in vivo, permitiendo la elucidación de factores fisiológicos y nutricionales importantes, ofreciendo informaciones sobre la absorción y biodisponibilidad de compuestos antioxidantes (Ghiselli et al; 2000). Varios métodos son usados para elucidar el perfil total de actividad antioxidante, por eso es necesario la utilización de dos o más técnicas (Ou et al. 2001; Prior et al. 2005).

El método DPPH (2,2 – Difenil - 1 picrilhidrazila) se fundamenta en la habilidad

de antioxidantes presentes en la muestra, de unan con el DPPH, un radical libre orgánico estable. La absorción máxima de DPPH es a 515 nm. La caída de la absorbancia del DPPH cuando está en la presencia de un antioxidante indica la transferencia de un átomo de hidrógeno o electrón para eliminar el radical DPPH, este puede ser reducido por un antioxidante o especies de radicales libres (Brand -Williams et al. 1995). A medida que el radical se extingue por los antioxidantes el color de la solución puede ser visualizado por el cambio de violeta para amarillo claro y la absorbancia va disminuyendo (Sun et al. 2002; Oki et al. 2002).

El método ORAC o Capacidad de Absorción del Radical Oxígeno, es muy usado para verificar la capacidad secuestradora de un antioxidante frente a la formación de un radical peroxila inducido por el 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) a 37°C. En este ensayo, el radical peroxila reacciona como un compuesto fluorescente - fluoresceína (FL) (3', 6'-dihidroxy-spiro [isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanthen]-3-one). La fluoresceína es deteriorada a través de una serie de pasos resultando en la pérdida de la intensidad de la fluoresceína (OU, 2001). El efecto protector de un antioxidante es verificado calculando el área formada abajo de la curva de decaimiento de la fluorescencia de la muestra versus el tiempo, y es comparada con el blanco del ensayo, que no presenta antioxidantes.

2.1.5. Extracción de antioxidantes naturales

Andreo & Jorge (2006) mencionaron que en la extracción de compuestos antioxidantes naturales con solventes de polaridades diferentes, las investigaciones se enfocan en encontrar la mejor alternativa para la aplicación en alimentos. Para ello, con el fin de conservar los antioxidantes naturales, deben realizarse algunas etapas

preliminares para facilitar el proceso de extracción. De este modo, vegetales deben ser deshidratados, liofilizados y molidos y así los sustratos adquieren mayor superficie de contacto con el solvente de extracción y las enzimas lipoxigenasa, presentes en vegetales, se tornan inactivas.

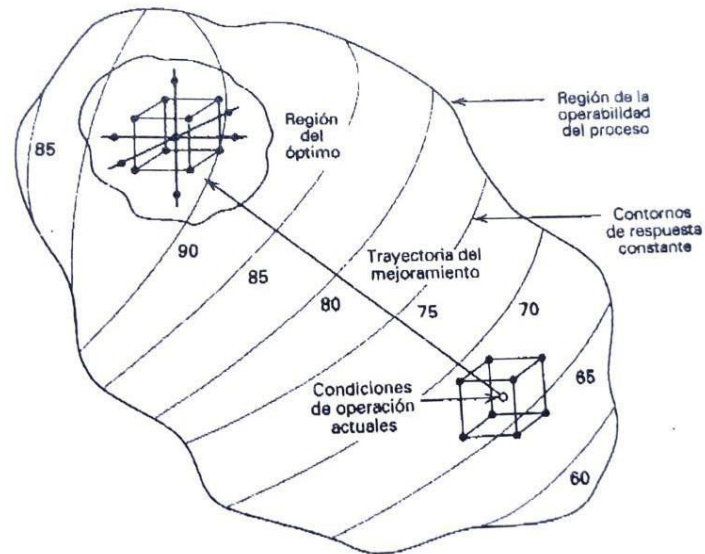
2.1.6. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es optimizar esta respuesta, de esta forma, el objetivo último de MSR es determinar las condiciones óptimas del sistema o determinar una región del espacio de los factores en la que satisfagan los requerimientos de operación (Montgomery, 2004, p. 427).

Con este objetivo, se emplean funciones polinómicas lineales o cuadradas para describir el sistema estudiado y, en consecuencia, explorar (modelar y desplazar) las condiciones experimentales hasta su optimización.

Figura 5

El carácter secuencial de la MSR



Fuente: Tomado de “Diseño y Análisis de Experimentos”

(p.429), por Montgomery, 2004.

En la figura 5 se puede ver que el análisis de una superficie de respuesta es un proceso secuencial, que puede considerarse como el ascenso a una colina”, donde la cima de esta representa el punto de la respuesta máxima. Si el verdadero óptimo es un punto de respuesta mínima, entonces la situación puede considerarse como “el descenso a un valle” (Montgomery, 2004, p. 427).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde:

y : Variable dependiente

predicha β_0 : Coeficiente

intercepto

β_i , β_{ii} y β_{ij} : Coeficientes del modelo lineal, cuadrático e interacción, respectivamente

X_i y X_j : Valores codificados de las variables independientes.

Bezerra et al. (2008) mencionan que hay algunos pasos en la aplicación de MSR en la optimización de técnicas:

- i. Selección de variables independientes de los principales efectos sobre el sistema mediante un cribado y delimitación de la región experimental.
- ii. Escoger un diseño y realizar los experimentos de acuerdo con la matriz experimental seleccionada
- iii. Tratamiento matemático-estadístico de los datos experimentales obtenidos mediante el ajuste de una función polinomial;
- iv. Evaluación de la aptitud del modelo
- v. Verificación de la necesidad y posibilidad de realizar un desplazamiento en dirección a la región óptima; y
- vi. Obtención de valores óptimos para cada variable en estudio.

Así, en la determinación de las mejores condiciones del proceso de extracción de compuestos vegetales, se puede realizar a través de un diseño factorial fraccionado y su posterior optimización mediante un diseño de superficie Box-Behnken.

En el proceso de extracción, muchas variables pueden afectar la respuesta del sistema estudiado, por tanto, el primer paso es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre y , que es la variable dependiente y el conjunto de variables independientes, con la finalidad de seleccionar esas variables con los

principales efectos (Bezerra et al., 2008; Montgomery, 2004) Con este fin puede ser usado el diseño factorial fraccionado 2^{n-1} , donde por lo general se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes.

3.2.7.1. Screening por Diseño factorial fraccionado 2^{n-1} . En el proceso de extracción, muchas variables pueden afectar la respuesta del sistema estudiado, por tanto, el primer paso es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre y , que es la variable dependiente y el conjunto de variables independientes, con la finalidad de seleccionar esas variables con los principales efectos (Bezerra et al., 2008; Montgomery, 2004). Con este fin puede ser usado el diseño factorial fraccionado 2^{n-1} , donde por lo general se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es el modelo de primer orden:

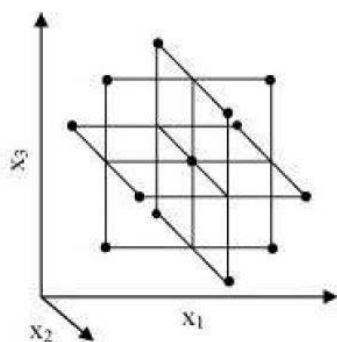
$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1 X_2 + \beta_5 X_1 X_3 + \beta_6 X_2 X_3$$

3.2.7.2. Optimización por Diseño de superficie Box Behnken. El diseño Box-Behnken fue presentado por Box y Behnken en 1960, siendo una de las más conocidas en metodología de superficie de respuesta (MSR). Ese tipo de diseño es muy utilizado en la química, principalmente, en química analítica, en la optimización de procesos comprendiendo factores experimentales, con el fin de establecer las mejores condiciones para el análisis (Gomes, 2013).

Box-Behnken es un diseño rotacional donde cada variable presenta 3 niveles y los puntos experimentales están distribuidos de forma equidistante del punto central.

Figura 6

Diseño Box–Behnken para la optimización de 3 variables



Fuente: Adaptado de “Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry” (p.970), por Bezerra et al., 2008, Talanta, 76.

Tabla 4

Variables Independientes Codificadas

| Ensayos | Variables independientes codificadas | | |
|---------|--------------------------------------|-----------|-----------|
| | <u>X1</u> | <u>X2</u> | <u>X3</u> |
| 1 | -1 | -1 | 0 |
| 2 | 1 | -1 | 0 |
| 3 | -1 | 1 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | -1 | 0 | -1 |
| 6 | 1 | 0 | -1 |
| 7 | -1 | 0 | 1 |
| 8 | 1 | 0 | 1 |
| 9 | 0 | -1 | -1 |
| 10 | 0 | 1 | -1 |
| 11 | 0 | -1 | 1 |
| 12 | 0 | 1 | 1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | <u>0</u> | <u>0</u> | <u>0</u> |

Fuente: Adaptado de “Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry” (p.970), por Bezerra et al., 2008, Talanta, 76

III. METODO

3.1. Tipo de Investigación

Es una investigación cuantitativa y experimental y según la OCDE (Organización para la Cooperación Económica y desenvolvimiento) se encuentra en el área de conocimiento de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

3.2. Ámbito temporal y espacial

Las muestras de *Ipomoea batatas* (L.) lam in natura fueron proporcionados por las Centrales de Abastecimiento de Campinas S.A - CEASA. La muestra es un cultivo originario del Distrito de Caldas en el Sur de Minas, estado de Minas Gerais- Brasil. El material fue transportado en un cooler para la Facultad de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Estadual de Campinas - UNICAMP - SP, almacenado a 5 °C hasta el momento del preparo de los extractos, período no superior a dos meses. El proyecto fue desarrollado en un periodo de 6 meses (desde febrero a agosto del 2021).

3.3. Variables

Las variables de estudio para obtener un extracto con mayor tenor de antocianinas fueron dependientes e independientes.

3.3.1. Variables dependientes

Las variables dependientes del presente trabajo fue el contenido de antocianinamonoméricos totales y actividad antioxidante con el método DPPH y ORAC

3.3.2. Variables independientes

Fueron la temperatura (70, 80 y 90 °C), concentración del solvente etanol con relaciónal agua (45, 55 y 65 %) y pH (1, 2 y 3).

3.4. Población y muestra

La muestra de estudio es el camote de la variedad morada, de origen brasilera, estado de Minas Gerais – Brasil, donde fue proporcionado por las Centrales de Abastecimiento de Campinas S.A – CEASA, luego el extracto del camote morado fue liofilizado y almacenado en frascos ámbar a -18°C hasta el momento del análisis de experimentos.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Materiales

a) Materia prima

Se utilizó el camote variedad morada originaria de Brasil, estado Minas Gerais.

b) Material de laboratorio

- Placas de petri
- Funil separador 60 mL
- Soporte de metal
- Cangrejo
- Frascos ámbar

- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Pipetas.
- Matraz Erlenmeyer
- Agitadores magnéticos
- Embudo

c) Reactivos

- Cloruro de potássio
- Acetato de sódio
- Ácido Clorhídrico
- Cianidina-3-glucosideo (cyd -3-glu)
- Acetato de Etila
- Etanol
- Metanol
- 2,20-Azobis (2-methylamidinopropane) -dihydrochloride (AAPH)
- Fluoresceína de sodio
- Estándar Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcromano-2-carboxílico)
- Tampón fosfato
- 2,2 – Difenil - 1 picrilhidrazila (DPPH)

3.5.2. Equipos

- Extractor de jugo (Juicer Philips Walita RI - Modelo 1865).
- Nevera de refrigeración y congelación
- Liofilizador, Liotop, Liobras, Brazil
- Homogenizador (Ultra-Turrax T-25, Germany)

- Equipo purificador de agua ultrapure MilliQ
- Espectrofotómetro Beckman Coulter tm, USA D.U. 640
- Rotavapor Buchi
- Balanza analítica
- Centrífuga de Bancada 5000 RPM
- Shaker incubador
- Lector de microplacas NOVOstar (BMG Labtech®, Offenburg, Germany)
- *Todos los solventes son de grado P.A., adquiridos de *Merck, Darmstadt, Germany*; y los reactivos fueron adquiridos de *Sigma Aldrich Chemical Co* (St. Louis, MO, USA).

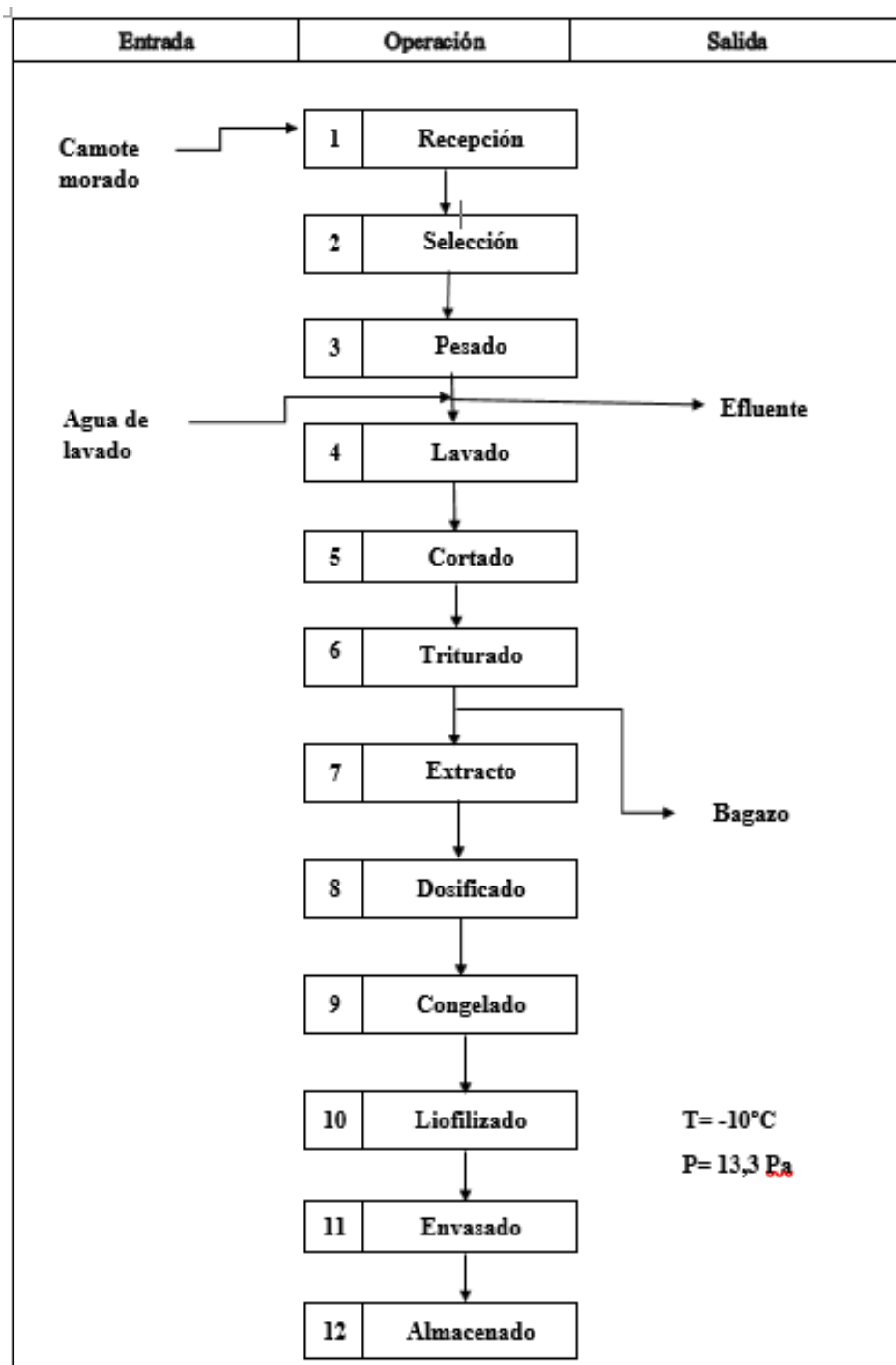
3.6. Procedimientos tecnológicos

3.6.1. Obtención de harina liofilizada de camote morado

Los camotes fueron higienizados manualmente y triturados en el extractor de jugo (Juicer Philips Walita RI - Modelo 1865). El extracto fue distribuido en placas Petri en pequeñas porciones, y fue inmediatamente congelado y posteriormente fue realizado el procesamiento por liofilización (-10°C a 13,3 Pa). El extracto de camote morado liofilizado luego fue almacenado en frascos ámbar a -18°C hasta el momento de los análisis.

Figura 7

Diagrama de Flujo



Fuente: Elaboración propia (2022)

3.6.2. Cuantificación de las antocianinas de harina liofilizada de camote morado

La cuantificación total de antocianinas monoméricas fue realizada utilizando el método descrito por Giusti y Wrolstad (2001). Se empleó el espectrofotómetro Beckman Coulter tm, USA D.U. 640, calibrado a una medida espectral de 510 y 700 nm.

Las muestras fueron diluidas en dos diferentes soluciones: una con cloruro de potasio (0,025M) pH 1.0 y el otro con acetato de sodio (0,4M), pH 4.5. El pH fue ajustado con ácido clorhídrico concentrado. Inmediatamente estas soluciones fueron diluidas con el factor de dilución (FD) de la muestra. Para determinar el FD se realizó las pruebas de diluciones proporcionales con la solución buffer de cloruro de potasio a pH 1.0 hasta que la absorbancia a 510 nm sea $< 0,8$ (Lee et al. 2005). El agua se usó como blanco de la muestra. Las muestras diluidas fueron mantenidas por 15 min hasta equilibrar las diluciones para hacer la lectura de la absorbancia.

Las diferencias entre las absorbancias de las muestras con pH 1.0 y pH 4.5 fue calculada por la Ecuación 1

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 1.0 - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) \text{ pH } 4.5$$

La concentración de los pigmentos de antocianinas monoméricas fue calculada usando la siguiente Ecuación 2:

$$AMT \text{ (mg(cyd - 3 - glu) /L)} = \frac{(A)(PM(\text{cyd - 3 - glu}))(\text{FD})(100)}{0)(\epsilon)(l)}$$

Donde:

AMT = Antocianinas Monoméricas Totais

PM = Peso molecular (cianidina-3-glucosideo (cyd -3-glu))

DF = Factor de dilución

Longitud de trayectoria en cm = 1

ϵ = Absortividad molar de (cyd -3-glu) en unidades L x mol x cm⁻¹.

Los resultados fueron expresados como equivalentes de cianidina -3 glucosideo (cyd -3-glu), el cual es el pigmento antocianina más común encontrada en la naturaleza (Lee et al; 2005, Francis, 1989).

3.6.3. Determinación de Actividad Antioxidante

3.6.3.1. Ensayo de DPPH (2,2 - Difenil - 1 picrilhidrazila). Los ensayos fueron realizados conforme los métodos propuestos por Roesler (2007) y Scherer y Godoy (2009). Los cambios de la absorbância del DPPH se verificó en un fluorímetro (Newstar fluorometer labtechnologies BMG) a 517 nm.

La capacidad de secuestrar radicales libres será expresada como porcentaje de inhibición de oxidación del radical y será calculado conforme la siguiente fórmula (Roesler, 2007).

$$\text{Inhibición (\%)} = ((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{A}})/A_{\text{DPPH}})(100)$$

Donde: A_{DPPH} es la absorbância de la solución de DPPH, y A_{A} es la absorbância dela muestra en solución y será calculado con base en la diferencia de la absorbancia de la solución de la muestra con el ensayo en blanco.

El valor de DPPH fue expresado en IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) que es definido como la concentración final en $\mu\text{g/mL}$ del extracto seco presente en la cubeta, requerido para disminuir la concentración inicial de DPPH en 50% y fue construída una curva patrón de Trolox (Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Sigma, Aldrich), con concentración de Trolox

(μM) en función de la inhibición (%). El resultado fue expresado en μM Trolox equivalentes por gramos de extracto seco.

3.6.3.2. Ensayo de ORAC (Capacidad de absorción de radical oxígeno). Los ensayos fueron realizados conforme los métodos descritos por Prior et al. (2005); y Dávalos et al. (2004), con algunas modificaciones.

La intensidad de fluorescencia fue verificada con el uso del lector de microplacas NOVOstar (BMG Labtech®, Offenburg, Germany). El cálculo del área debajo de la curva (AUC) fue realizada con la siguiente fórmula:

$$\text{AUC} = 1 + f_2/f_1 + f_3/f_1 + f_4/f_1 + f_n/f_1$$

Donde: f_1 = Lectura de la fluorescencia en 1

minuto

f_n = Lectura de la fluorescencia en 80 minutos

Los resultados fueron expresados en μM equivalentes de trolox utilizando una curva patrón de trolox, realizada en cada ensayo. El área de pérdida de la fluorescencia de una muestra fue calculada sustrayendo el área correspondiente al control. Los valores fueron expresados en μM equivalentes de trolox/g de muestra, en base seca.

3.7. Diseño de experimentos estadísticos y Análisis de datos

Para obtener un extracto con mayor tenor de antocianinas, se realizó primeramente un diseño experimental fraccionado 2^{n-1} , por replicado, siendo $n = 3$ y totalizando 10 ensayos con puntos centrales. Las variables independientes fueron: temperatura X_1 (70, 80 y 90 °C), concentración del solvente etanol/agua: X_2 (45, 55 y 65 %) y pH X_3 (1, 2 y 3) y la variable dependiente fue el contenido de antocianinas monoméricas.

Asimismo, para la optimización de los parámetros de la extracción de las

antocianinasmonoméricas de camote morado liofilizado se empleó la metodología de superficie de respuesta de Box Benhken (Tabla 5 y 6)). Fueron realizados 17 experimentos con replicas en el punto central.

Los experimentos fueron ejecutados en orden aleatorio y el tratamiento de datos para comparar el efecto de los tratamientos. La variable dependiente (Y) fue generada en modelos de función lineal, cuadrática e interacción y los datos experimentales fueron ajustados al modelo polinomial de segundo orden como se muestra en la siguiente ecuación (Rodrigues y Iemma, 2014):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde:

Y es la variable dependiente

predicha β_0 : Coeficiente

intercepto

β_i , β_{ii} y β_{ij} : Coeficientes del modelo lineal, cuadrático e interacción,

respectivamente X_i y X_j : Valores codificados de las variables independientes.

Tabla 5

Diseño Experimental de Niveles Codificados y Decodificados

| Variables independientes | | Niveles codificados | | |
|--------------------------|------------------|-------------------------|-----|-----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| | | Variables decodificados | | |
| X ₁ | Temperatura (°C) | 70 | 80 | 90 |
| X ₂ | Etanol (%)* | 45 | 55 | 65 |
| X ₃ | pH | 1.0 | 2.0 | 3.0 |

* con relación al agua.

Fuente: Elaboración propia (2022)

Tabla 6*Diseño de Box Behnken para variables independientes codificadas y decodificadas*

| Ensayos | Variables independientes codificadas | | | Variables independientes decodificadas | | pH |
|---------|--------------------------------------|----|----|--|------------|----|
| | X1 | X2 | X3 | Temperatura (°C) | Etanol (%) | |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 70 | 45 | 2 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 90 | 45 | 2 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 70 | 65 | 2 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 90 | 65 | 2 |
| 5 | -1 | 0 | -1 | 70 | 55 | 1 |
| 6 | 1 | 0 | -1 | 90 | 55 | 1 |
| 7 | -1 | 0 | 1 | 70 | 55 | 3 |
| 8 | 1 | 0 | 1 | 90 | 55 | 3 |
| 9 | 0 | -1 | -1 | 80 | 45 | 1 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 80 | 45 | 1 |
| 11 | 0 | -1 | 1 | 80 | 65 | 3 |
| 12 | 0 | 1 | 1 | 80 | 65 | 3 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 80 | 55 | 2 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 80 | 55 | 2 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 80 | 55 | 2 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 80 | 55 | 2 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 80 | 55 | 2 |

Fuente: Elaboración propia (2022)

En el análisis estadístico para el diseño factorial fraccionado se analizó el ANOVA a 95 % de intervalo de confianza para verificar el coeficiente de determinación, efectos de los parámetros y la significancia de la curvatura. Una vez evaluado los efectos significativos, se procedió a aplicar la metodología de superficie de respuesta (MSR) de Box-Behnken para la optimización de parámetros más influyentes en el proceso de extracción de antocianinas manométricas, se analizó en ANOVA a 95 % de confianza para verificar los parámetros y los modelos lineal y cuadrático significativos, el coeficiente de determinación, falta de ajuste y el modelo predictivo generado. Para los análisis de actividad antioxidante los ensayos fueron realizados utilizando desvío padrón, por el programa Microsoft Excel Starter 2010. Todos los ensayos fueron realizados por

triplicado. Para el análisis estadístico fue realizado el Diseño de experimentos (DOE), utilizando el programa Minitab versión 19.1.

IV. RESULTADOS

4.1. Obtención de harina liofilizada de camote morado para análisis

En la obtención de una harina liofilizada de extracto de camote morado se obtuvo un extracto con características químicas mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 7

Composición Química del Extracto Liofilizado de Camote Morado en 100g.

| Composición | Extracto liofilizado |
|--------------------|-----------------------------|
| Humedad (g) | 3,47±0,17 |
| Proteína (g)Nx6,25 | 6,41±0,04 |
| Grasas (g) | 0,7±0,02 |
| Carbohidratos* (g) | 84,48±0,3 |
| Fibra (g) | 1,54±0,001 |
| Ceniza (g) | 3,40±0,03 |
| pH | 5,93±0,5 |

*Calculado por diferencia

Fuente: Elaboración propia (2022)

4.1.1. Rendimiento del extracto de camote morado liofilizado

Los resultados del rendimiento del extracto liofilizado son mostrados en la Tabla 7. Donde se observa que el rendimiento del extracto liofilizado em relación al extracto de camote fue de 25,9% y del extracto del camote con relación a la raíz fue de 41,33%.

Tabla 8

Rendimiento del Extracto Liofilizado en Relación al Extracto del Camote Morado

| Rendimiento del extracto (%)* | Rendimiento del extracto liofilizado (%)** |
|--------------------------------------|---|
| 41,33±5,76 | 25,89±3,78 |

*con relación a la raíz, **con relación al extracto.

Fuente: Elaboración propia (2022)

4.2. Cuantificación de las antocianinas a partir de extracto de camote

morado liofilizado

La cantidad de antocianinas monoméricas totales (AMT) fue determinada a través del método de pH diferencial descrito por Giusti y Wrolstad (2001) que se fundamenta en las transformaciones, verificadas en el cambio de color, que sufren las antocianinas con la variación del pH. El oxonium colorido, es la forma existente a pH 1.0 y la forma incoloro hemiketal predominante a pH 4.5. Las diferencias de las absorbancias de los pigmentos son proporcionales a las concentraciones de los mismos. Los resultados fueron expresados en base a cianidina-3-glucoside (cyd -3-glu). Las antocianinas degradadas que están en la forma polimérica son resistentes a los cambios de color independientemente del pH y no fueron incluidas en la medida.

4.2.1. Resultados de antocianinas monoméricas totales (AMT) por metodología desuperficie de respuesta (MRS)

4.2.1.1. Resultados del diseño factorial fraccionado para AMT

Tabla 9

Cuantificación de AMT Usando Diseño Factorial Fraccionado 2^{3-1}

| Ensayos | Variables independientes | | | Variable dependiente AMT (mg/100g) |
|---------|--------------------------|------------|----|---------------------------------------|
| | Temperatura (°C) | Etanol (%) | pH | |
| 1 | 70 | 45 | 3 | 298,6±4.24 |
| 2 | 90 | 45 | 1 | 321,7±2.21 |
| 3 | 70 | 65 | 1 | 293,4±7.07 |
| 4 | 90 | 65 | 3 | 291,85±0.33 |
| 5 | 80 | 55 | 2 | 336,65±6.29 |

Fuente: Elaboración propia (2022)

En la Tabla 9 se muestra los resultados para la extracción de AMT aplicando factorial fraccionado 2^{n-1} , donde n es igual al número de variables. En este estudio son 3 factores influyentes en la variable respuesta antocianina:

temperatura (°C), etanol (%) y pH. Siendo en total de 10 ensayos con puntos centrales. En esta Tabla 9 se observa que el mayor valor de extracción de se da en el tratamiento del punto central con un valor de antocianinas monoméricas de 336,65 mg/100g.

Tabla 10

Anova de AMT Usando Diseño Factorial Fraccionado (A)

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 4.73772 | 96,55% | 93,79% | 86,20% |

Fuente: Elaboración propia (2022)

En la Tabla 10 se puede observar los valores generados para el modelo de primer orden que alcanzó un coeficiente de determinación $R^2 = 96,55\%$.

Tabla 11

Anova de AMT Usando Diseño Factorial Fraccionado (B)

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|------------------|----------|---------------|----------------|--------------|--------------|
| Modelo | 4 | 3139.8 | 784.94 | 34.97 | 0.001 |
| Lineal | 3 | 1150.3 | 383.42 | 17.08 | 0.005 |
| Temperatura (°C) | 1 | 232.2 | 232.20 | 10.34 | 0.024 |
| Etanol (%) | 1 | 614.3 | 614.25 | 27.37 | 0.003 |
| pH | 1 | 303.8 | 303.81 | 13.54 | 0.014 |
| Curvatura | 1 | 1989.5 | 1989.51 | 88.64 | 0.000 |
| Error | 5 | 112.2 | 22.45 | | |
| Total | 9 | 3252.0 | | | |

Fuente: Elaboración propia (2022)

Los datos de la Tabla 11 muestra el análisis de varianza (ANOVA) para los efectos lineales de la ecuación. El P-valor para la temperatura, etanol y pH fueron menor que 0,05, es decir fueron significativos. Así el modelo obtenido a través de la siguiente ecuación fue:

$$AMT (mg/100g) = 318.8 + 0.539Temperatura (°C) - 0.876Etanol (\%) - 6.16 pH + 35.26 PC$$

Esta ecuación fue verificada por la anova (Tabla 10) que mostró ser representativo. Y las gráficas generadas para el ajuste al modelo de primer orden alcanzaron un coeficiente de determinación de 96,55% (Tabla 10), lo que implica que el modelo se ajusta bien a los datos experimentales e indica que la ecuación fue adecuada para explicar la región estudiada, es decir el modelo propuesto fue matemáticamente satisfactorio. El modelo de primer orden corrobora que el factor de la temperatura (°C) tuvo mayor significancia en la extracción de antocianinas con un coeficiente de 0.539, el porcentaje de etanol tuvo mayor significancia con un coeficiente de 0.876 y pH con un coeficiente de 6.16.

Por otro lado, en la Tabla 11 se observa un efecto significativo de la curvatura. Según Montgomery (2004) menciona que, de existir curvatura en el sistema, se debe llevar a cabo experimentos empleando un polinomio de orden superior como el modelo de segundo orden, para ello se aplicó la MSR de Box-Behnken a seguir.

4.2.1.2. Resultados de AMT empleando diseño de Box-Behnken.

Para optimizar los parámetros de extracción de antocianinas, se realizó mediante el diseño de superficie Box-Behnken para obtener la máxima eficiencia en la extracción de antocianinas, para ello se usó los factores influyentes del proceso determinados a través del diseño factorial fraccionado mencionado en ítem anterior, los cuales fueron la temperatura, concentración de etanol y pH. Los parámetros fueron optimizados con superficie de respuesta de segundo orden, para ello se empleó Box Behnken con 5 repeticiones en los puntos centrales totalizando 17 ensayos. Los valores de las variables independientes y variable dependiente se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12*Cuantificación de AMT empleando diseño de Box-Benken*

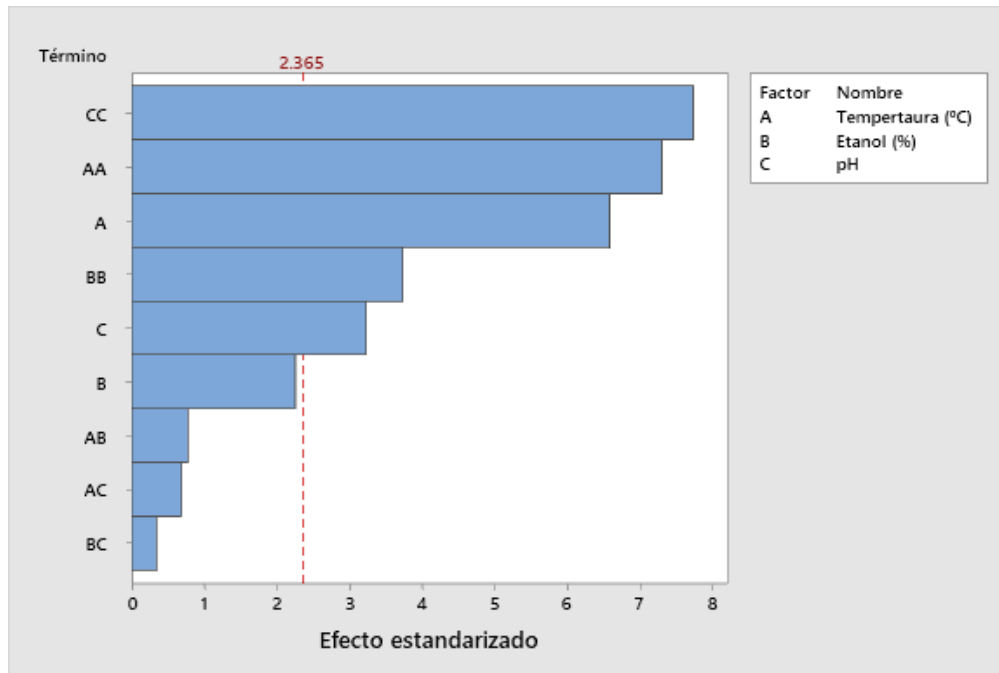
| Ensayos | Variables independientes | | | Variable dependiente AMT (mg/100g) |
|---------|--------------------------|------------|----|---------------------------------------|
| | Temperatura (°C) | Etanol (%) | pH | |
| 1 | 70 | 45 | 2 | 314.6 |
| 2 | 90 | 45 | 2 | 303.3 |
| 3 | 70 | 65 | 2 | 288.4 |
| 4 | 90 | 65 | 2 | 290.4 |
| 5 | 70 | 55 | 1 | 287.9 |
| 6 | 90 | 55 | 1 | 278.4 |
| 7 | 70 | 55 | 3 | 292.2 |
| 8 | 90 | 55 | 3 | 270.8 |
| 9 | 80 | 45 | 1 | 310.5 |
| 10 | 80 | 65 | 1 | 280.4 |
| 11 | 80 | 45 | 3 | 311.3 |
| 12 | 80 | 65 | 3 | 287.1 |
| 13 | 80 | 55 | 2 | 345.8 |
| 14 | 80 | 55 | 2 | 360.6 |
| 15 | 80 | 55 | 2 | 332.2 |
| 16 | 80 | 55 | 2 | 342.1 |
| 17 | 80 | 55 | 2 | 347.5 |

Fuente: Elaboración propia (2022)

Asi también, los principales efectos y sus respectivas interacciones calculadas con los datos de la Tabla 12, se puede verificar en la Tabla 13 el anova para los efectos lineales y cuadráticos

Figura 8

Diagrama de Pareto de AMT del Diseño de Box-Behnken



Fuente: Elaboración propia (2022)

Tabla 13

ANOVA en la Cuantificación de AMT empleando diseño de Box-Behnken

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Modelo | 9 | 11867.7 | 1318.63 | 17.67 | 0.001 |
| Lineal | 3 | 3897.5 | 1299.17 | 17.41 | 0.001 |
| Tempertaura (°C) | 1 | 3238.2 | 3238.21 | 43.40 | 0.01 |
| Etanol (%) | 1 | 379.0 | 378.95 | 5.08 | 0.059 |
| pH | 1 | 781.3 | 781.25 | 10.47 | 0.014 |
| Cuadrado | 3 | 10484.7 | 3494.90 | 46.85 | 0.000 |
| Temperatura (°C)*Temperatura (°C) | 1 | 3976.8 | 3976.79 | 53.30 | 0.000 |
| Etanol (%)*Etanol (%) | 1 | 1042.2 | 1042.15 | 13.97 | 0.007 |
| pH*pH | 1 | 4470.0 | 4469.98 | 59.92 | 0.000 |
| Interacción de 2 factores | 3 | 88.3 | 29.44 | 0.39 | 0.761 |
| Tempertaura (°C)*Etanol (%) | 1 | 44.2 | 44.22 | 0.59 | 0.467 |
| Tempertaura (°C)*pH | 1 | 35.4 | 35.40 | 0.47 | 0.513 |
| Etanol (%)*pH | 1 | 8.7 | 8.70 | 0.12 | 0.743 |
| Error | 7 | 522.2 | 74.60 | | |
| Falta de ajuste | 3 | 101.8 | 33.93 | 0.32 | 0.810 |
| Error puro | 4 | 420.5 | 105.11 | | |
| Total | 16 | 12389.9 | | | |

Fuente: Elaboración propia (2022)

Tabla 14*ANOVA de AMT empleando diseño de Box-Benkhen*

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|-----------------------|-------------------|
| 8.63739 | 95,79% | 90,37% | 81,55% |

Fuente: Elaboración propia (2022)

La Tabla 15 muestra los coeficientes de regresión de las variables y la Tabla 13 muestra que el porcentaje de variación de las variables fue explicada en 95,79%.

Tabla 15*Coefficientes de AMT empleando diseño de Box-Behnken*

| Término | EE del | | Valor T | Valor p | FIV |
|-----------------------------------|---------|--------|---------|---------|--------|
| | Coef | coef. | | | |
| Constante | -2009 | 357 | -5.63 | 0.001 | |
| Temperatura (°C) | 47.44 | 7.20 | 6.59 | 0.000 | 555.90 |
| Etanol (%) | 13.18 | 5.85 | 2.25 | 0.059 | 366.90 |
| pH | 146.5 | 45.3 | 3.24 | 0.014 | 219.90 |
| Temperatura (°C)*Temperatura (°C) | -0.3073 | 0.0421 | -7.30 | 0.000 | 487.41 |
| Etanol (%)*Etanol (%) | -0.1573 | 0.0421 | -3.74 | 0.007 | 230.91 |
| pH*pH | -32.58 | 4.21 | -7.74 | 0.000 | 31.41 |
| Temperatura (°C)*Etanol (%) | 0.0333 | 0.0432 | 0.77 | 0.467 | 189.50 |
| Temperatura (°C)*pH | -0.298 | 0.432 | -0.69 | 0.513 | 137.00 |
| Etanol (%)*pH | 0.148 | 0.432 | 0.34 | 0.743 | 69.50 |

Fuente: Elaboración propia (2022)

En la siguiente ecuación de regresión, se muestra el modelo codificado lineal para la variable respuesta antocianinas monoméricas totales. El modelo estadísticamente significativo propuesto fue matemáticamente predictivo y representativo en los parámetros de primero y segundo orden:

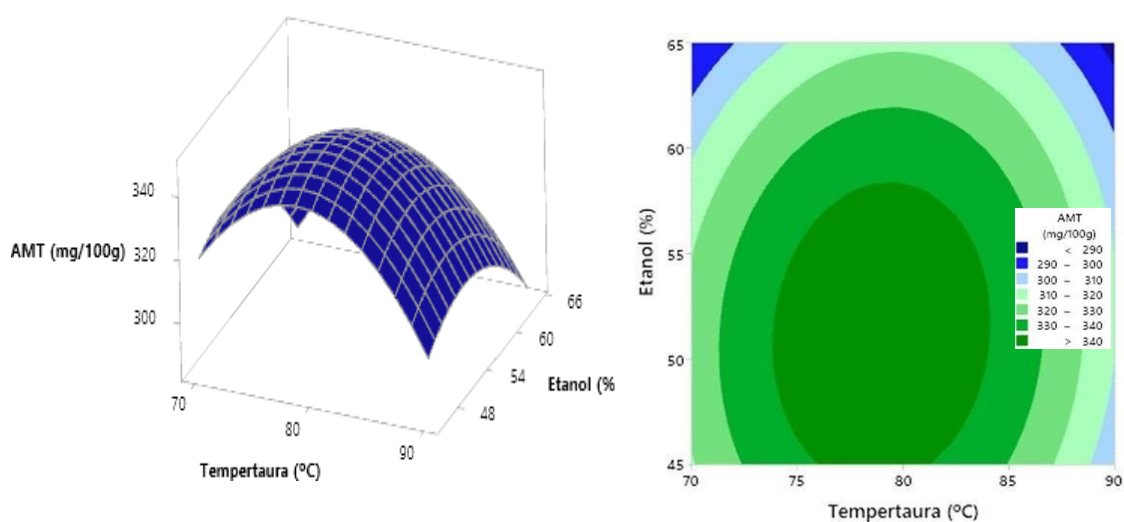
$$\begin{aligned}
 \text{AMT (mg/100g)} = & -2009 + 47.44\text{Temperatura}(\text{°C}) + 13.18\text{Etanol}(\%) + 146.5\text{pH} - \\
 & 0.3073\text{Temperatura}(\text{°C}) * \text{Temperatura}(\text{°C}) - 0.1573\text{Etanol}(\%) * \text{Etanol}(\%) - 32.58\text{pH} * \text{pH} + \\
 & 0.0333\text{Temperatura}(\text{°C}) * \text{Etanol}(\%) - 0.298\text{Temperatura}(\text{°C}) * \text{pH} + 0.148\text{Etanol}(\%) * \text{pH}
 \end{aligned}$$

En la Figura 9 se muestra la curva de contorno de la función respuesta antocianinas (mg eq cy-

3-glu/100gEL), temperatura y etanol, que fue generada a través del modelo propuesto, indicando que el contenido de antocianinas totales aumentó significativamente con el aumento de la concentración de etanol en agua hasta 55 % (donde el agua fue muy determinante en la extracción hidrolítica de antocianinas) y el aumento de la temperatura hasta cerca de 80 °C.

Figura 9

Superficie de Respuesta y Gráfico de Contorno para AMT de Temperatura (°C) y Etanol

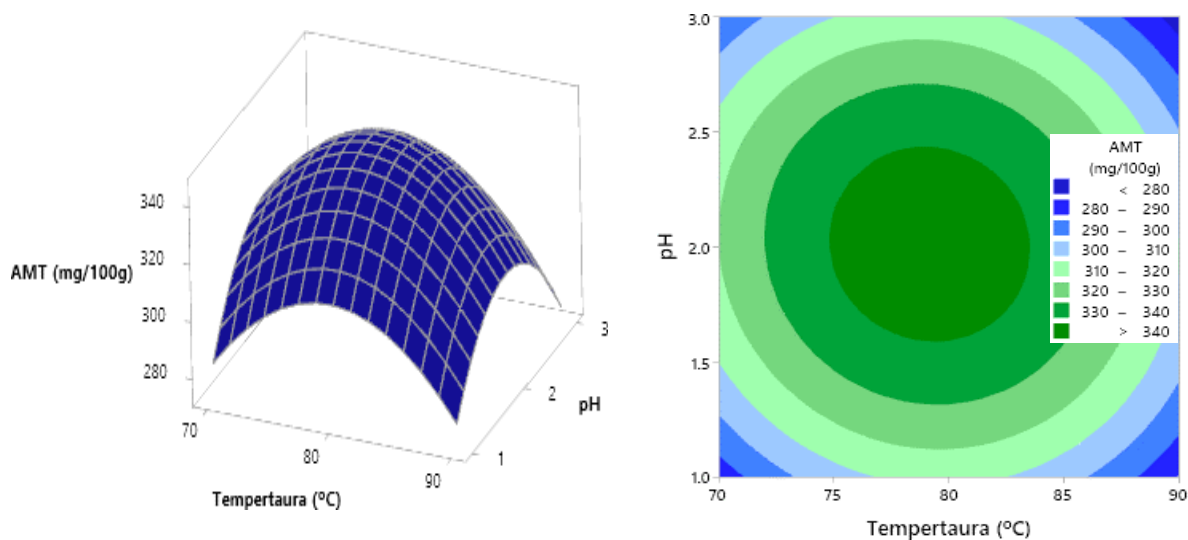


Fuente: Elaboración propia (2022)

En la Figura 10 también se muestra la superficie de respuesta, que indica que el contenido de AMT aumentó significativamente cuando la concentración de etanol llegó a un pH 2 y la temperatura a 80 °C, estos datos fueron confirmados por la anova.

Figura 10

Superficie de Respuesta y Gráfico de Contorno de AMT a pH y Temperatura (°C)

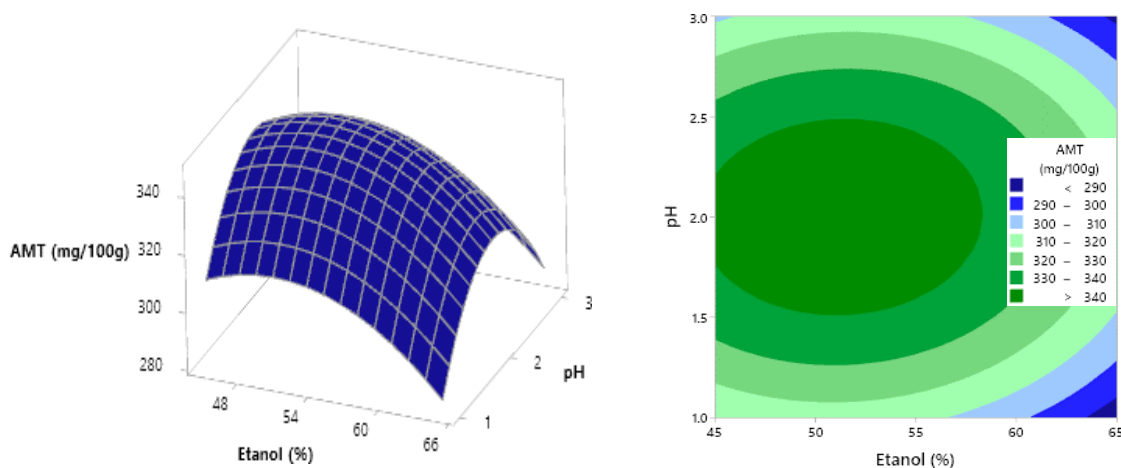


Fuente: Elaboración propia (2022)

En la Figura 11 se puede observar el grafico de contorno de cordillera superficie derespuesta, se verificó que a medida que el pH va aumentando desde uno, el contenido de etanol también va en aumento hasta un pH 2 y un porcentaje de etanol de 55%, estas condiciones de pH y temperatura favorecieron la extracción de antocianinas monoméricas totales

Figura 11

Superficie de Respuesta y Gráfico de Contorno de AMT a pH y Etanol (%)



Fuente: Elaboración propia (2022)

Tabla 16

Predicción de Respuesta Múltiple

| Variable | Valor de configuración |
|------------------|------------------------|
| Temperatura (°C) | 79 |
| Etanol (%) | 51 |
| <u>pH</u> | <u>2</u> |

Fuente: Elaboración propia (2022)

En la Tabla 16 se puede predecir que optimizando los factores del proceso de extracciónse puede obtener una mejor respuesta.

Tabla 17

Factores y Niveles Optimizados y Ajuste de Variable Respuesta

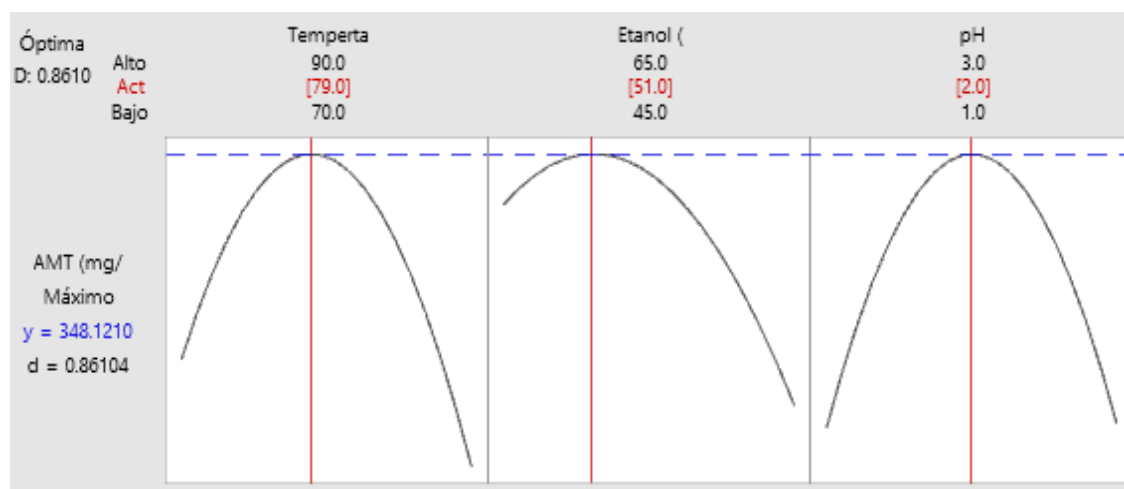
| Temperatura (°C) | Etanol (%) | pH | AMT (mg/100g) Ajuste |
|------------------|------------|----|----------------------|
| 79 | 51 | 2 | 348,121 |

Fuente: Elaboración propia (2022)

En la Tabla 17 se observa que se obtiene un máximo tenor de antocianinas con los factores optimizados.

Figura 12

Curva con Valores Optimizados para AMT



Fuente: Elaboración propia (2022)

En la Figura 12 se visualiza las curva de valores optimizados de temperatura a 79 °C, concentración de etanol a 51 % y pH 2.

4.3. Determinación de Actividad Antioxidante

4.3.1. Capacidad de secuestrar radicales libres– DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

La actividad antioxidante fue determinada por el ensayo de actividad secuestrante del radical DPPH. La Figura 13 muestra una curva estandar del porcentaje de inhibición en función de la concentración del extracto liofilizado de camote morado para encontrar la actividad antioxidante (DPPH) con una correlación de $R^2=99,3\%$.

Las sustancias antioxidantes presentes en los extratos reaccionan con el DPPH que es un radical estable. El grado de decoloración indica el potencial antioxidante del extracto.

La Tabla 18 muestra los resultados obtenidos por el ensayo DPPH, expresados en IC_{50} , que indica la cantidad de extracto necesaria para inhibir la oxidación del radical DPPH en 50%. El IC_{50} fue de 5,61 $\mu\text{g/mL}$. El resultado también fue expresado en Trolox equivalente, siendo 150 mgTE/g b.s.

Tabla 18

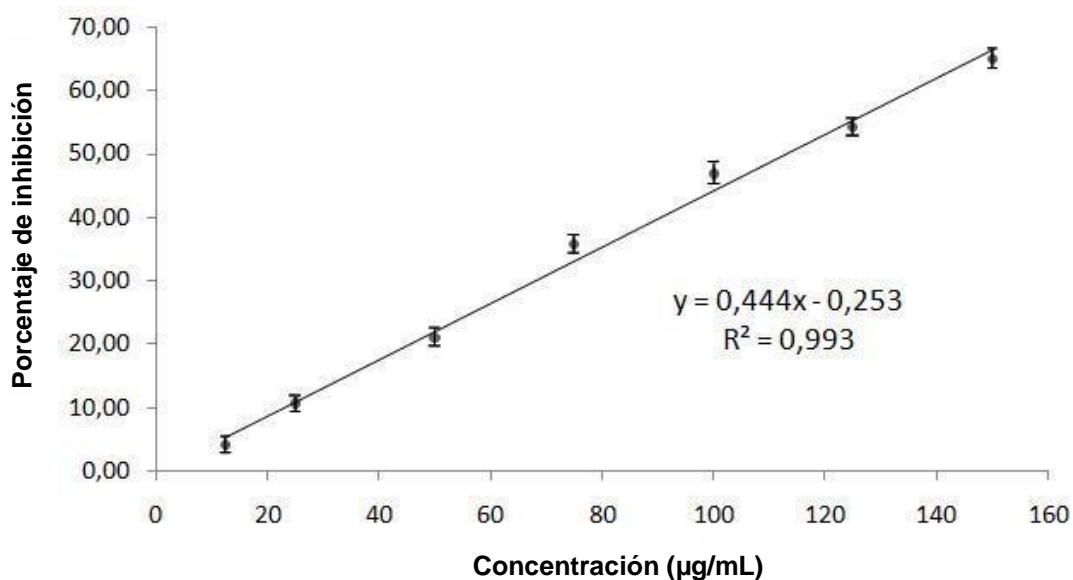
Tenor de Actividad Antioxidante del Extracto Liofilizado de Camote Morado

| Ensayo | Extrato de camote morado liofilizado |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | 5,61 \pm 0,04 |
| Trolox equivalente (mgTE/g b.s.) | 150 \pm 0,02 |

Fuente: Elaboración propia (2022)

Figura 13

Curva Patrón de Porcentaje de Inhibición en Función de la Concentración del Extracto Liofilizado de Camote Morado



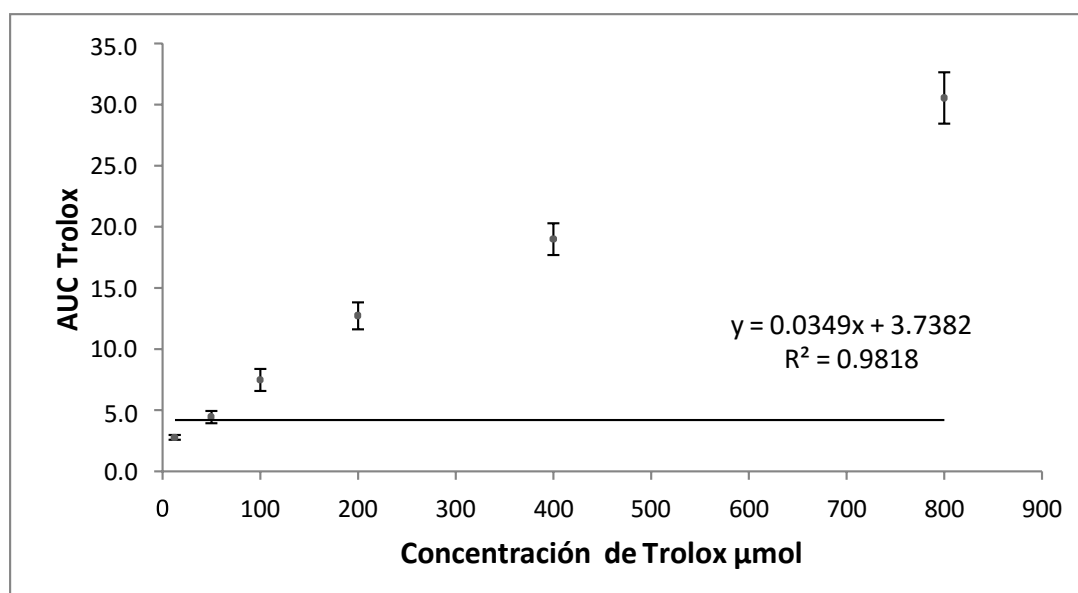
Fuente: Elaboración propia (2022)

4.3.2. Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC)

La Figura 14, muestra la curva estándar de concentración trolox. Este ensayo indica la intensidad de la fluoresceína a lo largo del tiempo para la actividad antioxidante del extracto de camote morado liofilizado. El camote morado exhibió una mayor área bajo la curva que corresponde a una alta actividad antioxidante de 141,89 $\mu\text{moTE/g}$ de extracto liofilizado.

Figura 14

Curva Padrón de Concentración Trolox para ORAC



Fuente: Elaboración propia (2022)

V. DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados aplicados por la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) por Box-Behnken mostrada en la Tabla 10 y 11, indican que el resultado experimentales fueron en el punto de inflexión en los parámetros de concentración de etanol a 55 %, temperatura de 80°C y 2.0 de pH, con un contenido de antocianinas de monómeros totales (AMT) de 345,64 mg/100g, por otro lado la Tabla 12 muestra que los datos experimentales se ajustan adecuadamente con $R^2 = 95.79\%$ al modelo cuadrático, los parámetros de estudio fueron estadísticamente significativos y el ajuste del modelo cuadrático generado es significativamente predictivo y representativo. Conforme Barros Neto, Scarmino y Bruns (2010) indican que el coeficiente de determinación (R^2) mide la proporción de variación total de la respuesta que es explicada por el modelo, de modo cuanto mayor R^2 , esto es cuando más cercano a 1, menor será el error y mejor será el ajuste del modelo a la respuesta observadas. Neto et al., (2010) indican que el ajuste del modelo generado es representativo y predictivo a través de la falta de ajuste y error puro ($SQ_{Residual} = SQ_{Error\ puro} + SQ_{Falta\ de\ ajuste}$).

En la optimización de parámetros, conforme es mostrado en la Tabla 17 y Figura 12, el contenido optimizado de acuerdo al modelo cuadrático generado de antocianinas totales monoméricas (AMT) fue de 348,12 mg eq cy-3-glu/100gEL, en los parámetros de concentración de etanol a 51 %, temperatura de 79 °C y 2.0 de pH.

Según investigaciones de Cascón (1984) sobre el tenor de antocianinas en raíces de camote morado brasilero, observó que variaron entre 100 a 430mg/100g en base seca, encontrándose la muestra estudiada en este rango. Cevallos-Casals y Cisneros – Zevallos (2002) y Guerrero (2003) observaron que el contenido de antocianinas totales encontradas en una muestra de camote peruano fue de 618 mg/100g y 186,67 mg/100g

en base seca respectivamente. Jiao et al. (2012) y Fan et al. (2008) de reportaron también que el tenor de antocianinas de camote morado de origen chino fue de 132 y de 158 mg/100 g (peso seco) respectivamente. Así también, Teow (2005), encontró que el contenido de antocianinas para varios clones de camotes americanos estuvieron entre 2,33 a 113 mg/100g en base seca.

De esta forma se observa que de acuerdo del tipo de cultivo además de las condiciones de extracción de antocianinas de camote morado de variedad brasileña de este estudio, podría ser clasificado en la mediana entre los camotes morados estudiados por otros autores, y muestran que el camote morado es una buena fuente de antocianinas.

En relación al sistema solvente utilizado en la extracción de antocianinas, Rockenbach et al. (2008) verificó que en la extracción de antocianinas totales del bagazo de uva influenció directamente en el contenido de antocianinas y fue bien extraído en solvente etanol a 50 %, esto fue verificado en la extracción de las antocianinas de camote morado.

Francis (1982) mencionó que cuando se trata da extracción de antocianinas para alimentos, universalmente se utiliza o etanol acidificado. Fan et al. (2008) mencionó que la adición de una pequeña cantidad de ácido clorhídrico o ácido fórmico es recomendado para prevenir la degradación de compuestos no acilados. El efecto del pH en la extracción de antocianinas varia, pues en este estudio, la extracción aumentó con la disminución de pH, consecuentemente un pH abajo de 2, puede indicar uso de alta concentración de HCl, lo que no es recomendado para aplicaciones en alimentos (Patil et al., 2009).

Las principales razones por las cuales muchos autores escogen el etanol puede estar relacionadas por ser un disolvente no tóxico, de bajo costo y por la alta eficiencia

extractora (Fuleki & Francis, 1968; Lapornik et al., 2005).

En las Figura 10 y 11 se observó que a pH 2 tuvieron los mayores rendimientos de extracción de antocianinas. Williams y Hrazdina (1979) mencionaron que las antocianinas exhiben intensos colores rojos en el rango de pH 1 a 3, donde a pH bajos se encuentran en la forma estable de sal flavilio y a pH mayores que 5 muestra la forma base anhidra de color púrpura, sufriendo transformaciones estructurales reversibles con pérdida de color rojo con colores indeseables. No obstante, Cevallos - Casals et al. (2002) mencionaron que un pH más alto puede mantener inicialmente el color del camote morado, pero, el color disminuye con el tiempo debido a la baja estabilidad. Valores similares de pH 2 de este estudio fue reportado por Guerrero (2013) que menciona que los resultados de mejores valores de rendimiento de antocianinas de camote morado fueron en solución de ácido cítrico a concentración de 4% y pH 1.97, y para el ácido fosfórico a concentración de 0.3 % en pH 2.

En la Figura 11 y Anexo 2 se muestran la superficie de respuesta y la curva de contornoda función-respuesta antocianinas (mg eq cy-3-glu/100gEL) generadas a través del modelo propuesto, indicando que el contenido de antocianinas totales aumentó significativamente cuando disminuyó el pH.

También fue verificado que el mejor rendimiento de antocianinas en este estudio fue a 79°C, este parámetro de temperatura similar fue reportado por Fan et al. (2008), que afirmaron que la optimización de extracción de antocianinas usando metodología de superficie respuesta se obtiene a 80°C.

En relación a la determinación de la actividad antioxidante de este estudio, el valor de la actividad antioxidante mediante el ensayo IC₅₀ del camote brasileiro estudiado fue de 5,61 µg/mL. Rumbaoa et al. (2009), los cuales trabajaron con diferentes genotipos

de camote, los valores de IC_{50} para las variedades de *Dakol* fue de 2,1; *Emelda* 24,7; *Haponita* de 3,0; *PSBSP10,5* e *Violet* 6,1 mg/mg de muestra en base fresca, además, Jiao et al., (2012) reportó el valor de IC_{50} de 6,94 $\mu\text{g/mL}$. Comparando estos resultados con el valor de IC_{50} del camote brasilero, evidenciaron valores menores. Roesler (2007), afirmó que un extracto que tiene alto potencial en secuestrar radicales libres posee bajo valor de IC_{50} . De esta forma, una pequeña cantidad de extracto es capaz de decrecer la concentración inicial del radical DPPH en 50%, o sea, inhibir la oxidación del radical en 50%.

En relación al ensayo ORAC, la muestra de este estudio exhibió una mayor área debajo de la curva, que corresponde a una actividad antioxidante de 141,89 $\mu\text{mol TE/g}$ de muestra de extracto liofilizado. Según valores de actividad antioxidante de ORAC reportados por Wang et al. (2020) fue de 130,94 $\mu\text{mol TE/g}$, Steed y Truong reportaron una actividad antioxidante de 58,7 $\mu\text{mol TE/g p.s.}$, ya Teow (2005) y Wu et al. (2004) reportaron niveles mas bajos de 27,20 $\mu\text{mol TE/g p.s}$ y de 9,2 $\mu\text{mol TE/g p.s.}$, respectivamente. En consecuencia, se puede observar que el resultado de la actividad antioxidante por ORAC del extracto de camote morado brasilero evidenció tener mayor potencial antioxidante debido a los mecanismos de acción de sus compuestos activos responsables del potencial de la muestra (Teow, 2005). Estos reportes de autores, también muestran un amplio rango de diferencia de actividad antioxidante entre los diferentes cultivos de camote morado.

De acuerdo con Teow (2005), los resultados de los métodos ORAC y DPPH tienen similar capacidad predictiva para la actividad antioxidante del camote. La actividad antioxidante obtenida por el ORAC es alta por el contenido de fenóles totales.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ De acuerdo con los objetivos de este estudio, se realizó la optimización de la extracción de antocianinas, usando primero un diseño factorial fraccionado que nos permitió reducir el número de experimentos necesarios para la optimización de la extracción usando la metodología de superficie de respuesta de Box Behnken.
- ✓ En el diseño factorial fraccionado, los factores influyentes del proceso que fueron la temperatura, etanol y pH, con un coeficiente de determinación de 96,75% y un nivel de significancia de los factores y curvatura.
- ✓ Los resultados experimentales por la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) por Box-Behnken fueron en el punto de inflexión o central en los parámetros de concentración de etanol a 55 %, temperatura de 80 °C y 2.0 de pH, con un contenido de antocianinas de monómeros totales (AMT) de 345.64 mg/100g,
- ✓ Para la optimización de los parámetros en la extracción de antocianinas, los datos experimentales se ajustaron en un 95,79 % al modelo cuadrático, el ajuste del modelo es significativo, predictivo y representativa obteniendo un resultado óptimo de antocianinas monoméricas totales (AMT) de un tenor de 348,1 mg/100g en parámetros óptimos de temperatura a 79 °C, etanol a 51 % y pH a 2.
- ✓ Los resultados obtenidos en la actividad antioxidante con el método DPPH expresado en IC 50 ($\mu\text{g/mL}$) y Trolox equivalente (mgTE/g b.s.) fueron de 5,61 y 150 mgTE/g b.s. respectivamente. Y usando el método ORAC, la muestra del extracto de camote morado liofilizado exhibió una mayor área debajo de la curva que corresponde a una alta actividad antioxidante de 141,89 $\mu\text{molTE/g b.s.}$ para el extracto liofilizado.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar ensayos usando otras metodologías de optimización como por ejemplo elDiseño compuesto central rotacional (DCCR).
- ✓ Realizar la extracción de antocianinas, cuantificación y determinación de actividadantioxidante en toda la raíz.
- ✓ Aplicar con otros tipos de solventes en la cuantificación y antocianinas y actividad deantioxidantes.

VIII. REFERENCIAS

- Andersen, M. y Jordheim, M. (2006). Chemistry of Flavonoid-Based Colors in Plants, Development & Modification of Bioactivity, 3, 547–614. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00086-1>
- Arruda, H., Silva, E., Peixoto, N., Pereira, G., Pastore, G. y Maróstica, M. (2021). Anthocyanins recovered from agri-food by-products using innovative processes: Trends, challenges, and perspectives for their application in food systems. *Molecules*. 26 (9), 2632. <https://doi.org/10.3390/molecules26092632>
- Bovell-Benjamin, A.C. (2007). Sweet potato: a review of its past, present, and future role in human nutrition, *Advances in Food and Nutrition Research*, 52, 1-59. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(06\)52001-7](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(06)52001-7)
- Brouillard, R., Chassaing, S., Isorez, G., Kueny-Stotz, M., & Figueiredo, P. (2010). The Visible Flavonoids or Anthocyanins: From Research to Applications, 2, 1-22. <https://doi.org/10.1002/9781444323375.ch1>
- Cascón, S. C. (1984). Corantes de Batata Doce Roxa para uso em alimentos. Embrapa, Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar – CTAA, Rio de Janeiro - Brasil. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/415639>
- Cevallos - Casals B.A. y Cisneros-Zevallos L. (2002). Bioactive and functional properties of purple sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) lam), *Acta Horticulturae*, 583, 195-203. [10.17660/ActaHortic.2002.583.22](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.583.22)
- Chang, Y.C., Huang, K.X., Huang, A.C., Ho, Y.C. & Wang, C.J. (2006). Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL - mediated

- macrophages apoptosis, Food and Chemical Toxicology, 44 (7), 1015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.12.006>
- Costa, N. M. B. y Rosa, C. O. B (2010). Alimentos Funcionais - Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos. 1ª ed.
- Fan, G., Yonbin, H., Zhenxin, G. & Deming, C. et al. (2008). Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). Lwt-Food Science and Technology, 41, 1412-1416. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.019>
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1 de Agosto de 2013). <http://faostat.fao.org/site/567>
- Francis, F.J. (1982). Analysis of anthocyanins in foods. In: Markakis P, Anthocyanins as Food Colors. New York, Academic Press, 181-207.
- Francis, F.J. (1989). Food colorants: Anthocyanins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.28. <https://doi.org/10.1080/10408398909527503>
- Fuleki, T; Francis, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries, Journal of Food Science, 33, 72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00887.x>
- Furuta, S., Suda, I., Nishiba, Y. & Yamakawa, O. (1998). High tert-butylperoxyl radical scavenging activities of sweet potato cultivars with purple flesh. Food Sci. Technol. Int. Tokyo, 4, 33-35. <https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.4.33>
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F. & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. Free Radical Biology & Medicine, 29 (11), 1106-1114. DOI: [10.1016/s0891-5849\(00\)00394-](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00394-)

4

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217–225.

[https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00221-8)

Giusti, M.M. & Wrolstad, R.E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *Protocols in Food Analytical Chemistry*, Unit F 1.2.

[DOI:10.1002/0471142913.faf0102s00](https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00)

Goda, Y., Shimizu, T., Kato, Y., Nakamura M., Maitani, T., Yamada, T., Terahara, N. & Yamagushi, M. (1997). Two acylated anthocyanins from purple sweet potato, *Phytochemistry*, 44, 183-186. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00533-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00533-X)

Guerrero, R. (2003). Estudio de la extracción de antocianinas del camote morado (*Ipomoea batatas* (L.) lam). Tesis Facultad de Ingeniería de Industrias de Alimentos de La Universidad Nacional de La Molina.

Halliwell, B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*, 47, 410 –418.

[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00097-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00097-3)

Hayashi, K., Ohara, N. & Tsukui, A. (1996). Stability of anthocyanins in various vegetables and fruits. *Food Sci. Technol, Int.* 2, 30-33.

<https://doi.org/10.3136/fsti9596t9798.2.30>

Jiao, Y., Jiang, Y., Weiwei, Z.W. & Yang, Z. (2012). Studies on antioxidant capacity of anthocyanin extract from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) lam), *African Journal of Biotechnology*, v.11, n.27, p.7046-7054. DOI: [10.5897/AJB11.3859](https://doi.org/10.5897/AJB11.3859)

- Jing, P. y Giusti, M. (2007). Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *Journal of Food Science*, v.72: C363-C368. DOI: [10.1111/j.1750-3841.2007.00441.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00441.x) International Potato Center.[CIP]. (27 junio de 2015). *Camote*. <https://cipotato.org/es/sweetpotato/>
- Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V.Z. & Schmidt, H. (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. v.187, p. 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.001>
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T. y Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, v.64, p.923-933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)
- Lapornik. B., Prosek, M. & Wondra, A.G. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time, *Journal of Food Engineering*, v.71, p.214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036>
- Lee, J., Durst, R.W. & Wrolstad, R.E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study, *Journal of AOAC International*, v.88, n.5, p.1269-1278. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.5.1269>
- Lim, S. (2012). Anthocyanin-enriched purple sweet potato for colon cancer prevention. Theses (Doctor of Philosophy) - Department of Human Nutrition. College of Human Ecology. Kansas State University. Manhattan, Kansas. <https://www.globethesis.com/?t=1451390008971015>

- Marco, P.H., Poppi, R.J. y Scarmínio, I.S. (2010). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais, *Quím. Nova*, v.31, p.1218-1223. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500051>
- Miyazaki, K., Makino, K., Iwadate, E., Deguchi, Y. y Ishikawa, F. (2008). Anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoea batatas* (L.) lam cultivar ayamurasaki suppress the development of atherosclerotic lesions and both enhancements of oxidative stress and soluble vascular cell adhesion molecule in Apolipoprotein E-deficient mice, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.23, p.11485-11492. DOI: [10.1021/jf801876n](https://doi.org/10.1021/jf801876n)
- Mohanraj, R. & Sivasankar, S. (2014). Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.- A Valuable Medicinal Food: A Review Department of Biotechnology, *Journal of Medicinal Food*, v. 17, n.7, p. 733–741. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2818>
- Monteiro, A.B., Massaroto, J.A., Gasparino, C.F., Silva, R.R., Gomes L.A.A., Maluf, W.R. & Santos, F.J.C. (2007). Silagens de cultivares e clones de batata doce para alimentação animal visando sustentabilidade da produção agrícola familiar, *Revista Brasileira de Agroecologia*, 2, 978 - 981. <https://revistas.aba-agroecologia.org.br/cad/article/view/2697/2353>
- Myers, R. M. D. (2016). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Willey, 4th ed.
- Neto, B. B., Scarmínio, I. S., y Bruns, R. E. (2010). *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*. Bookman Editora. https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/1372315/mod_resource/content/1/Como_fazer_e

[xperimentos.pdf](#)

- Ou, B., Hampsch - Woodill, M. & Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4619-4629. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Patil, G. (2009). Extraction, dealcoholization and concentration of anthocyanin from red radish. *Chemical Engineering and Processing*, v. 48, p. 364-369. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.05.006>
- Prior, R.L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Revilla, E., Ryan, J.M. y Martín-Ortega, G. J. (1998). Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes, *Agric. Food Chem.*, v.46, p.4592- 4597. <https://doi.org/10.1021/jf9804692>
- Ribeiro, S.M.R., Costa, N.M.B. y Peluzio, M.C.G. (2008). *Antioxidantes na dieta* (1^{era} ed.). Nutrição básica e Metabolismo. Viçosa: UFV, p. 235-260.
- Risso, R. (2014). *Etanol de batata-doce: otimização do pré-processamento da matéria-prima e da hidrólise enzimática*. [Tesis de Maestria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul]. Repositorio Institucional UFRGS. <http://hdl.handle.net/10183/97255>
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L., C., Pastore, G., Holanda, R. B. & Sousa, C. A. (2007). Atividade antioxidante de frutas do Cerrado, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 53-60. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000100010>

Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F. & Geronimo, I.M. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties, *Food Chemistry*, v.113, p.1133–1138.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.088>

Sánchez, C. (24 de enero de 2020). Referencias APA. Normas APA (7ma edición). <https://normas-apa.org/referencias/>

Scandalios, J.G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38 (7), 995-1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>

Scherer, R. y Godoy, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2,-diphenil-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, v.112, p.654-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>

Steed, L. E. y Truong, V. D. (2008). Anthocyanin content, antioxidant activity, and selected physical properties of flowable purple-fleshed sweetpotato purees. *Journal of Food Science*, v. 73, p. S215-S221. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00774.x>

Suda, I., Oki, T., Masuda, M., Kobayashi, M., Nishiba, Y., & Furuta, S. (2003). Physiological functionality of purple-fleshed sweetpotatoes containing anthocyanins and their utilization in foods. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 37, 167–173. <https://doi.org/10.6090/jarq.37.167>

Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X. y Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, *J Agric Food Chem.*, 50, 7449-54. <https://doi.org/10.1021/jf0207530>

- Teow, C. C. (2005). Antioxidant activity and bioactive compounds of sweet potatoes. [Theses of Master of Science, Faculty of North Carolina State University].
Repository Institutional NCSU.
<https://repository.lib.ncsu.edu/handle/1840.16/645>
- Truong, V.D., Mcfeeters, R.F., Thompson, R.T., Dean, L.L. & Shofran, B. (2007). Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars in the United States, Journal of Food Science, 72, C343- C349. DOI: [10.1111/j.1750-3841.2007.00415.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00415.x)
- Ugent, D. y Peterson, L. (1988). Circular, International Potato Center, 16 (3), 1-9. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN28852.pdf>
- Universidad Nacional Federico Villarreal. (20 de junio del 2022). *Guía para la presentación de trabajos de investigación*.
- Wang, J., Wu, G., Wang, Z., Shu, B., Li, L., Zhang, R. y Su, D. (2020). The influence of processing conditions on kinetics, anthocyanin profile and antioxidant activity of purple sweet potato subjected to hot air drying. Journal of Food Process Engineering, 43(9), e13472. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13472>
- Williams, M. y Hrazdina, G. (1979). Anthocyanins as food colorants - Effect of pH on formation of anthocyanin-rutin complexes. Journal of Food Science, 44, 66-68.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb10005.x>
- Woolfe, J.A. (1992). Sweet potato: an untapped food resource. Cambridge: Cambridge University Press, 643p.

- Wrolstad, R.E., Durst, R.W. y Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, *Food Science and Technology*, 16, 423-428.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M. & Haytowitz, D.B. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.
<https://doi.org/10.1021/jf049696w>
- Yi, L., Chen, C., Jin, X., Mi, M., Ling, W. & Zhang, T. (2010). Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low- density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity, *FEBS Letters*, 584(3), 583-590. DOI: [10.1016/j.febslet.2009.12.006](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.006)
- Yoshinaga, M., Yamakawa, O. & Nakatani, M. (1999). Genotypic diversity of anthocyanins content and composition in purple-fleshed sweetpotato. *Breeding Science*, 49, 43-47.
<https://doi.org/10.1270/jsbbs.49.43>
- Zhu, F., Cai, Y.Z., Yang, X., Ke J. & Corke, H. (2010). Anthocyanins hydroxyl cinnamic acid derivatives, and antioxidant activity in roots of different Chinese purple-fleshed sweet potato genotypes, *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 58, 7588-7596. <https://doi.org/10.1021/jf101867t>