

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**  
**ALBERTO CAZORLA TALLERI**



**“COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Lepidium meyenii* Walp. (maca): COMPARANDO  
PROCEDENCIAS Y COLORES DEL ÓRGANO DE RESERVA”**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADA EN QUÍMICA**

**AUTOR**

Naomi Fabiola Shimabuku Vega

**ASESORA**

M.Sc. Lily Chang Fang

**COASESOR**

Ph.D. Wilfredo Gonzáles Lozada

**LIMA, PERÚ**

**2017**

**JURADO CALIFICADOR**

**PRESIDENTE: PhD. Guillermo Santillán Zea**

**SECRETARIA: MSc. QF. Carolina Ponce de León de Lama**

**VOCAL: PhD. Francisco Peirano Blondet**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer inmensamente a mi familia por acompañarme siempre. Con este trabajo, culmino una etapa importante en mi vida y me siento feliz de haber contado en su cariño y apoyo.

Quiero agradecer al proyecto “Eco-fisiología de *Lepidium meyenii* Walp. (maca): influencia del estrés térmico, hídrico, la altitud y disposición del suelo sobre el desempeño de semillas procedentes de hipocótilos de diferente color” (109-2015-FONDECYT-DE-financiado por CONCYTEC-Ciencia Activa). En este contexto quiero agradecer especialmente a la Lic. María Claudia Janampa que junto al Dr. Wilfredo Gonzalez, propusieron, desarrollaron y sostuvieron dicho proyecto, en el cual realicé esta tesis. Del mismo modo, agradezco a los productores de maca: Sr. Arturo Cárdenas y Sr. Moisés Alderete, quienes donaron el material vegetal analizado en este estudio.

A la M.Sc. Lily Chang Fang, asesora de esta tesis, por el apoyo al momento de resolver mis dudas al momento de seguir las determinaciones analíticas. Del mismo modo, al Dr. Wilfredo Gonzáles Lozada, co-asesor, por la paciencia, apoyo incondicional y buen humor durante todo el proceso.

A la M.Sc. Graciela Untiveros y el M.Sc. León Villegas, respectivos jefa del Departamento de Química y jefe del Departamento de Farmacia, ambos de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por haberme permitido trabajar en las instalaciones de sus laboratorios. En especial a los técnicos de laboratorio Betsy Enríquez y Omhar Chávez por facilitar el acceso y préstamos de materiales.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos y compañeros: Damariz Diaz, Mayvi Pablo, Margot Rojas y Robert Rojas, quienes me ayudaron en el desarrollo de la parte experimental de este estudio.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AA:	Hipocótilos amarillos de Achipampa
AM:	Hipocótilos morados de Achipampa
AN:	Hipocótilos negros de Achipampa
JA:	Hipocótilos amarillos de Junín
JM:	Hipocótilos morados de Junín
JN:	Hipocótilos negros de Junín
JR:	Hipocótilos rojos de Junín
NA:	Hipocótilos amarillos de Ninacaca
NM:	Hipocótilos morados de Ninacaca
NN:	Hipocótilos negros de Ninacaca
NR:	Hipocótilos rojos de Ninacaca
°C:	Grados celcius
ANOVA:	Análisis de varianza
AOAC:	Association of Official Analytical Chemists
APG:	Grupo filogenético de angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group)
CE:	Conductividad eléctrica
F:	Estadístico F
GL:	Grados de libertad
LID:	Laboratorios de investigación y desarrollo
LSD:	Mínima diferencia estadística (Least statistical difference)
MANOVA:	Análisis multivariante de varianza
MO:	Materia orgánica
MS:	Suma de cuadrados
m.s.n.m:	Metros sobre el nivel del mar
P:	Valor P
PA:	Grado reactivo analítico
PCA:	Análisis de componentes principales
PC:	Componente principal
Rf:	Relación entre la distancia recorrida por la muestra y por el solvente
UNALM:	Universidad Nacional Agraria La Molina
UPCH:	Universidad Peruana Cayetano Heredia

## RESUMEN

La composición química de las plantas es afectada por factores genéticos y ambientales. La herbácea endémica *Lepidium meyenii* Walpers (maca), es cultivada en zonas altoandinas. El órgano subterráneo de reserva (hipocótilo), posee notables propiedades nutricionales y estudios previos han reportado que las propiedades medicinales variarían asociadas al color del hipocótilo. Si bien la composición química del hipocótilo puede ser afectada por su color o su procedencia, pocos estudios han comparado simultáneamente el efecto de ambos factores. En este trabajo se realizó el análisis proximal y la determinación de metabolitos secundarios de hipocótilos amarillos, morados y negros de 3 zonas: Achipampa (4066 msnm), Junín y Ninacaca (zonas altas – 4507 msnm y 4495 msnm respectivamente). Además, se colectaron hipocótilos rojos de las dos zonas altas. El análisis proximal abarcó el análisis de humedad, proteínas, grasas, carbohidratos totales, fibra, cenizas; además de la cuantificación de hierro, fósforo y calcio. La determinación de metabolitos se realizó para: compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, esteroides, quinonas, saponinas y alcaloides. Encontramos diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en casi todas las variables del análisis proximal entre procedencia (excepto grasas) y colores del hipocótilo (excepto carbohidratos y fósforo), siendo las diferencias por zonas más relevantes que por colores. A nivel de procedencias, Ninacaca tuvo el porcentaje más alto de proteína y carbohidratos totales pero más bajos de hierro y calcio, mientras que Achipampa mostró el mayor contenido de hierro pero los menores contenidos de fósforo. En relación con las características fisicoquímicas del suelo, se encontró que hay asociación entre el fósforo disponible, pH y contenido de calcio con las procedencias estudiadas. En cuanto a los metabolitos secundarios, en todas las accesiones se determinó la presencia de compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides; así como la ausencia de: taninos, quinonas y saponinas. Asimismo, se encontraron flavonoides solo en hipocótilos morados y rojos. En la cromatografía en papel de antocianinas se encontró que los pigmentos de hipocótilos morados y rojos no son los mismos y, finalmente, se encontró que existen indicios de que la pigmentación de hipocótilos morados es similar entre Junín y Ninacaca, pero difiere con Achipampa.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	5
III.	GENERALIDADES SOBRE <i>L. meyenii</i> .....	6
	1. Clasificación taxonómica según Grupo de Filogenia de Angiospermas (APG) .....	6
	2. Descripción general .....	6
	3. Composición química.....	7
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
	1. Material biológico .....	14
	1.1. Descripción del área de colecta de los hipocótilos.....	14
	1.2. Colecta de material biológico.....	15
	1.3. Selección de muestras biológicas .....	15
	1.4. Medición de características generales .....	16
	1.5. Preparación de las muestras para los análisis químicos .....	16
	2. Análisis proximal.....	17
	1.1. Descripción general del proceso.....	17
	1.2. Determinación de humedad.....	18
	1.3. Determinación de proteínas.....	18
	1.4. Determinación de grasas totales .....	19
	1.5. Preparación de muestras desengrasadas para la determinación de fibra bruta y carbohidratos totales .....	19
	1.6. Determinación de fibra bruta.....	19
	1.7. Determinación de carbohidratos totales .....	20
	1.8. Determinación de cenizas.....	21
	1.9. Preparación de muestra de cenizas para el análisis de hierro, fósforo y calcio.....	21
	1.10. Determinación de hierro .....	21
	1.11. Determinación de fósforo .....	22
	1.12. Determinación de calcio .....	23
	3. Análisis de suelos .....	23
	4. Determinación de metabolitos secundarios .....	23
	5. Cromatografía de papel para antocianinas .....	25

6. Tratamiento de datos .....	26
V. RESULTADOS .....	27
1. Características generales .....	27
2. Análisis proximal.....	27
3. Análisis de suelos .....	29
4. Determinación de metabolitos secundarios .....	29
5. Cromatografía de papel de antocianinas.....	29
VI. DISCUSIÓN.....	30
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	34
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	35
IX. ANEXOS .....	41
X. ÍNDICE DE FIGURAS .....	72
XI. ÍNDICE DE TABLAS.....	74

## I. INTRODUCCIÓN

Dentro de la química de las plantas, se distinguen dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios cumplen funciones vitales relacionadas con la supervivencia, crecimiento o la reproducción de las plantas, y están presentes en todas las plantas en diferentes proporciones. En esta categoría caben principalmente los carbohidratos, proteínas y lípidos (Rogg, 2000). Paralelamente, encontramos los metabolitos secundarios cuya presencia no es esencial para la planta, cumplen funciones asociadas a la defensa contra factores ambientales (alta radiación, bajas temperaturas, herbivoría, parásitos), o son atrayentes de polinizadores. Los metabolitos secundarios se caracterizan por poseer una gran heterogeneidad química debido a que las plantas los sintetizan por diversas vías metabólicas. Los olores, sabores, colores y otras características específicas y peculiares son consecuencia del metabolismo secundario (Anaya et. al., 2001). Si bien no se conoce toda la gama de metabolitos secundarios presentes en todas las plantas, se sabe que su diversidad es restringida; es decir, determinados grupos de metabolitos secundarios se encuentran asociados a determinadas familias vegetales, y que su presencia y concentración es dependiente de factores genéticos y/o ambientales (Stephen, 2002).

La concentración y composición química de las plantas pueden ser afectadas por factores genéticos y/o ambientales. Factores ambientales como: temperatura, radiación, la presencia de otras plantas, animales y microorganismos, así como las características del suelo, modulan la respuesta de la planta (Lu Qi Huang, 2013). Por ejemplo, se sabe que el aminoácido L- $\alpha$ -prolina es sintetizado en respuesta al frío para evitar el congelamiento del tejido celular (Fedotova, 2016). Del mismo modo, la conductividad eléctrica del suelo se correlaciona con el contenido de polifenoles, taninos y saponinas (Santocoloma-Varón, 2010). Por otro lado, las variaciones genéticas dentro de una misma especie pueden explicar diferencias en la composición química. La carga genética puede regular la expresión de genes que determinan el color, forma o también otorgar mayor resistencia al clima, o favorecer características que los haga más resistentes al ambiente (Ashton, 2013). Dentro de la familia de las Brassicaceae, la diversidad de la composición de glucosinolatos, un metabolito propio de esta familia, está basada en variaciones genéticas (Ishida et. al., 2014), mientras se conoce que en *Dahlia variabilis*, hay factores genéticos modulando el color de pétalo de las flores (Bate-Smith, 1948).



El suelo es el ambiente donde las plantas se desarrollan desde que son semillas, y su composición tiene repercusiones en la composición química de la planta. Aspectos como la presencia de fertilizantes, acidez del suelo, minerales, disponibilidad de agua, entre otros, son esenciales para el desarrollo de las plantas (Benton, 1970). Por ejemplo, un exceso de nitrógeno en el suelo produce un aumento en las sustancias proteicas de las raíces (Montaldo, 1991), así como valores de pH más altos podrían disminuir la disponibilidad de hierro (Delgado et al., 2008)

*Lepidium meyenii* Walpers, comúnmente conocido como “maca”, es una planta endémica peruana que se cultiva en los Andes Centrales entre los 3500 y 4500 m.s.n.m. En estas zonas las condiciones ambientales son adversas debido a las bajas temperaturas, ocurrencia de heladas y alta radiación UV, lo que restringe el crecimiento de la vegetación, siendo el cultivo de especies alimenticias o de valor comercial muy limitado (Quiros, 1997; Rea, 1994). La parte aprovechable del cultivo de *L. meyenii* es su órgano de reserva (llamado hipocótilo), y es uno de los pocos cultivos importantes en estas zonas alto-andinas. Esto hace que *L. meyenii* sea un cultivo estratégico para los pobladores, ya que su comercialización representa un ingreso económico. Diversos estudios evidencian que el consumo de maca genera un impacto positivo en la salud de las personas, razón por la cual el interés comercial de esta especie ha ido aumentando progresivamente (González, 2006).

El otro cultivo emblemático en las zonas de Junín-Pasco es *Solanum tuberosum* (papa); no obstante, las propiedades nutricionales de esta son menores en comparación a *L. meyenii*. Por ejemplo, posee un valor proteico relativamente alto (11.80%) en comparación a *Solanum tuberosum* (papa), cuyo contenido proteico es 8.20%. Del mismo modo, también posee un mayor contenido de hierro (14.70%) y calcio (247.00 mg%) en relación a la papa, cuyo valor se encuentra alrededor de 4.5 mg% y 47 mg% respectivamente (Instituto Nacional de Salud, 2009). En este sentido, es necesario resaltar la importancia del consumo de *L. meyenii* (sin tomar en cuenta los colores de hipocótilos) como alimento.

Perú es reconocido mundialmente como el primer exportador de *L. meyenii*. En el año 2015, las exportaciones de harina de maca ascendieron a 1411 toneladas (valorizadas en US\$ 26.8 millones). Durante este mismo año, se registró una producción de 58 mil

toneladas, 173% más respecto al año 2014 y 235% más respecto al año 2011. Las principales zonas de producción son Pasco, Junín y Huancavelica, mostrando la capacidad de la sierra peruana como productora de fuentes de alimentos de alta calidad y con potencial para generar valor para el país (MINAGRI, 2016).

Los hipótilos de *L. meyenii* muestran diversos colores que varían principalmente entre amarillo, rojo, morado, negro, negro con rojo, plomo, entre otros. (Zhang, 2015; Aliaga, 1999; Tello et al., 1992). Algunas investigaciones han mostrado que los colores de hipocótilo están asociados a distintas propiedades medicinales. Por ejemplo, la maca negra tendría mejores efectos benéficos en el proceso de aprendizaje e incremento en la carga espermática en ratones (González et al., 2006; Rubio, 2006), y las variedades roja y negra presentan efectos sobre la osteoporosis (González, 2014). Como consecuencia, la coloración del hipocótilo ha influenciado su valor económico, siendo el hipocótilo negro más costoso en el mercado.

En este contexto, se desarrolla un interés por indagar si realmente la composición química de *L. meyenii* es completamente consecuencia de los colores del hipocótilo. Si bien el color del hipocotilo se asocia a diferentes propiedades biológicas (propias de los metabolitos secundarios), poco se ha indagado si la procedencia del cultivo está afectando la composición nutricional (relacionada a metabolitos primarios) y/o los metabolitos secundarios.

Por otra parte, dentro de estos metabolitos secundarios en la familia de Brassicaceae destacan las antocianinas, compuestos asociados a la pigmentación de sus tejidos (hojas, tallos, flores, órganos de reserva, etc.), y que funcionan como indicadores de pH, presentando distintas formas coloreadas dependiendo de la acidez del medio en que se encuentran. El ejemplo más notable de estos es la col morada (Einbond, 2004). Se sabe que las antocianinas están involucradas en la protección frente a la fotoinhibición y radiación UVB (Schmidt, et. al., 2011); además, poseen propiedades antioxidantes (Wallace, 2014). Hasta el momento, no hay ningún reporte acerca de antocianinas o pigmentación en *L. meyenii*.

Hay diversos estudios que indagan sobre las diferencias en la composición química de *L. meyenii* asociado al color del hipocótilo pero enfocados en el material cosechado de un sola zona de producción (Meissner, 2015). Así también, otros estudios comparan

las características químicas de los hipocótilos entre diferentes zonas productoras pero enfocados en los hipocótilo de un mismo color (principalmente amarillos; Meissner, 2016). No obstante, hay escasos estudios que comparen la composición química de los hipocótilos evaluando simultáneamente entre diferentes colores producidos en las mismas zonas de cultivo y a la vez entre diferentes zonas cultivadas (Zhao, 2012). Se ha reportado, por ejemplo, que en hipocótilos cosechados en China, la región de cultivo y el color de hipocótilo afectan los contenidos de proteínas, fibra, bencilglucosinolatos y alcaloides totales (Cheng, 2017).

En el presente trabajo se evaluarán la composición química de hipocótilos de *L. meyenii* de varios colores (amarillo, morado, negro y rojo) cultivados en 3 diferentes zonas de producción.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La composición química de hipocótilos de *Lepidium meyenii* serán afectados por el color y procedencia de los mismos, siendo este último factor más influyente debido a la asociación de las características de la procedencia con la composición química del hipocótilo.

### **Objetivo general**

Relacionar la composición química de hipocótilos de *L. meyenii* tomando como factores la procedencia y el color de los mismos.

### **Objetivos específicos**

- i. Realizar el análisis proximal de hipocótilos de *L. meyenii* Walp.
- ii. Realizar la determinación de metabolitos secundarios de hipocótilos de *L. meyenii* Walp.
- iii. Analizar las características de los suelos en donde fueron cultivados los hipocótilos.
- iv. Relacionar los parámetros químicos evaluados en hipocótilos y las características de las procedencias y colores de hipocótilos.

### III. GENERALIDADES SOBRE *L. meyenii*

#### 1. Clasificación taxonómica según Grupo de Filogenia de Angiospermas (APG) IV (2016)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnolipsida
Orden:	Brassicales
Familia:	Brassicaceae
Género:	<i>Lepidium</i>
Especie:	<u><i>Lepidium meyenii</i> Walp.</u>
Nombre común:	maca, ginseng peruano

#### 2. Descripción general

*L. meyenii* es una planta bienal (Quiros et. al., 1996) que posee hojas alternadas y basales en forma de roseta, donde se van formando nuevas hojas de forma constante. El órgano de reserva, engrosado y subterráneo, es la parte comestible y se denomina “hipocótilo”, refiriéndose a la región entre la raíz y la parte aérea de la planta (Marín-Bravo, 2003). El hipocótilo puede presentarse en diversas formas (cónicas o esféricas, por ejemplo) y colores que incluyen el blanco, amarillo, plomo, negro, rojo y morado (Aliaga, 1999; Tello et al., 1992).

Siendo una planta bienal, el primer año es invertido en el desarrollo vegetativo de la planta. Es decir, se forman y crecen hojas durante 6 a 8 meses, al mismo tiempo que engrosa el hipocótilo. En el segundo año, florece y esparce las semillas (Tello et al. 1992), que se producen por aproximadamente 2 meses. Una planta produce más de 30,000 semillas, notándose que 1000 semillas pesan aproximadamente 0.6 g (Aliaga 1995).

Actualmente, la zona productora de maca se focaliza en las regiones de Junín y Pasco, en la Meseta del Bombón, en los distritos de Junín, Carhuamayo, Óndores y San Pedro de Cajas; así como en los distritos de Ninacaca, Vicco y Huayllay a una altitud de 3500 – 4500 m.s.n.m. (Arbizu et. al., 1991; Aliaga et. al., 2011)

La cosecha de hipocótilos se realiza normalmente entre mayo a julio (entre 7 a 9 meses) después de la siembra. Durante este período, el hipocótilo alcanza su máximo diámetro. De forma general, en el tratamiento posterior a la cosecha las hojas son a veces separadas del hipocótilo y éstos son dejados al sol para que sequen. Posteriormente se almacenan y comercializan. (Dostert, 2009).

### 3. Composición química

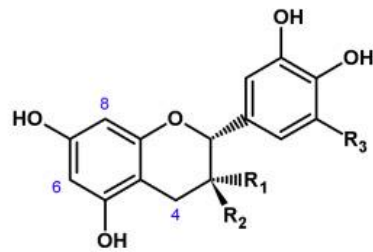
Diversos autores han indagado sobre la composición nutricional en base a 100 g de material seco (Tabla 1).

**Tabla 1:** Análisis proximal en 100 g de material seco de *L. meyenii*.

	<b>Dini, 1994</b>	<b>Vílchez, 2012</b>	<b>Castaño- Corredor, 2008</b>	<b>García et. al., 2009</b>
Proteína (g)	10.20	14.61	8.87 - 11.60	-
Lípidos (g)	2.20	0.90	1.09 - 2.20	-
Fibra (g)	8.50	5.85	8.23 - 9.08	-
Carbohidratos (g)	59.00	69.53	54.60 - 60.00	-
Cenizas (g)	4.90	4.97	4.90 - 5.00	-
Hierro (mg)	16.60	-	-	14.70
Fósforo (mg)	-	-	-	183.00
Calcio (mg)	150.00	-	-	247.00
Manganeso (mg)	0.80	-	-	-
Cobre (mg)	5.90	-	-	-
Zinc (mg)	3.80	-	-	-
Sodio (mg)	18.70	-	-	-
Potasio (mg)	2050.00	-	-	-

-: No reportado

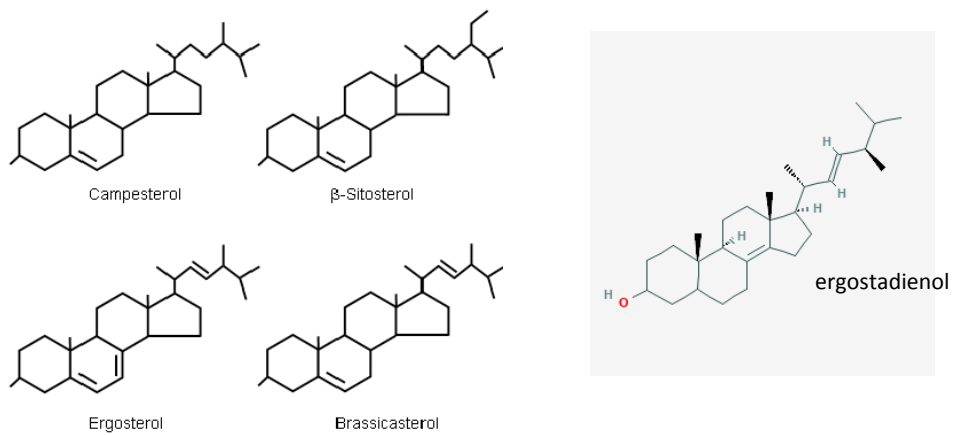
En cuanto a metabolitos secundarios, se ha reportado en hipocótilos rojos la presencia de: alcaloides, esteroides, saponinas y glucósidos cardíacos; así como la ausencia de flavonoides, antraquinonas, lactonas, cumarinas, cardenólidos (González et. al., 2005) y flavonoides (Yllescas, 1994). También se ha reportado la presencia de los siguientes flavanoles en extracto acuoso: catechin, epicatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin, epigallocatechin gallate (Fig. 1). Estos le dan la habilidad de proveer protección citotóxica a las células en condiciones de estrés oxidativo (Ruijters et. al., 2013).



$R_1=OH, R_2, R_3=H$ ; Epicatechin  
 $R_1, R_3=H, R_2=OH$ , Catechin  
 $R_1=gallic\ acid\ ester, R_2, R_3=H$ ; Epicatechin gallate  
 $R_1=gallic\ acid\ ester, R_2=H, R_3=OH$ ; Epigallocatechin gallate

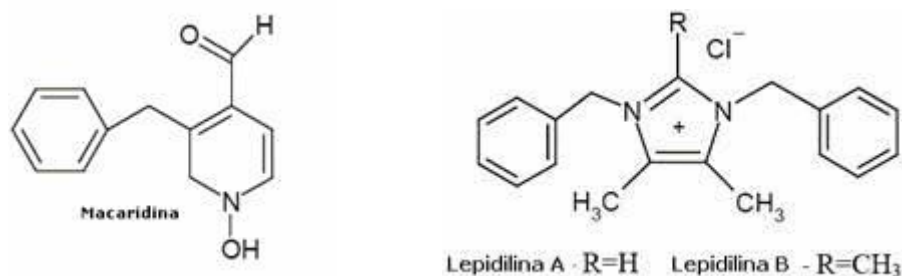
**Figura 1.** Estructura general de flavanoles y algunos sustituyentes

En cuanto a los esteroides, se han reportado los siguientes fitoesteroles en *L. meyenii*:  $\beta$ -sitoesterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, ergostadienol (Fig. 2) (Dini, 1994).



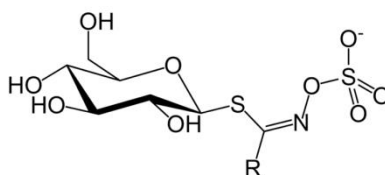
**Figura 2.** Estructuras de esteroides reportados en *L. meyenii*

En cuanto a los alcaloides, se ha reportado la presencia de (1R, 3S)-1-methyltetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (Piacente, 2002); 1,3-dibenzyl-4,5-dimethylimidazolium chloride (Lepidilina A); 1,3-dibenzyl-2,4,5-trimethylimidazolium chloride (Lepidilina B) (Boaling et. al., 2003) y un derivado bencilado de 1,2-dihidro-N-hidroxipiridina (macaridina) (Fig. 3) (Muhammad et. al., 2001).



**Figura 3.** Alcaloides reportados en *L. meyenii*

Los hipocótilos de *L. meyenii* poseen una variedad de glucosinolatos (Fig. 4), una familia de metabolitos secundarios al cual se le relacionan los efectos medicinales (Mc. Collon et. al., 2005).


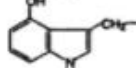
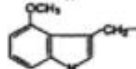
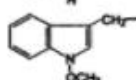

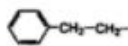
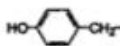


**Figura 4.** Estructura general de glucosinolatos

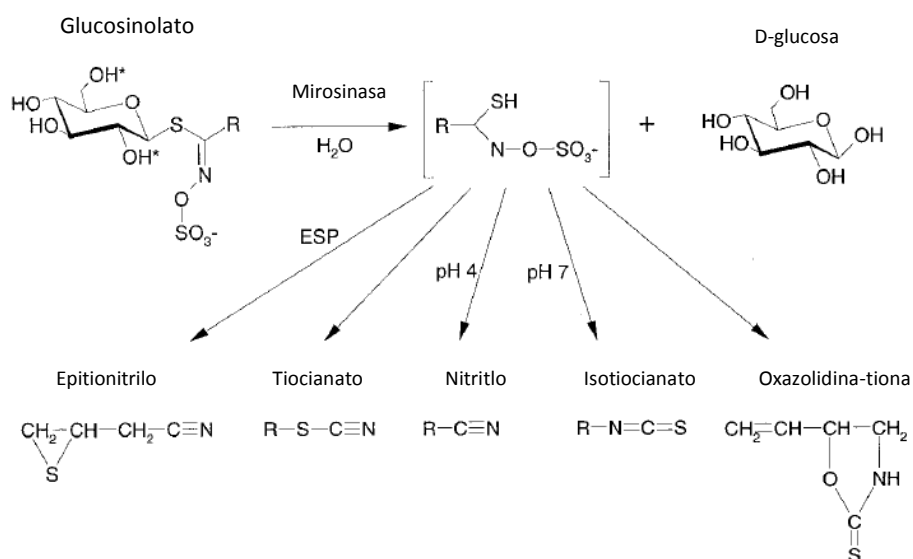
El sustituyente R puede ser de diversas naturalezas, como se muestra en la Tabla 2 (Honju, 1999)..



**Tabla 2.** Ejemplos de sustituyentes R en glucosinolatos (Honju, 1999).

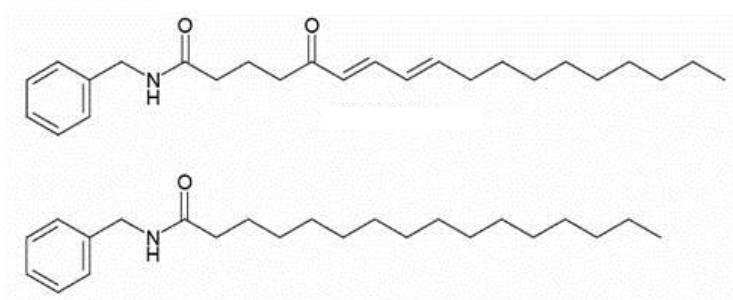
<b><u>Alkenyl glucosinolates</u></b>			
Sinigrin	2-Propenyl-	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-$	SIN
Gluconapin	3-Butenyl-	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	NAP
Gluco brassicanapin	4-Pentenyl-	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	GBN
Progoitrin	2-Hydroxy-3-butenyl-	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$	PRO
Gluconapoleiferin	2-Hydroxy-4-pentenyl-	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$	GNL
<b><u>Indolyl glucosinolates</u></b>			
Gluco brassicin	3-Indolylmethyl-		GBC
4-Hydroxygluco brassicin	4-Hydroxy-3-indolylmethyl-		4OH
4-Methoxygluco brassicin	4-Methoxy-3-indolylmethyl-		4ME
Neogluco brassicin	1-Methoxy-3-indolylmethyl-		NEO
<b><u>Aromatic glucosinolates</u></b>			
Gluco tropaeolin	Benzyl-		TRO
Gluco nasturtiin	2-Phenylethyl-		NAS
Sinalbin	p-Hydroxybenzyl-		SNA
<b><u>Glucosinolates with sulfur-containing rests</u></b>			
Glucoiberberin	3-Methylthiopropyl-	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-$	IBV
Glucoerucin	4-Methylthiobutyl-	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-$	ERU
Glucoiberin	3-Methylsulfinylpropyl-	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-$	IBE
Gluco raphanin	4-Methylsulfinylbutyl-	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-$	RAA
Gluco raphenin	4-Methylsulfinyl-3-butenyl-	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	RAE
Glucoalyssin	5-Methylsulfinylpentyl-	$\text{CH}_3-\text{SO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_4-$	ALY

Estudios previos muestran que el contenido de glucosinatos varía dependiendo de la edad de la planta y color de hipocótilo, habiéndose identificado los siguientes compuestos: 5-Methylsulfinylpentyl glucosinolate (Glucoalyssin), 4-Hydroxybenzyl glucosinolate (Glucosinalbin), Benzyl glucosinolate (Glucotropaeolin), 3-Methoxybenzyl glucosinolate (Glucolimnanthin), 4-Hydroxy-3-indolylmethyl glucosinolate (4-Hydroxyglucobrassicin Indolyl) y 4-Methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate (Yábar, 2011). El contenido de estos es menor en hipocótilos secos y productos procesados, en comparación a tejidos frescos debido a que son hidrolizados por la enzima mirosinasa cuando se presenta daño celular (Sifuentes-Penagos, 2015). Como consecuencia, se pueden degradar en tiocianatos, nitrilos e isotiocianatos, los cuales pueden percibirse por el olor fuerte proveniente de hipocótilos de *L. meyenii* (Honju, 1999).. (Fig. 5).



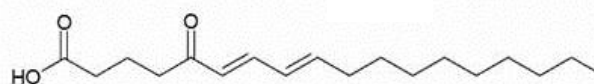
**Figura 5.** Productos de degradación de glucosinatos (Honju, 1999).

La descomposición de los glucosinolatos se asocia a la producción de macamidas y macaenos, compuestos exclusivos de *L. meyenii* (Esparza et. al., 2015) cuya composición porcentual varía entre 0.06% - 0.52% y 0.09 - 0.45%, respectivamente. Las macamidas son amidas secundarias constituidas por una bencilamina con un sustituyente de ácido graso (Fig. 6).



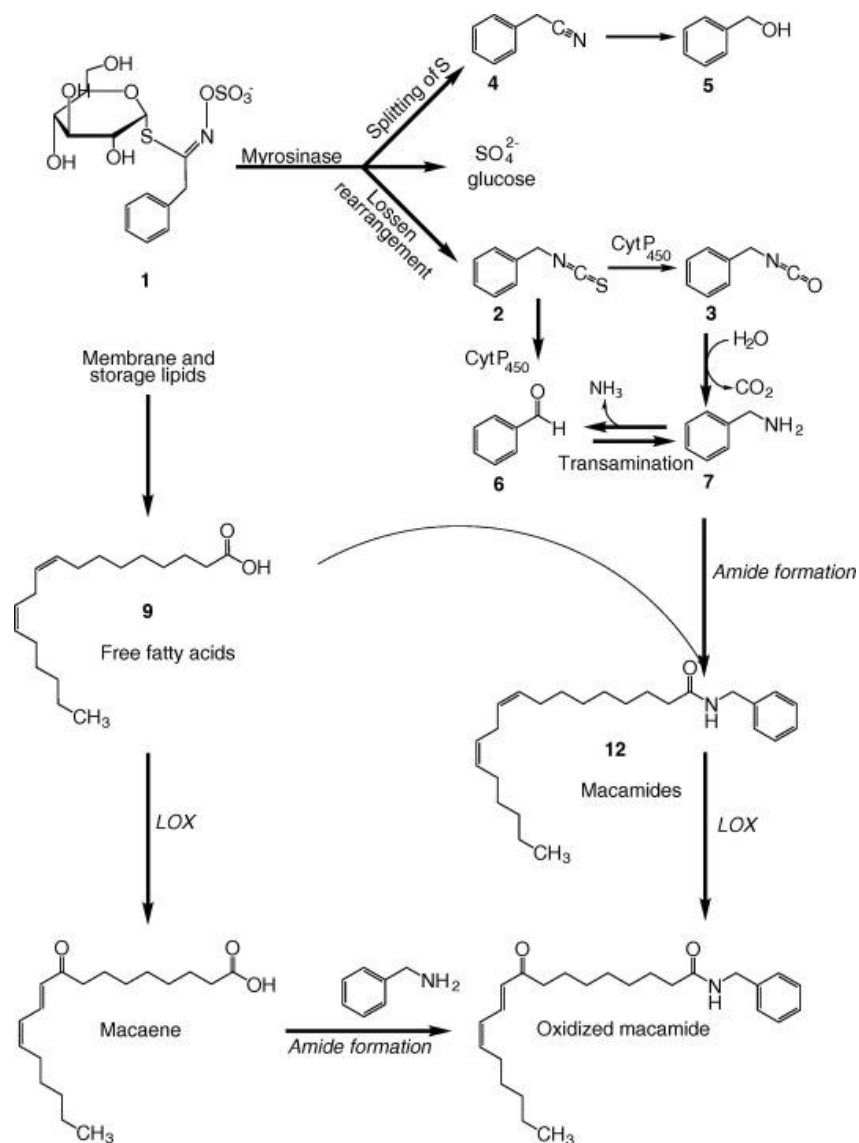
**Figura 6.** Macamidas reportadas en *L. meyenii*

Los macaenos son ácidos grasos insaturados que usualmente aparecen en estructuras de macamidas (Fig. 7).



**Figura 7.** Macaeno reportado en *L. meyenii*

Sobre la relación entre glucosinolatos, macamidas y macaenos, se ha propuesto el siguiente esquema biosintético para tejidos de *L. meyenii* (Fig. 8) (Esparza et. al., 2015)



**Figura 8.** Esquema propuesto para la biosíntesis de macamidas y macaenos a partir de glucosinolatos

Algunas propiedades afrodisíacas son relacionadas a la presencia de los compuestos mencionados anteriormente, usándose como marcadores químicos de calidad en productos derivados (Melnikovova et. al., 2012) de exportación, tales como cápsulas, harina, licor y extractos (González, 2009).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material biológico

#### 1.1. Descripción del área de colecta de los hipocótilos

Se colectaron hipocótilos de *L. meyenii* de productores de localidades ubicadas en las regiones de Junín y Pasco. El material colectado fue sembrado, cosechado y donado por dos productores: los señores Arturo Cárdenas Condori y Moisés Alderete Yali. El material del señor Arturo Cárdenas pertenece a la zona baja (Achipampa) y fue sembrado en octubre 2015; mientras que el material del señor Moisés Alderete pertenece a la zona alta (Ninacaca y Junín) y fue sembrado en noviembre 2015 (Tabla 3, Fig. 17). La cosecha de todos los hipocótilos se realizó durante Julio 2016.

**Tabla 3:** Descripción del área de estudio por distrito y localización

Productor	Departamento	Provincia	Distrito	Coordenada S	Coordenada W	Altitud (msnm)
Arturo Cárdenas Condori	Junín	Chupaca	Yanacancha (Achipampa)	12°09.702'	75°21.836'	4066
Moisés Alderete Yali	Pasco	Pasco	Ninacaca	10°47.517'	76°05.348'	4507
	Junín	Junín	Junín	11°12.042'	76°05.465'	4495

#### 1.2. Colecta del material biológico

Posterior a la cosecha, cada productor separó sus hipocótilos por colores según una distinción visual, cuyo criterio quedó a elección de cada uno. El material cosechado por el productor Arturo Cárdenas (zona baja) comprende los hipocótilos de 3 colores: amarillo, morado y negro; mientras que el material cosechado por el productor Moisés Alderete (zona alta) comprende hipocótilos de 4 colores: amarillo, morado, negro y rojo. En total se colectaron hipocótilos de 11 accesiones (Tabla 4) El productor Arturo Cárdenas no entregó hipocótilos rojos.

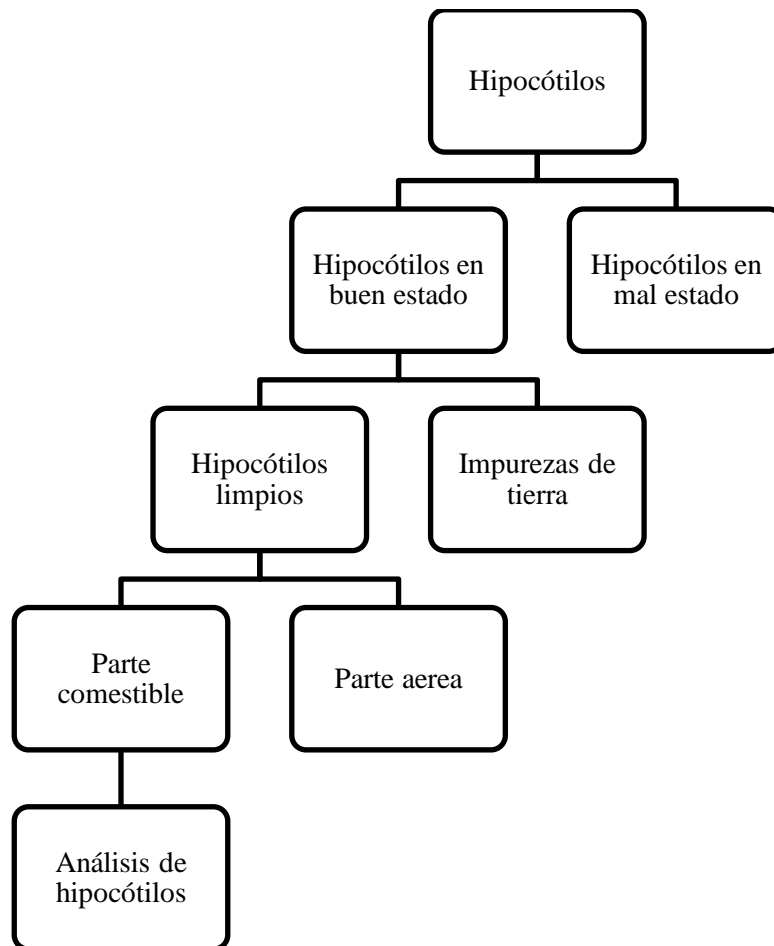
**Tabla 4:** Lista de accesiones utilizadas en el análisis químico de hipocótilos de *L. meyenii*

<b>Productor</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Color de hipocótilo</b>	<b>Accesión</b>
Arturo Cárdenas	Achipampa (A)	Amarillo (A)	AA
		Negro (N)	AN
		Morado (M)	AM
Moisés Alderete	Junín (J)	Amarillo (A)	JA
		Morado (M)	JM
		Negro (N)	JN
		Rojo (R)	JR
	Ninacaca (N)	Amarillo (A)	NA
		Morado (M)	NM
		Negro (N)	NN
	Rojo (R)	NR	

Por cada accesión, se recibieron aproximadamente 5 kg de hipocótilos. Estos fueron separados en bolsas rafia, almacenadas en contenedores herméticos rodeados con geles de hielo y trasladadas a las instalaciones de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (en un lapso no mayor a 12 horas), donde fueron almacenados en un ambiente a  $-15^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

### 1.3. Selección de muestras biológicas

Por cada accesión se tomó aproximadamente 1 kg de hipocótilos al azar. Estos fueron examinados y se descartaron los que estaban en mal estado (podridos, que presentaban tejido muerto y/o estaban mordidos). El material que estaba en buen estado fue lavado con agua potable para remover impurezas de campo, luego enjuagado con agua destilada y secado con papel absorbente. Seguidamente, la parte aérea de cada hipocótilo fue cortada y desechada, quedando solo la parte comestible. A partir de este material se comenzaron a hacer los análisis (Fig. 9).



**Figura 9.** Proceso de selección y preparación de los hipocótilos

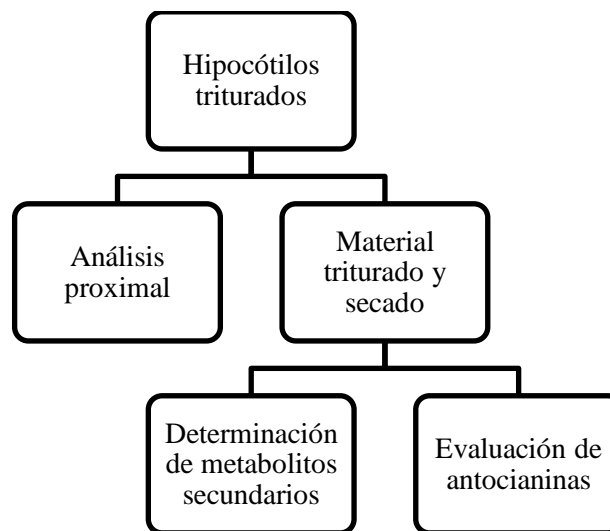
#### **1.4. Medición de características generales**

De cada accesión, se tomaron 10 hipocótilos por el método de cuarteo (Gallego et al., 2015). Para cada hipocótilo se midió el peso fresco usando una balanza analítica. Seguidamente, se anotó las características generales de forma y color según accesión.

#### **1.5. Preparación de las muestras para los análisis químicos**

Los hipocótilos fueron cortados en trozos y triturados usando un procesador de alimentos marca IMACO FP600. Estos fueron almacenados en bolsas herméticas y trasladados al Laboratorio de Química (Departamento de Ciencias Exactas – Sección Química, UPCH), donde fueron guardados a -20°C hasta el momento de su uso.

De los hipocótilos triturados, se separó aproximadamente 300 g para el análisis proximal. El material restante fue secado a 42°C durante 48h en una estufa de control automático, molido en el procesador de alimentos y almacenado en bolsas herméticas a -20°C. Dicho material fue destinado para el análisis de metabolitos secundarios y el análisis de antocianinas. (Fig. 10).



**Figura 10.** Distribución de la muestra biológica para los análisis químicos

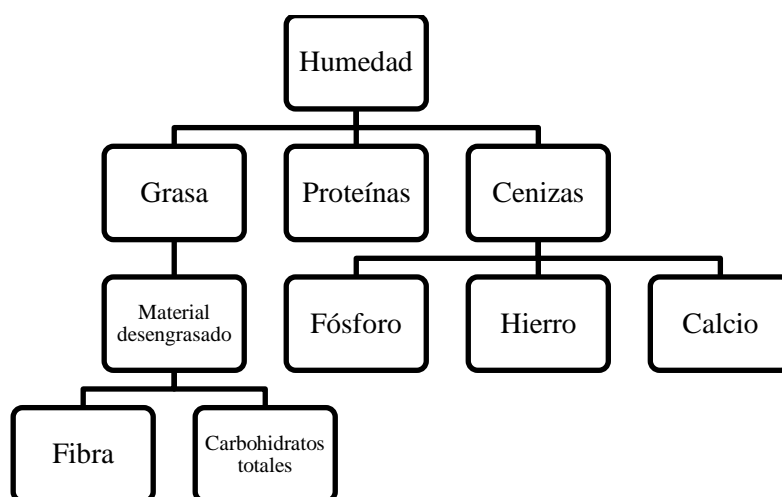
## 2. Análisis proximal

Los reactivos, instrumentos, equipos y procedimientos empleados en el análisis proximal son descritos detalladamente en el ANEXO 3.

### 2.1. Descripción general del proceso

Del material triturado húmedo, se separaron 10 muestras para realizar el análisis de humedad. Seguidamente, las 10 muestras secas fueron molidas en mortero y separadas en 3 grupos: 3 para proteínas, 3 para grasas y 3 para cenizas. Las muestras fueron almacenadas en bolsas herméticas a -20°C hasta el momento de su uso. Las muestras desengrasadas fueron molidas y empleadas para determinar el contenido de fibras y carbohidratos totales. Por otro lado, las cenizas se usaron para determinar los valores de fósforo, hierro y calcio (Fig. 11).





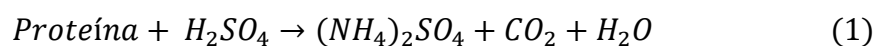
**Figura 11.** Procedimiento general del análisis proximal

## 2.2. Determinación de humedad

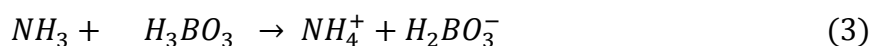
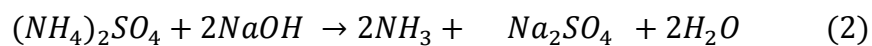
La humedad fue determinada según el método descrito por Piacente et al. (2002). La muestra se calentó a 40°C en una estufa y la pérdida de peso se utilizó para calcular el contenido de agua de la misma. Se calculó el contenido de agua en base a materia fresca. Se prefirió emplear esta metodología en lugar de descrita por la AOAC debido a que los hipocótilos secados a 60°C o más se quemaban y mostraban un evidente deterioro.

## 2.3. Determinación de proteínas

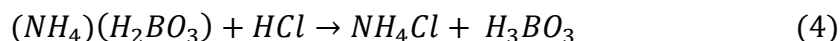
Las proteínas fueron determinadas según el método normalizado de la AOAC 2001.11 (2001) para proteínas en alimentos. El nitrógeno proteico es digerido y convertido a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . (1)



El sulfato de amonio es tratado con una base fuerte, formándose amoníaco (2), el cual es destilado y capturado en ácido bórico (3).



La titulación volumétrica con ácido clorhídrico, previamente estandarizado, comprende la siguiente reacción (4):



Se calcula el contenido de nitrógeno y se utiliza 6.25 como factor para la conversión de nitrógeno a proteína.

#### **2.4. Determinación de grasas totales**

Las grasas totales fueron determinadas según el método normalizado de la AOAC 7.056 (1980) para grasas en alimentos. Las grasas son extraídas en éter etílico por extracción continua empleando un equipo de Soxhlet durante un mínimo de 4 horas. Se calcula la ganancia de peso en el balón que contiene el extracto etéreo. Se calcula el contenido de grasas en base a materia seca. El análisis se hizo por triplicado.

#### **2.5. Preparación de las muestras desengrasadas para la determinación de fibra bruta y carbohidratos totales**

Cada muestra desengrasada fue molida con mortero hasta que las partículas atravesaran una malla Tyler 30. Al menos 2 g de este material fue destinado al análisis de fibras. Por otra parte, se molió 1 g de muestra desengrasada hasta que atravesara una malla Tyler 40. Esta porción de la muestra fue guardada para la determinación de carbohidratos totales.

#### **2.6. Determinación de fibra bruta**

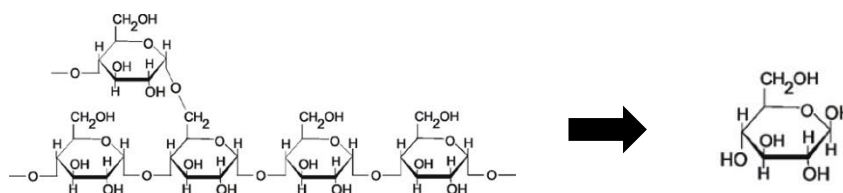
La fibra bruta fue determinada usando el método normalizado por la AOAC 7.061 (1980) para fibra vegetal en alimentos. La muestra, previamente desengrasada, es hervida dos veces consecutivas: la primera vez con ácido sulfúrico 1.25 % m/V y la segunda con hidróxido de sodio 1.25 % m/V. Posteriormente se calcina y se considera “fibra cruda (o bruta)” a la diferencia de peso entre la muestra obtenida de la hidrólisis y el residuo inorgánico luego de la calcinación. El análisis se hizo por triplicado. El contenido de

fibra se reporta sobre el material seco, tomando en cuenta que la muestra ha sido desengrasada.

## 2.7. Determinación de carbohidratos totales

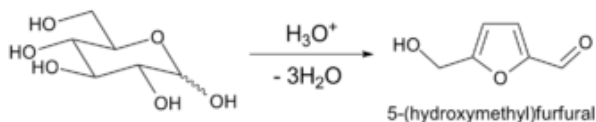
Los carbohidratos totales abarcan

Estos fueron determinados basado en el método colorimétrico de antrona para carbohidratos totales en plantas (Taiz, 2006). La muestra, previamente desengrasada, es tratada con ácido clorhídrico para hidrolizar los carbohidratos complejos (Fig. 12). En esta etapa, los polisacáridos y oligosacáridos son hidrolizados en monosacáridos de glucosa y/o fructosa.

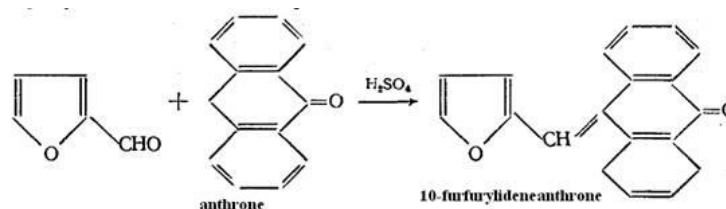


**Figura 12.** Hidrólisis de almidón (polisacárido) en unidades de glucosa

El posterior tratamiento con ácido sulfúrico (del reactivo de antrona) deshidrata los azúcares simples en furfurales (5-hydroximetilfurfural en el caso de glucosa e hidroximetilfurfural en el caso de fructosa) (Fig. 13), quienes forman un complejo azul-verdoso con el reactivo de antrona (Fig. 14).



**Figura 13.** Deshidratación de glucosa en 5-hydroximetilfurfural



**Figura 14.** Reacción de hidroximetil furfural con la antrona

La intensidad de coloración es medida espectrofotométricamente. El contenido de carbohidratos totales se reportan como equivalentes de glucosa,

en base al material seco y tomando en cuenta que la muestra fue desengrasada. El análisis se hizo por triplicado.

## **2.8. Determinación de cenizas**

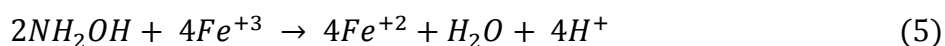
Las cenizas fueron determinadas según el método normalizado de AOAC 7.009 (1980) para cenizas en alimentos. Las muestras son calcinadas a 550°C durante 8 horas hasta que las cenizas sean blancas o grisáceas. El residuo que queda luego de la calcinación es utilizado para calcular el contenido de cenizas. El análisis se hizo por triplicado. Se reporta el contenido de cenizas en base a materia seca.

## **2.9. Preparación de la muestra de cenizas para el análisis de hierro, fósforo y calcio**

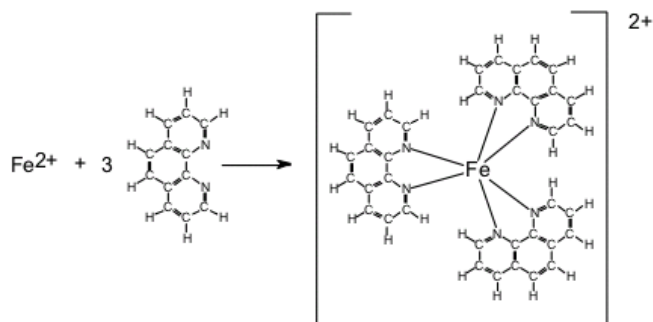
A la cápsula que contiene la muestra calcinada, se le agregó 6 ml de HCl 6N y se calentó suavemente por 30 minutos, reponiendo la evaporación del solvente. La muestra se filtra y se lava con agua destilada, recogiendo el filtrado en una fiola de 50 ml y completando con agua destilada.

## **2.10. Determinación de hierro**

La determinación de hierro se realizó usando el método normalizado por la AOAC 937.03 (1980) para hierro en alimentos. La muestra es preparada usando cloruro de hidroxilamina para reducir todos los iones  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  (5)



La muestra es luego tratada con el reactivo o-fenantrolina, el cual reacciona selectivamente con dicho metal formando un complejo color naranja (Fig. 15).



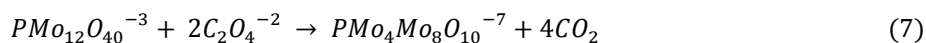
**Figura 15.** Formación del complejo entre iones  $Fe^{+2}$  y o-fenantrolina

La intensidad de esta coloración es medida espectrofotométricamente. El análisis fue realizado por triplicado. El resultado se expresa en mg sobre muestra seca.

### 2.11. Determinación de fósforo

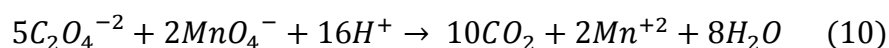
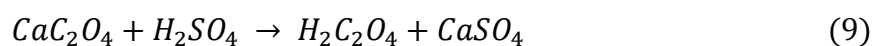
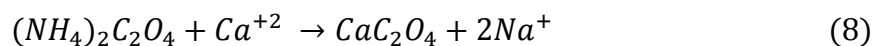
La determinación de fósforo se realizó usando el método normalizado por la AOAC 976.15 (1980) para fósforo en alimentos. La muestra es tratada con molibdato de amonio y reacciona con los iones fosfatos de la solución formando un complejo color azul. La intensidad de esta coloración es medida espectrofotométricamente. El análisis fue realizado por triplicado. El resultado se expresa en mg sobre muestra seca.

En condiciones ácidas, el fosfato reacciona con el molibdato formando fosfomolibdato (6), el cual es reducido por el ion oxalato, teniendo como consecuencia la formación del ion  $PMo_4Mo_8O_{10}^{-7}$  de color azul (7).



## 2.12. Determinación de calcio

La determinación de calcio se realizó usando el método normalizado por la AOAC 927.92 (1980) para calcio en alimentos. La muestra es tratada con una solución de oxalato de amonio, precipitando oxalato de calcio (8), el cual es luego disuelto en ácido sulfúrico (9) y finalmente valorado con permanganato de potasio en una reacción de óxido-reducción (10)



El análisis fue realizado por triplicado. El resultado se expresa en mg sobre muestra seca.

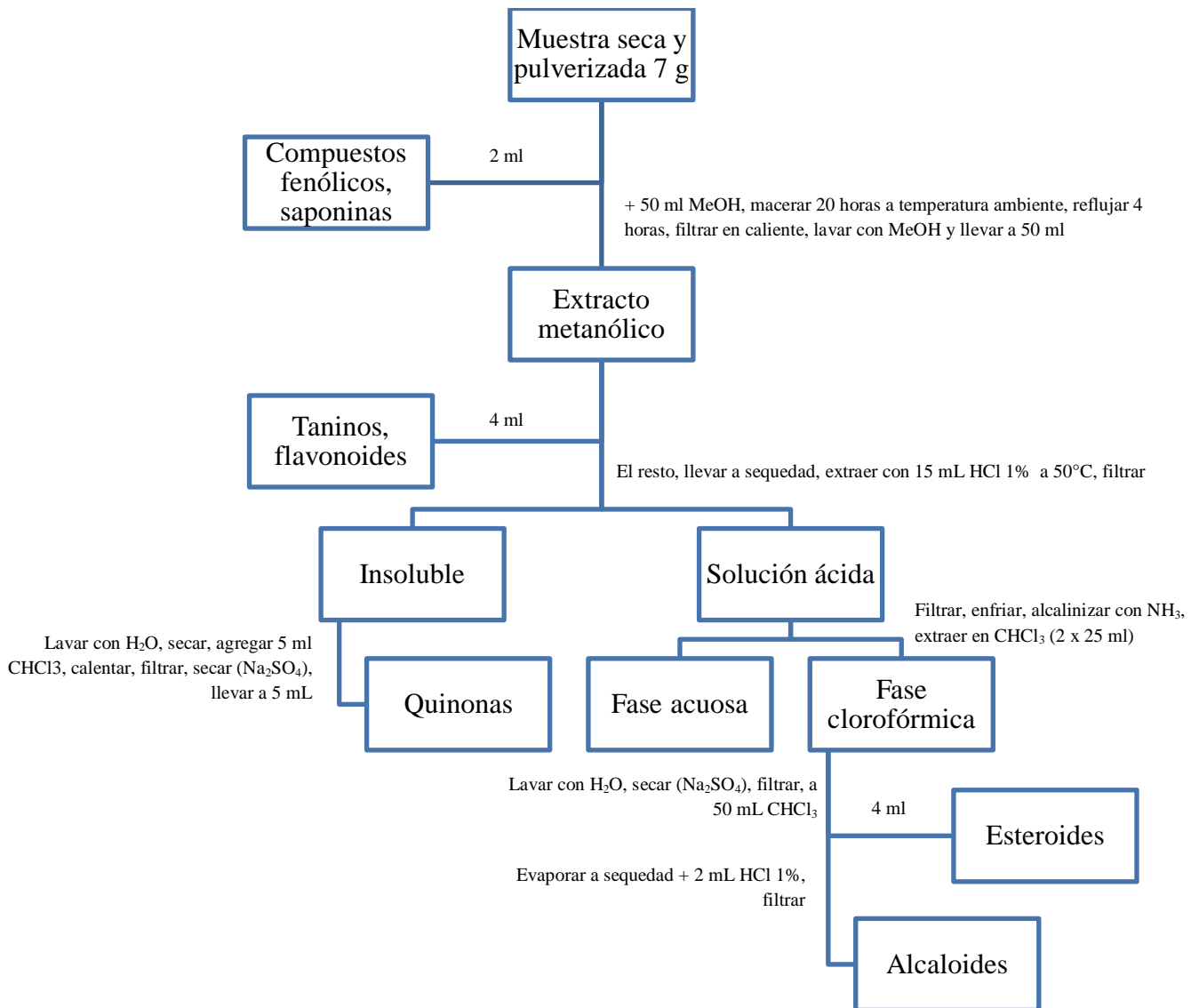
## 3. Análisis de suelos

Se tomaron muestras de suelos de cada procedencia. El análisis estuvo a cargo del Laboratorio de suelos de la Universidad Agraria La Molina (UNALM). Las variables evaluadas fueron: pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), fósforo disponible, potasio disponible, calcio, magnesio y potasio.

## 4. Determinación de metabolitos secundarios

La metodología detallada de la marcha fitoquímica se encuentra en el ANEXO 4.

Se realizó la marcha fitoquímica basada en la metodología descrita por Lock (2016) para determinar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios. De la muestra se determinó directamente la presencia de saponinas y compuestos fenólicos. A partir del extracto metanólico se determinó la presencia de: taninos, flavonoides, antraquinonas, esteroides y alcaloides (Fig. 16).



**Figura 16.** Determinación de metabolitos secundarios en hipocótilos de *L. meyenii* (Basado en Lock, 2016)

Las pruebas químicas para determinar la ausencia o presencia de los metabolitos secundarios se resumen en la tabla 5:

**Tabla 5.** Pruebas químicas cualitativas empleadas para determinar los metabolitos secundarios de *L. meyenii*

	<b>Metabolito secundario</b>	<b>Método</b>	<b>Criterio de presencia</b>
1	Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	Azul, verde o negro
2	Taninos	Gelatina – cloruro de sodio	Precipitado
3	Flavonoides	Shinoda	Tonos rojos
4	Esteroides	Liebermann-Burchard	Verde, azul verdoso
5	Quiononas	Bornträger	Rojo en fase acuosa
6	Saponinas	Espuma	Espuma
7	Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner	Rojo a naranja Blanco a crema Marrón

## 5. Cromatografía de papel para antocianinas

Se analizó el perfil de antocianinas por cromatografía de papel (Coutinho, 2004) para evaluar si existen diferencias en la composición de pigmentos que caracterizan externamente a los hipocótilos morados y rojos. Se molió material seco hasta coleccionar 1 g que pasara la malla Tyler 30. Se hicieron dos extracciones con 20 ml de HCl metanólico al 1%, se juntaron ambas porciones extraídas y se dejó evaporar todo el solvente hasta quedar solamente 5 ml. De esta porción se tomaron las muestras para realizar la cromatografía.

Se armó una cámara cromatográfica empleando una probeta de 2L debido a que proporcionaría un recorrido más largo para la fase móvil. La fase móvil consistió en el sistema n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5). Este se agregó en la probeta, la cual fue tapada con papel aluminio y se esperó 30 minutos para que sature la cámara. Para cada muestra se prepararon tiras de papel filtro de 50 cm x 0.5 cm. La siembra del extracto metanólico se hizo a 4 cm de la base del papel. Las tiras fueron insertadas en la probeta y se revisaron los resultados luego de 48 horas.



## 6. Tratamiento de datos

Se hizo el tratamiento de los datos experimentales del análisis proximal usando el programa STATISTICA 7. Para las salidas gráficas de los resultados se utilizó el programa SigmaPlot 11.0

Con el fin de evaluar diferencias entre las accesiones evaluadas, se realizó un ANOVA de efectos principales para el peso de los hipocótilos y para todos los parámetros del análisis proximal. Las pruebas a posteriori (LSD de Fisher) permitieron comparar los promedios entre accesiones y determinar cuáles eran semejantes entre sí. También se realizó un ANOVA factorial de 2 vías (factores: procedencia y color) en el que solo se evaluaron los hipocótilos de las procedencias Junín y Ninacaca, que pertenecían a un mismo productor y a una altitud semejante.

Se evaluó la asociación de los parámetros del análisis proximal con una correlación de coeficientes de Pearson. Tomando en cuenta estas correlaciones, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Para este último análisis, no se tomaron en cuenta los datos de humedad ni grasas, debido a que estos carecen de interés para el consumidor final de *L. meyenii*. Se hizo un ANOVA de efectos principales para evaluar los efectos de la procedencia y color en los dos primeros componentes, PC1 y PC2.

Con los puntajes de cada componente principal, se realizó un MANOVA para detectar el efecto general de la procedencia en los componentes principales. Del mismo modo, se realizaron ANOVAs univariados para evaluar el efecto de la procedencia sobre cada componente principal. Las pruebas a posteriori (LSD de Fisher) permitieron ver qué procedencias se parecían entre ellas.

## V. RESULTADOS

### 1. Características generales

Los hipocótilos de *L. meyenii* presentaron formas esféricas y cónicas. En cuanto al color, se observó que los hipocótilos negros de Achipampa son más oscuros que los de Junín y Ninacaca (Fig. 18). Los pesos oscilaron entre 6.48 g y 46.78 g (Tabla 6). Al evaluar el material obtenido de las tres localidades y colores, se encontró que existen diferencias significativas de peso debidas a la procedencia y color, siendo las diferencias por procedencia de mayor magnitud (ANOVA de efectos principales, Tabla 7). Los hipocótilos de la zona baja (Achipampa) son más livianos que los de la zona alta (Junín y Ninacaca). Al comparar el material del mismo productor en dos localidades, se encontró que los hipocótilos de Junín son más pesados (Tabla 6, Fig. 19) y que existen diferencias significativas por procedencia, color, así como la interacción de ambos factores (ANOVA de dos vías con interacción, Tabla 8).

En cuanto a los colores, se observa que los hipocótilos negros son generalmente más ligeros en las tres zonas de cultivo, mientras los hipocótilos morados son los más pesados (Tabla 6).

### 2. Análisis proximal

Los resultados del análisis proximal se presentan en la Tabla 9.

Con el ANOVA de efectos principales, se encontró que hay diferencias significativas por procedencia para todos los parámetros evaluados, excepto para grasas. Por el color de hipocótilo, se encontró diferencias significativas para todos los parámetros, excepto carbohidratos totales y fósforo (ANOVA de efectos principales, Tabla 10). En general, los hipocótilos de la zona alta (Ninacaca y Junín) presentan los mayores contenidos de humedad, cenizas y fósforo (Fig. 20 y 21), mientras que los hipocótilos procedentes de la zona baja (Achipampa), presenta un mayor contenido de hierro (Fig. 21).

Al momento de evaluar solamente los hipocótilos de la zona alta del mismo productor (Junín y Ninacaca), el ANOVA factorial de 2 vías (Tabla 15), determinó que las diferencias significativas persisten de forma similar al primer ANOVA, a excepción de las cenizas que dejaron de presentar diferencias significativas por procedencia o color. Adicionalmente, se encontró que para todos los parámetros hay diferencias significativas frente a la interacción de la procedencia y color de hipocótilo.

Con la correlación de Pearson, se encontró que el contenido de humedad guarda una fuerte relación positiva (0.76) con el contenido de fósforo, así como una relación negativa con el hierro (-0.52). El contenido de proteínas posee una fuerte relación negativa (-0.65) con el contenido de fibra. Del mismo modo, se observó que las cenizas poseen una fuerte relación positiva con el contenido de fibra, así como una fuerte relación negativa para el contenido de carbohidratos totales (Tabla 11).

En el análisis de componentes principales, se encontró que los dos primeros componentes explicaron el 74.60% de la varianza total de los resultados. Para el PC1 (52.91%) contribuyen de forma significativa proteínas, fibra, carbohidratos totales, cenizas y calcio. Por otra parte, para el PC2 (21.69%), contribuyen de forma significativa los parámetros de fósforo y hierro (Tabla 12).

El ANOVA de efectos principales evaluó si la procedencia y el color de hipocótilo afectaban significativamente los dos primeros componentes del PCA. Se encontró que existen diferencias significativas por procedencia, mas no por color de hipocótilo (Tabla 13). Al evaluar las similitudes entre procedencias, se encontró que Ninacaca se diferencia de Achipampa y Junín en el PC1, mientras Achipampa se diferencia de Junín y Ninacaca en el PC2 (Fig. 23).

El MANOVA mostró efectos significativos de la procedencia. Seguidamente, los ANOVAs univariados mostraron también diferencias significativas para el efecto de cada componente sobre la procedencia (Tabla 14).

### **3. Análisis de suelos**

Los resultados del análisis de suelo se presentan en la tabla 16. Los valores de pH oscilaron entre 3.58 a 4.98. Por otra parte, la zona baja (Achipampa) presenta el menor contenido de fósforo disponible, así como el mayor contenido de calcio. Los suelos de las zonas altas (Junín y Ninacaca) presentan valores más altos de fósforo disponible y menores de calcio.

### **4. Determinación de metabolitos secundarios**

Para todos los hipocótilos, se determinó la presencia de: compuestos fenólicos, esteroides, y alcaloides. Asimismo, se determinó la ausencia de: taninos, quinonas, saponinas. En cuanto a los flavonoides, se determinó la presencia de estos solamente en los hipocótilos morados y rojos mientras que los hipocótilos amarillos y negros carecen de estos. Adicionalmente, se notó que los hipocótilos morados de Achipampa (accesión AM) presentaron una mayor intensidad en la reacción para flavonoides, en comparación a los hipocótilos morados de Junín y Ninacaca (Tabla 17, Fig. 24)

### **5. Cromatografía de papel de antocianinas**

Para los hipocótilos rojos, se logró distinguir solo 1 mancha coloreada mientras que para los hipocótilos morados de las zonas altas (Junín y Ninacaca) se logró distinguir 2 manchas coloreadas. Por otra parte, para los hipocótilos morados de Achipampa, se logró distinguir hasta 4 manchas coloreadas. Los valores de R<sub>f</sub> se presentan en la tabla 18. Se observa que hay un R<sub>f</sub> similar a las 5 accesiones evaluadas y que los hipocótilos morados, en general, comparten una mancha adicional. Los hipocótilos morados de Achipampa presentan dos manchas adicionales en R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub>.

## VI. DISCUSIÓN

Al momento de comparar todas las accesiones de hipocótilos de *L. meyenii*, se encontraron diferencias significativas por color y procedencia excepto para el parámetro de grasas, lo cual puede deberse a que el contenido de estos es bastante pequeño (menor a 1%). Otros estudios también han reportado que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) cuando se comparan los niveles de grasa en hipocótilos de distintos colores o procedencias (Cheng, 2017). En general, se observa que las diferencias por procedencia de los hipocótilos son de mayor relevancia que por colores (Tabla 7, Tabla 10). Para evaluar hipocótilos de igual color en distintas procedencias, se evaluaron también las diferencias tomando en cuenta solo los hipocótilos de la zona alta (Tabla 8, Tabla 15). De igual modo, las diferencias por procedencia fueron de mayor magnitud que por color de hipocótilo.

En relación a las características generales, se encontró que los hipocótilos de la zona baja (Achipampa) son más livianos que en zona alta (Junín y Ninacaca) y, por tanto, más pequeños. En la zona baja, el fósforo disponible fue mucho menor (4.9 ppm) en comparación al de las zonas altas (12.4 ppm y 43.7 ppm, respectivamente). Se sabe que el fósforo disponible está asociado directamente a funciones de crecimiento y actividad metabólica en plantas a través de procesos de transferencia de energía (Pardede, 2004), lo cual explicaría la diferencia de tamaño en hipocótilos de zonas altas y bajas. La concentración de fósforo disponible en la zona baja (Achipampa) se clasificaría como bajo (menor a 7 ppm), mientras que las concentraciones en los suelos de Junín y Ninacaca se clasificarían como moderada (entre 7 y 15 ppm) y alto (mayor a 15 ppm), respectivamente (Hazelton, 2007). No obstante, la relación se pierde al comparar solamente hipocótilos de Junín y Ninacaca.

El análisis de correlación de Pearson mostró que hay una relación significativa entre el parámetro de fibras con los valores de carbohidratos, cenizas, fósforo y hierro (Tabla 11). Con esta correlación, se procedió a evaluar cómo se organizaban los datos con el análisis de componentes principales. Se observó que la varianza de los parámetros del análisis proximal de los hipocótilos se explica por procedencia y no por color (Fig. 22). Cuando evaluamos los factores de carga, encontramos que todas las variables evaluadas están involucradas en alguno de los componentes. Al momento de evaluar el efecto de la procedencia en los dos primeros componentes, encontramos que las

diferencias significativas se mantienen (Tabla 14). Atribuimos, entonces, que las condiciones en que se desarrollan los hipocótilos son más relevantes que el color al momento de diferenciarlos.

El análisis de componentes principales nos permite observar que los hipocótilos de Junín y Ninacaca se asemejan por el PC2 (fósforo, hierro), mientras estos se diferencian de los hipocótilos de Achipampa por el PC1 (proteínas, fibra, fósforo, calcio y ceniza) (Tabla 12). Chen (2017) muestra en un estudio comparativo de hipocótilos amarillos de *L. meyenii*, que el sitio de cultivo afecta significativamente el contenido de proteínas y fibra; muestra también que hipocótilos morados y negros en una misma zona de cultivo difieren significativamente en el contenido proteico. Por otra parte, sabe que la acidez del suelo puede interferir con la incorporación de minerales como fósforo (P), calcio (Ca), hierro (Fe) y magnesio (Mg) (Poschenrieder et.al., 1995), lo cual explicaría que los hipocótilos de Ninacaca (pH=3.58) posean un menor contenido de calcio que los de Junín y Achipampa (pH=4.98 y pH=4.53). Por otra parte, se sabe que las bajas temperaturas dificultan la absorción de hierro (Schulte, 2004), lo cual se asociaría con el alto contenido de hierro en hipocótilos de Achipampa, la zona baja, que es más relativamente más cálida que las zonas altas (Lozano-Canales, 2017 – resultados no publicados). Atribuimos, entonces, que las características del ambiente afectan a los hipocótilos en relación al contenido proteico, de carbohidratos, de fósforo, hierro y calcio.

Al momento de comparar el contenido de carbohidratos de hipocótilos entre Junín (53.23%) y Ninacaca (58.24%) encontramos una relación directa con el fósforo disponible en el suelo correspondiente (12.4 ppm y 43.7 ppm). El fósforo participa dentro de la síntesis y acumulación de almidón y sacarosa en plantas (Vega, 1998), lo cual explicaría el incremento de carbohidratos totales en hipocótilos de Ninacaca. La relación entre fósforo disponible y contenido de carbohidratos no se mantiene con los hipocótilos de Achipampa, lo cual podría ser consecuencia del manejo agronómico del agricultor.

En cuanto a la determinación de metabolitos secundarios, solo se encontraron diferencias en la determinación de flavonoides, donde se observó que hipocótilos morados y rojos dieron positivo a la prueba de Shinoda (Tabla 17). Adicionalmente, se observó que la muestra de hipocótilos de Achipampa presentó una coloración roja más

intensa que la de las muestras de hipocótilos de las zonas altas (Fig. 24). Esto fue lo que nos llevó a la exploración de antocianinas por cromatografía de papel.

Los resultados de la exploración de antocianinas por cromatografía en papel permite deducir que los hipocótilos rojos y morados definitivamente no poseen los mismos pigmentos, dado que para los hipocótilos rojos solo se consiguió calcular un Rf, mientras se determinaron múltiples Rf para los hipocótilos morados (Tabla 18). Al no poseer la misma cantidad de franjas, podemos afirmar que el color observado del hipocótilo definitivamente no corresponde a un mismo pigmento (Martí et. al., 2008). A pesar de que los hipocótilos rojos no presentan el mismo Rf, es probable que esto se deba a las condiciones del medio en el que se encuentran, pues su estabilidad se ve afectada por las condiciones del ambiente: grado de oxidación, temperatura, presencia de iones, pH y la combinación de azúcares sustituyentes (Vermerris, 2009).

En cuanto a los hipocótilos morados, se observó que los cromatogramas de los hipocótilos de Junín y Ninacaca son similares, pero estos dos difieren notablemente con el cromatograma del hipocótilo de la zona baja, el cual posee 2 valores de Rf adicionales (Tabla 18). Esto nos permite afirmar que, si bien los hipocótilo morados pueden verse iguales a simple vista, definitivamente no es debido a los mismos compuestos químicos (Burriel et. al., 2008). Sin embargo, en este punto no se puede determinar si la diferencia en la pigmentación es consecuencia de la procedencia del hipocótilo o es consecuencia del manejo de semillas del agricultor.

Tanto en la exploración de antocianinas (Tabla 18) y en la observación general de hipocótilos (Fig. 18), se observó que la pigmentación de hipocótilos del “mismo color” es distinta en la zona de Achipampampa, siendo más intensa. Esto nos podría llevar a pensar que algunas características de la procedencia estarían modulando la pigmentación de hipocótilos; sin embargo, esto debe estudiarse más detalladamente para el caso de *L. meyenii*, puesto se conoce que en otras especies como *Vitis vinifera*, la intensidad de radiación UV puede tener una influencia positiva en el contenido total de antocianinas y que las temperaturas del medio pueden explicar la variación de estas (Fernandes de Oliveria et. al., 2015)

En este sentido, sería interesante profundizar el estudio de la pigmentación de hipocótilos, dado que su valor comercial se basa únicamente en el color observado; no

obstante, se pudo observar que los hipocótilos morados de las zonas altas y bajas no poseen la misma composición de pigmentos.



## VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El metabolismo primario se relaciona con el color de hipocótilo y procedencia, siendo este último factor de mayor magnitud y relevancia.
- Las características del ambiente se asociarían a variaciones en el contenido de proteína, fibra, carbohidratos, hierro, fósforo y calcio.
- El color de hipocótilo no explica la varianza de los parámetros del análisis proximal.
- Se encontraron flavonoides sólo en hipocótilos rojos y morados.
- La diversidad de antocianinas en hipocótilos morados estaría asociada a la procedencia.

### **Recomendaciones**

- Investigar más acerca de los compuestos químicos asociados a la coloración de hipocótilos empleando análisis instrumental como HPLC-MS con el fin de poder identificarlos.
- Investigar sobre factores ambientales (como radiación, temperatura y presencia de metales en suelo) relacionados a la pigmentación en hipocótilos.
- Investigar sobre la variación de glucosinolatos, macamidas y/o macaenos en hipocótilos de iguales colores cultivados en distintas zonas con el fin de evaluar cómo la procedencia afecta la composición de compuestos bioactivos asociados a las propiedades medicinales.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aliaga, R. (1999). Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación de la “maca” (*Lepidium meyenii*) Convenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá. Lima-Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
2. Anaya, A., Espinosa-García, F., Cruz-Ortega, R. (2001) Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. México: Plaza y Valdes.
3. AOAC. 1980. Métodos oficiales de análisis, 13th edition. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
4. Ashton, Q. (2013). Advances in Brassicaceae Research and Application. Georgia: Scholarly Editions
5. Atta-ur-Rahman (2014). Studies in Natural Products Chemistry – Volume 42. Great Britain: Elsevier
6. Baoliang C., Zheng, L., He, K., Zheng, Q.(2003) Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. J. Nat. Prod. 2003, 66, 1101-1103.
7. Bate-Smith, EC. (1948). Paper Chromatography of Anthocyanins and Related Substances in Petal Extracts. Nature 161, 835–838 (29 May 1948)
8. Benton, J. (2001) Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. New York: CRC Press
9. Benton, J. (2012) Plant Nutrition and Soil Fertility Manual – 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press
10. Boltz, D.F. & Mellon, M.G. (1947). “Determination of Phosphorus, Germanium, Silicon, and Arsenic by the Heteropoly Blue Method” *Analytical Chemistry*, 19, 873
11. Burriel, F., Lucena, F., Arribas, S., Hernández, S. (2008). Química analítica cualitativa – 18va edición. España: International Thomson.
12. Chen, L., Li, J., Fan, L. (2017) The Nutritional Composition of Maca in Hypocotyls (*Lepidium meyenii* Walp.) Cultivated in Different Regions of China. *Journal of Food Quality*, 8
13. Coe, F.G. & Anderson, G. (1996). Screening of medicinal plants used by Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 53 (1996) 29-50.

14. Coutinho, M., Quadri, M., Morerira, R., Quadri, M. (2004). Partial Purification of Anthocyanins from *Brassica oleracea* (Red Cabbage). *Separation Sci Tec*: Vol. 39. 3769-3782.
15. Delgado Rodolfo; Castro Luis; Cabrera de Bisbal Evelyn; Manuel de Jesús Mújica; Simón Caniche; Lesce Navarro e Ivon Noguera. 2008. Relación entre propiedades físicas del suelo y algunas características del sistema radical del maíz, cultivado en un suelo fluventic haplustoll de textura franco-arenosa de maracay, Venezuela. *Agronomía Tropical* 58(3): 245-255.
16. Dini, A., Migliuolo, G., Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O. (1994). Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* 49 (1994) 347-349
17. Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, M., Weigend, M. (2009) Desarrollo de monografías botánicas (factsheets) para cinco cultivos peruanos. *Hojas botánicas: Maca – Lepidium meyenii Walp.* Lima: Universidad Nacional de San Marcos.
18. Fedotova, MV. & Dmitrieva, OA. (2016) Proline hydration at low temperatures: its role in the protection of cell from freeze-induced stress. *Amino Acids* (2016) 48: 1685.
19. Fernandes de Oliveira, A., Mercenaro, L., Del Caro, A., Pretti, L., Nieddu, G. (2015) Distinctive anthocyanin accumulation responses to temperature and natural UV radiation of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars. *Molecules*, 20, 2061-2080.
20. Fuccillo, D., Sears, L., Stapleton, P. (1997). *Biodiversity in Trust*. New York: Cambridge University Press
21. Gennaro, A. (2003) *Remington Farmacia – 20a edición*. Buenos aires: Editorial médica panamericana.
22. Glenn, R., Dicke, M., Hartley, S. (2002). *The Ecology of Plant Secondary Metabolites: From Genes to Global Processes*. New York: Cambridge University Press
23. Gliessman, S. (2002) *Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Costa Rica: S.R. Gliessman.
24. Gomberg, M (1896). On the action of Wagner's reagent upon caffeine and a new method for estimation of caffeine. *J. Am. Chem. Soc.* 18 (4), pp 331-342
25. Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. (2006) Effect of short term and long term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in rats. *J Ethnopharmacology*. 103:448–454.

26. Gonzales, G. F. (2012). Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM, 2012, 193496
27. Gonzales, GF, Miranda, S., Nieto, J., Fernández, G., Yucra, S., Rubio, S., Yi, P., Gasco, M. (2005): Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod. Biol Endocrinol*;3:5.
28. Gonzales, GF., Villaorduña, L., Gasco, M., Rubio, J., Gonzales, C. (2014). Maca (*Lepidium meyenii* Walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(1), 100-110.
29. Greenfield, H., Southgate, D.A.T. (2003). Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización. Roma: Elsevier Science Publishers
30. Harborne, J. (1959). Chromatographic identification of anthocyanin pigments. *Chromatographic Reviews*
31. Hazelton, P. (2007) Interpreting soil test results. CSIRO Publishing.
32. Hedge, J E and Hofreiter, B T (1962) In: Carbohydrate Chemistry 17 (Eds Whistler R L and Be Miller, J N) Academic Press New York.
33. Hongju, H. (1999). Studies for Growth Adaptation and Identification of Glucosinolates on Chinese Brassicas. Munchen: Herbert Utz Verlag GmbH.
34. Huang, L. (2013) Molecular Pharmacognosy. New York: Springer
35. Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, 64(1), 48–59
36. Lock, O. (2016). Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Editorial PUCP
37. Lozano-Canales, A. (2017-resultados no publicados). “Desempeño de la planta *Lepidium meyenii* Walp. “maca” en parcelas experimentales localizadas en diferentes altitudes: la influencia del suelo y la procedencia de las semillas. Facultad de ciencias y filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
38. Marín-Bravo, M. (2003). Histología de la maca, *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae). *Rev. Perú. Biol.* 2003; 10 (1): 101-108
39. Meissner, H. (2015) Peruvian maca (*Lepidium peruvianum*): (I) Phytochemical and Genetic Differences in Three Maca Phenotypes. *Int. J. Biomed. Sci.* Vol 11. No 3. Krakou, pp. 131-145 (2015)

40. Meissner, H. (2016) Peruvian maca (*Lepidium peruvianum*): (II) Phytochemical Profiles of Four Prime Maca Phenotypes Grown in Two Geographically-Distant Locations. *Int. J. Biomed. Sci.* Vol 12. No 1. Krakou, pp. 9-25 (2016)
41. Ministerio de agricultura y riego – MINAGRI. (2016). El Perú es el primer exportador mundial de maca y quinto en uvas frescas. Consultado el 12 de agosto de 2017. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/noticias-antteriores/notas-2016/15256-el-peru-es-el-primer-exportador-mundial-de-maca-y-quinto-en-uvas-frescas>
42. Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Segunda Edición IICA. San José. Costa Rica. 407 p.
43. Muhammad, I., Zhao, J., Chubck, D., Khan, I. (2001) Constituents of *Lepidium meyenii* ‘maca’. *Phytochemistry* 59 (2002) 105-110
44. Ozawa Y., Uda Y., Ohshima T., Saito K. and Maeda Y. (1990) Formation of yellow pigment by the reaction of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate with L-ascorbic acid and some dihydroxyphenolic compounds. *Agric. Biol. Chem.* 54: 605–611
45. Piacente, S., Carbone, V., Plaza, A., Zampelli, A., Pizza, C. (2002). Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* walp). *J Agric Food Chem.* 2002;50(20):5621-5.
46. Poschenrieder, C.H. (1995). Short term effects of pH and aluminum on mineral nutrition in maize varieties differing in proton an aluminum tolerance. *Journal of Plant Nutrition.* 18 (8), 1495-1507.
47. Quirós C., Aliaga R. (1997). Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). En: Hermann M, Hellers J, editors. Anden roots and tubers: Ahipa, Arracacha, “maca” and Yacon. Promoting the conservation and use of under-utilized neglected crops. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute. p. 173-197.
48. Quiros, C. F., Epperson, A., Hu, J., Holle, M. (1996). Physiological studies and determination of chromosome number in “maca”, *Lepidium meyenii* (Brassicaceae). *Economic Botany*, 50(2), 216-223.
49. Rogg, H. (2000) Manejo Integrado y Control Biológico De Plagas Y Enfermedades. Quito: PROEXANT.
50. Rubio J, Caldas M, Dávila S, Gasco M, Gonzales GF (2006). Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complement Altern Med* 6:23.

51. Ruijters, EJ., Weseler, AR., Kicken, C., Haenen, GR., Bast, A. (2013). The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. *Eur. J. Pharmacol.* 2013 Sep 5;715(1-3):147-53
52. Santacoloma-Varón, L. & Granados, E. (2010). Evaluación del contenido de metabolitos secundarios en dos especies forrajeras encontradas en dos pisos térmicos de Colombia. *RIAA* 1(1) 2010: 31-35
53. Schmidt, R & Bancroft, I. (2011). *Genetics and Genomics of Brassicaceae*. New York: Springer.
54. Sifuentes-Penagos, G., León-Vásquez, S., Paucar-Menacho, L. (2015). Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scientia Agropeuaria* 6 (2): 131-140
55. Taiz, L., Zeiger. (2006). *Fisiología vegetal – Volumen 1*. USA: Publicacions de la Universitat Jaume I.
56. Tello, J., Hermann, M., Calderón, A. (1992). La maca (*Lepidium meyenii* Walp.) cultivo alimenticio potencial para las zonas altoandinas. *Bol Lima.* 14:59-66.
57. Vermerris, W., Nicholson, R. (2009). *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer
58. Vílchez, L., Guevara, A., Encina, C. (2012) Influencia del tamaño de partícula, humedad y temperatura en el grado de gelatinización durante el proceso de extrusión de maca (*Lepidium meyenii* Walp). *Rev. Soc. Quím. Perú* v.78 n.2
59. Wallace, T., Monica, M. (2014) *Anthocyanins in Health and Disease*. Boca Raton: CRC Press.
60. Yabar E, Pedreschi R, Chirinos R, Campos D. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chem.* 2011;127(4):1576-83.
61. Yllescas M. (1994) Estudio químico y Físicoquímico de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* procedentes de Carhuamayo. Lima, Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
62. Zhang, L. (2005) Relationship between Glucosinolates and Colors in Eight Accessions of Maca. *Journal of Food Engineering and Technology*. Vol 4. No 1 pp. 45- 52(2005)
63. Zhao J., Avula B., Chan M., Clément C., Kreuzer M., Khan IA. (2012). Metabolomic differentiation of maca (*Lepidium meyenii*) accessions cultivated

under different conditions using NMR and chemometric analysis. *Planta Med.*  
2012 Jan;78(1):90-101.

## **IX. ANEXOS**



# ANEXO 1: FIGURAS

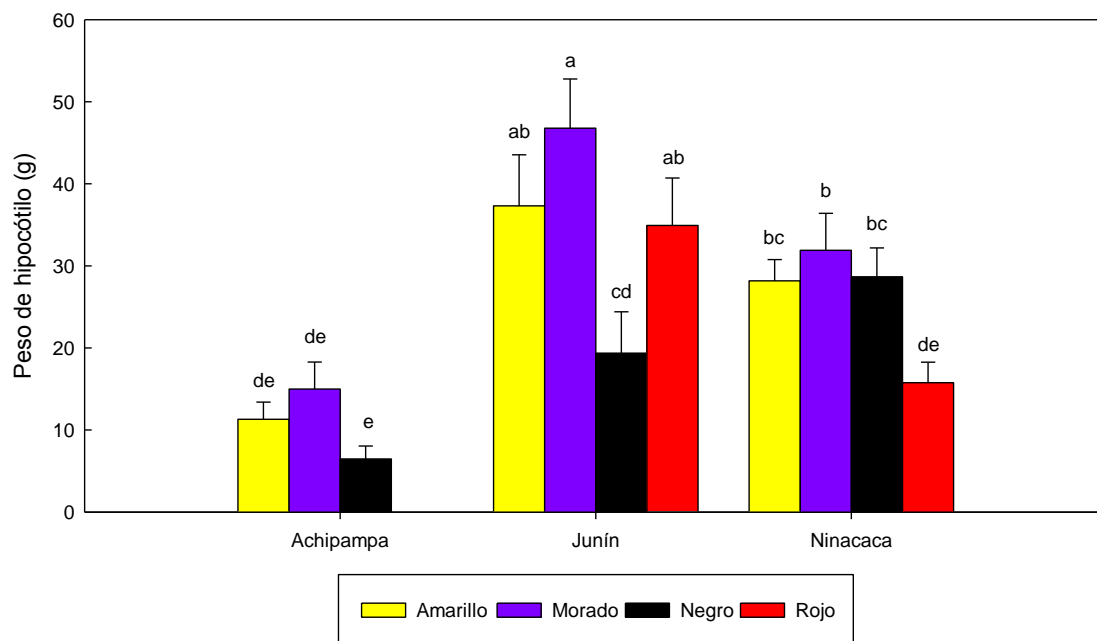
**Figura 17:** Distribución de las zonas de colecta de hipocótilos de *L. meyenii*. Se muestran los puntos: A: Achipampa, B: Junín, C: Ninacaca



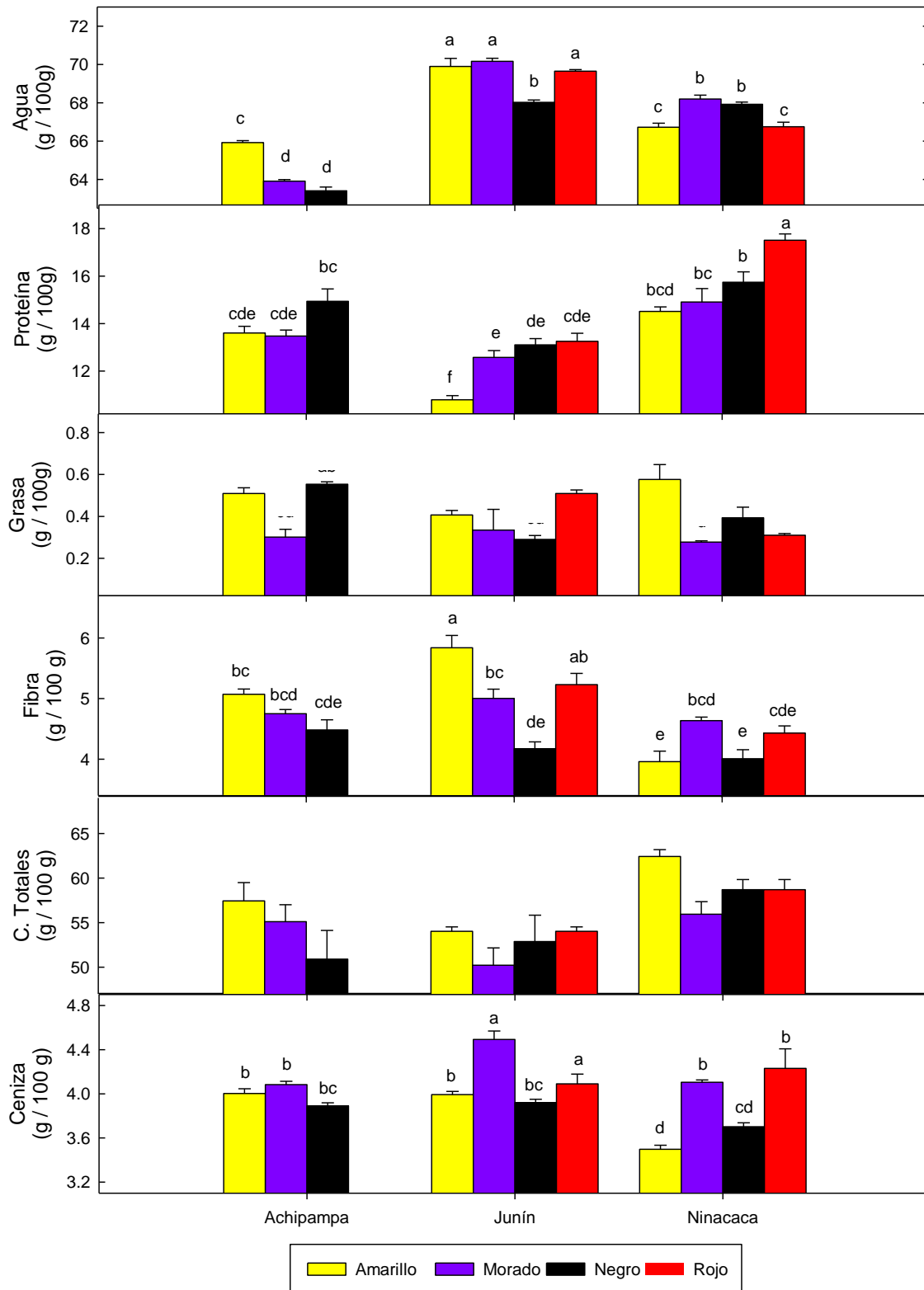
**Figura 18.** Hipocótilos de *L. meyenii*. Se muestran los hipocótilos por procedencia y colores: A: Achipampa, B: Ninacaca, C: Junín.



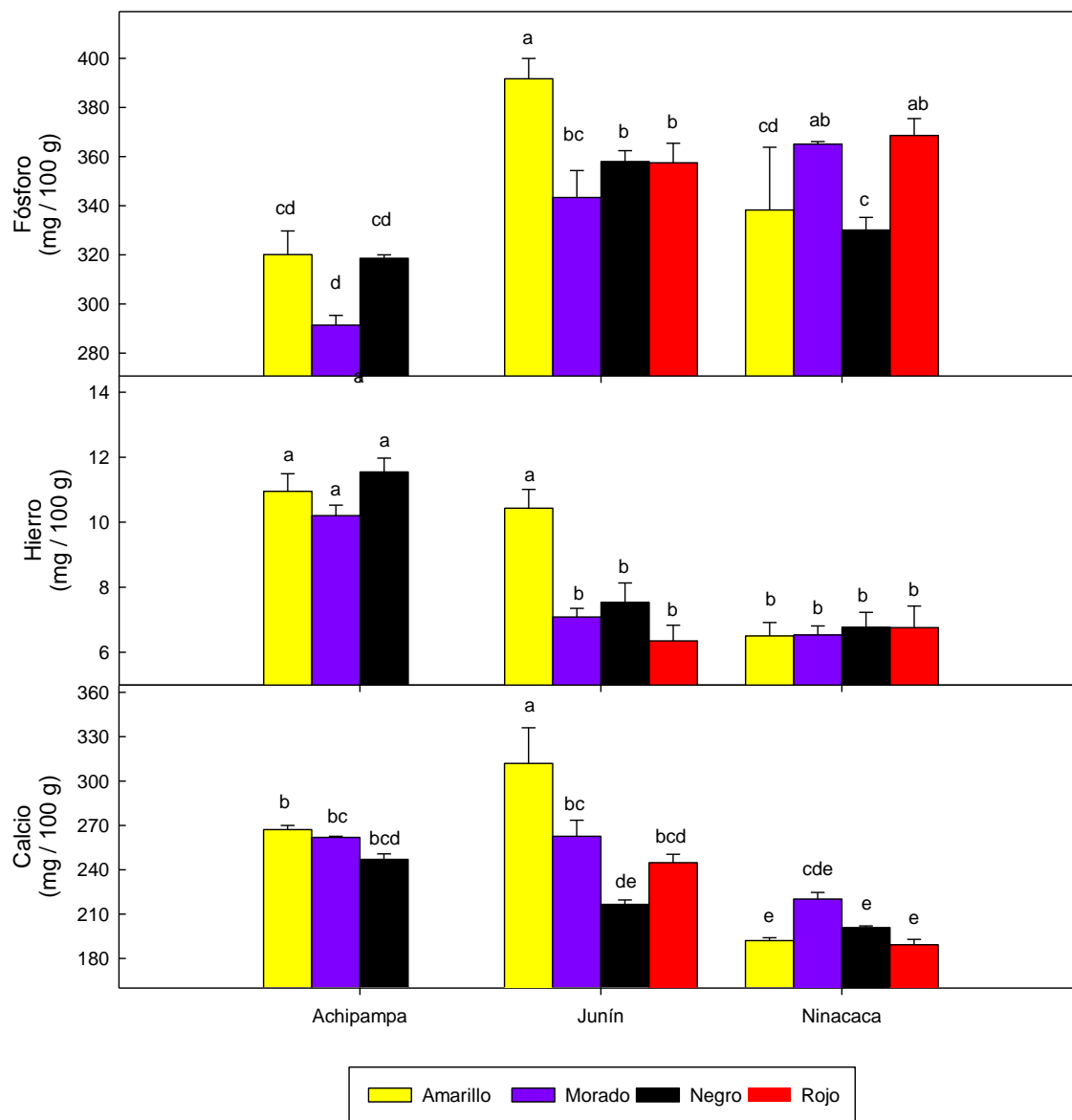
**Figura 19.** Pesos frescos de hipocótilos de *L. meyenii*. Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre accesiones.



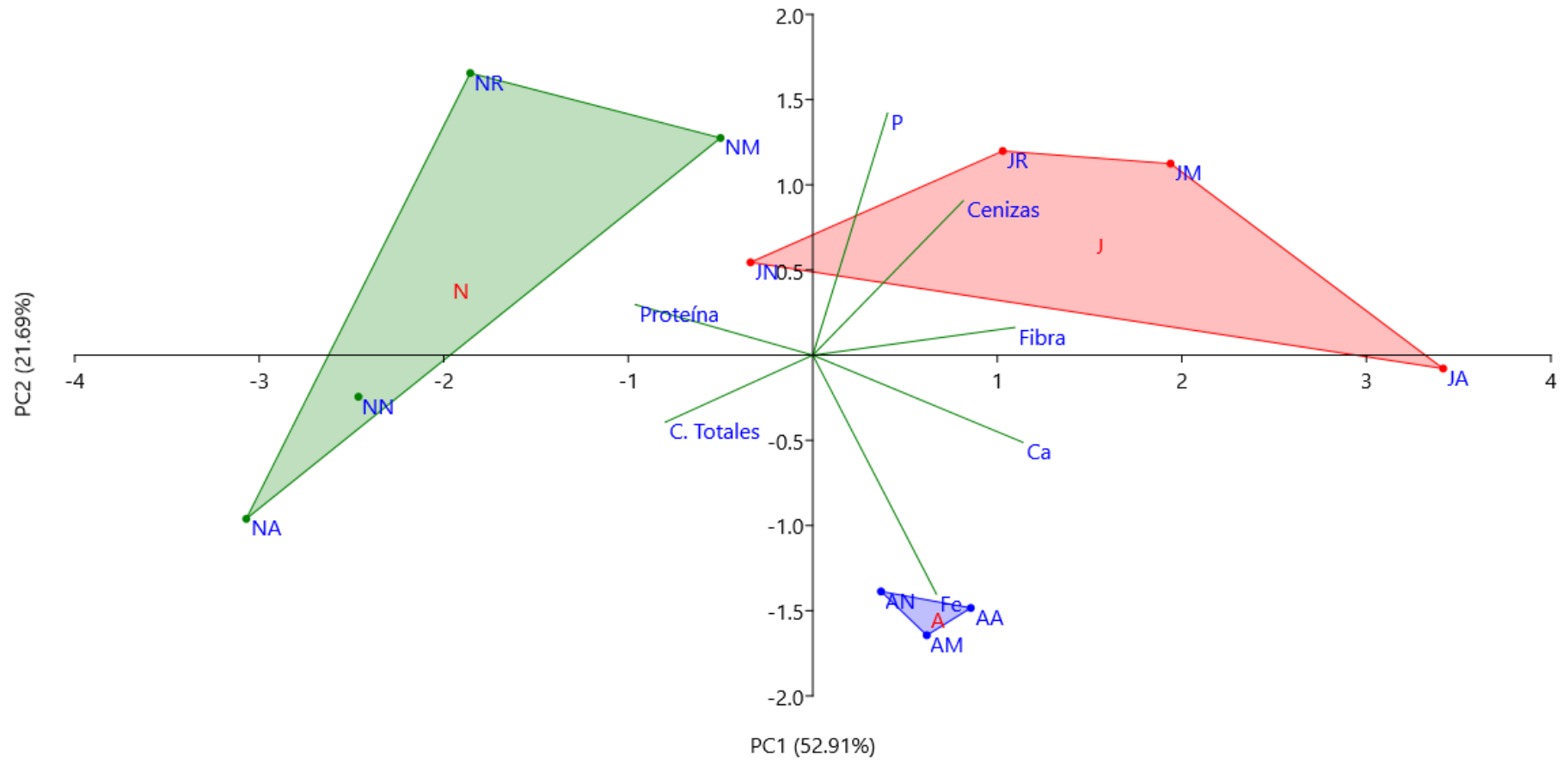
**Figura 20.** Análisis proximal de hipocótilos de *L. meyenii*. Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre accesiones. Para “grasas” y “carbohidratos totales”, no hubo diferencias significativas entre accesiones.



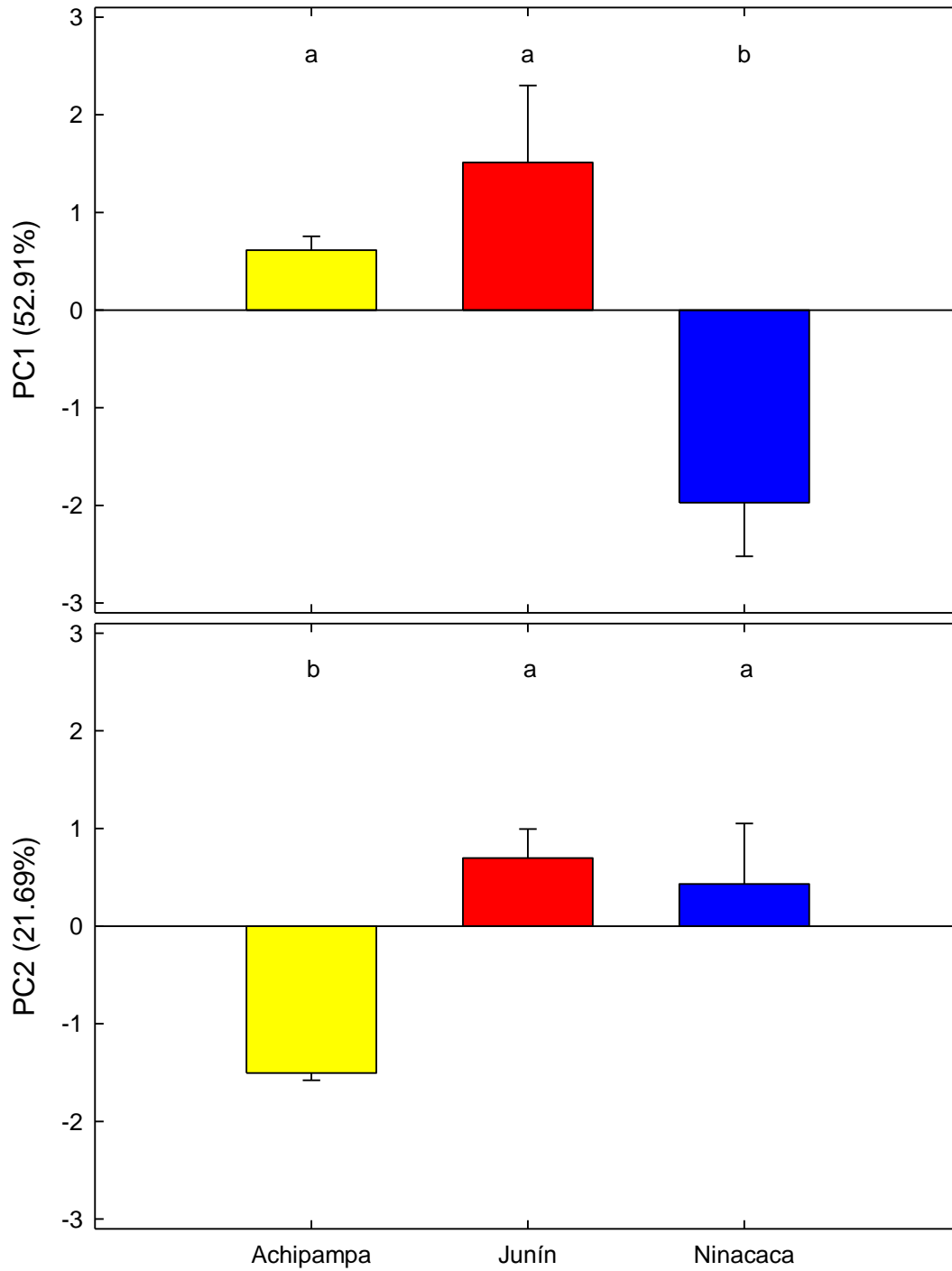
**Figura 21.** Análisis proximal (fósforo, hierro, calcio) de hipocótilos de *L. meyenii*. Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre accesiones.



**Figura 22.** Ordenamiento de las accesiones según los parámetros del análisis proximal. Se muestra la salida gráfica del análisis de componentes principales (PCA)



**Figura 23.** Representación gráfica de la similitud entre accesiones para cada componente. (A) PC1 (proteínas, fibra, calcio), (B) PC2 (fósforo, hierro). Las letras sobre las barras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las procedencias.





**Figura 24.** Reacción de Shinoda para la determinación de flavonoides en extracto metanólico de *L. meyenii*. De izquierda a derecha: AA, AM, AN, JA, JM, JN, JR, NA, NM, NN, NR y metanol. Se observa que la coloración para la accesión AM difiere de JN y NM, a pesar de ser el mismo color de hipocótilo.





## ANEXO 2: TABLAS

**Tabla 6.** Características generales de hipocótilos de *L. meyenii*. Se presentan los promedios ( $\pm$  error estándar) por zonas, colores y accesiones. Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre accesiones.

Código	Peso de hipocótilo (g)			
Achipampa [A]	10.93	$\pm$	1.50	
Junín [J]	34.60	$\pm$	3.19	
Ninacaca [N]	26.12	$\pm$	1.90	
Amarillo [A*]	25.60	$\pm$	3.03	
Morado [M]	31.22	$\pm$	3.57	
Negro [N*]	18.17	$\pm$	2.65	
Rojo [R]	25.34	$\pm$	3.77	
AA*	11.30	$\pm$	2.09	de
AM	15.00	$\pm$	3.28	de
AN*	6.48	$\pm$	1.57	e
JA*	37.31	$\pm$	6.22	ab
JM	46.78	$\pm$	5.99	a
JN*	19.37	$\pm$	5.03	cd
JR	34.92	$\pm$	5.79	ab
NA*	28.18	$\pm$	2.59	bc
NM	31.89	$\pm$	4.51	b
NN*	28.67	$\pm$	3.51	bc
NR	15.76	$\pm$	2.50	de

**Tabla 7.** ANOVA de efectos principales para evaluar el efecto de la procedencia y color de sobre los pesos de hipocótilo en las parcelas de Achipampa, Junín y Ninacaca.

	GL	MS	F	P
Procedencia [P]	2	59.343	32.872	<b>&lt;0.0001</b>
Color [C]	3	12.010	6.653	<b>&lt;0.001</b>
R <sup>2</sup>	44.21%			

**Tabla 8.** ANOVA de dos vías con interacción para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los parámetros del análisis proximal para las parcelas de Junín y Ninacaca.

	GL	MS	F	P
Procedencia [P]	1	7.486	4.161	<b>&lt;0.05</b>
Color [C]	3	9.171	5.098	<b>&lt;0.01</b>
P x C	3	8.642	4.804	<b>&lt;0.01</b>
R <sup>2</sup>	31.99%			

**Tabla 9.** Estadística descriptiva del análisis proximal de hipocótilos de *L. meyenii*. Se presentan los promedios por zonas [Achipampa (A), Junín (J), Ninacaca (N)], colores [Amarillo (A\*), morado (M), negro (N\*), rojo (R)] y por accesiones. Se reportan los valores promedio  $\pm$  error estándar.

Código	Humedad* (g)	Proteína** (g)	Grasa** (g)	Fibra** (g)	C. Totales** (g)	Cenizas** (g)	Fósforo** (mg)	Hierro** (mg)	Calcio** (mg)
A	64.41 $\pm$ 0.22	14.01 $\pm$ 0.27	0.45 $\pm$ 0.04	4.77 $\pm$ 0.10	54.48 $\pm$ 1.50	3.99 $\pm$ 0.03	310.00 $\pm$ 5.08	10.90 $\pm$ 0.28	258.68 $\pm$ 3.31
J	69.43 $\pm$ 0.17	12.43 $\pm$ 0.26	0.39 $\pm$ 0.03	5.06 $\pm$ 0.19	53.23 $\pm$ 1.89	4.19 $\pm$ 0.06	362.62 $\pm$ 5.87	7.99 $\pm$ 0.45	258.98 $\pm$ 11.96
N	67.40 $\pm$ 0.14	15.67 $\pm$ 0.32	0.39 $\pm$ 0.04	4.26 $\pm$ 0.10	58.24 $\pm$ 0.82	3.83 $\pm$ 0.06	348.68 $\pm$ 7.90	6.48 $\pm$ 0.16	200.62 $\pm$ 3.87
A*	67.51 $\pm$ 0.35	13.74 $\pm$ 0.20	0.50 $\pm$ 0.03	4.96 $\pm$ 0.28	57.58 $\pm$ 1.54	3.81 $\pm$ 0.06	349.08 $\pm$ 12.96	9.55 $\pm$ 0.66	257.06 $\pm$ 18.84
M	67.42 $\pm$ 0.49	14.74 $\pm$ 0.55	0.30 $\pm$ 0.03	4.80 $\pm$ 0.07	55.59 $\pm$ 2.32	4.14 $\pm$ 0.05	333.26 $\pm$ 9.97	7.83 $\pm$ 0.49	248.22 $\pm$ 7.79
N*	66.45 $\pm$ 0.41	13.55 $\pm$ 0.57	0.41 $\pm$ 0.04	4.22 $\pm$ 0.10	53.63 $\pm$ 1.23	4.00 $\pm$ 0.03	335.12 $\pm$ 5.13	8.72 $\pm$ 0.73	221.50 $\pm$ 6.91
R	68.20 $\pm$ 0.35	14.16 $\pm$ 0.58	0.41 $\pm$ 0.05	4.83 $\pm$ 0.20	54.46 $\pm$ 1.77	4.10 $\pm$ 0.14	363.04 $\pm$ 5.28	6.44 $\pm$ 0.27	217.06 $\pm$ 12.78
AA*	65.92 $\pm$ 0.10	13.60 $\pm$ 0.28	0.51 $\pm$ 0.03	5.07 $\pm$ 0.09	57.44 $\pm$ 2.05	4.00 $\pm$ 0.04	320.08 $\pm$ 9.59	10.95 $\pm$ 0.54	267.16 $\pm$ 2.78
AM	63.91 $\pm$ 0.08	13.48 $\pm$ 0.25	0.30 $\pm$ 0.04	4.75 $\pm$ 0.07	55.11 $\pm$ 1.91	4.08 $\pm$ 0.03	291.38 $\pm$ 3.98	10.20 $\pm$ 0.32	261.89 $\pm$ 0.74
AN*	63.40 $\pm$ 0.20	14.94 $\pm$ 0.52	0.55 $\pm$ 0.01	4.48 $\pm$ 0.17	50.90 $\pm$ 3.22	3.89 $\pm$ 0.03	318.56 $\pm$ 1.41	11.55 $\pm$ 0.42	247.01 $\pm$ 3.72
JA*	69.90 $\pm$ 0.42	10.79 $\pm$ 0.17	0.41 $\pm$ 0.02	5.84 $\pm$ 0.20	54.03 $\pm$ 0.50	3.99 $\pm$ 0.03	391.66 $\pm$ 8.24	10.43 $\pm$ 0.58	311.91 $\pm$ 24.13
JM	70.16 $\pm$ 0.16	12.58 $\pm$ 0.29	0.33 $\pm$ 0.10	5.00 $\pm$ 0.15	50.22 $\pm$ 1.95	4.49 $\pm$ 0.08	343.35 $\pm$ 10.95	7.09 $\pm$ 0.27	262.60 $\pm$ 10.89
JN*	68.02 $\pm$ 0.12	13.10 $\pm$ 0.26	0.29 $\pm$ 0.02	4.17 $\pm$ 0.11	52.88 $\pm$ 2.95	3.92 $\pm$ 0.03	357.99 $\pm$ 4.36	7.54 $\pm$ 0.60	216.58 $\pm$ 3.00
JR	69.65 $\pm$ 0.08	13.25 $\pm$ 0.34	0.51 $\pm$ 0.02	5.23 $\pm$ 0.18	55.78 $\pm$ 7.13	4.34 $\pm$ 0.10	357.48 $\pm$ 7.89	6.78 $\pm$ 0.47	244.84 $\pm$ 5.63
NA*	66.72 $\pm$ 0.21	14.51 $\pm$ 0.19	0.58 $\pm$ 0.07	3.96 $\pm$ 0.17	62.42 $\pm$ 0.77	3.50 $\pm$ 0.04	312.73 $\pm$ 2.15	6.55 $\pm$ 0.30	192.12 $\pm$ 1.93
NM	68.20 $\pm$ 0.20	14.91 $\pm$ 0.57	0.28 $\pm$ 0.01	4.64 $\pm$ 0.06	55.95 $\pm$ 1.40	4.10 $\pm$ 0.02	365.06 $\pm$ 0.99	6.49 $\pm$ 0.36	220.19 $\pm$ 4.44
NN*	67.92 $\pm$ 0.11	15.74 $\pm$ 0.44	0.39 $\pm$ 0.05	4.01 $\pm$ 0.15	58.70 $\pm$ 1.14	3.70 $\pm$ 0.04	325.37 $\pm$ 2.73	6.77 $\pm$ 0.45	200.90 $\pm$ 1.09
NR	66.75 $\pm$ 0.24	17.51 $\pm$ 0.27	0.31 $\pm$ 0.01	4.43 $\pm$ 0.12	55.90 $\pm$ 1.34	4.00 $\pm$ 0.02	368.60 $\pm$ 6.87	6.09 $\pm$ 0.18	189.28 $\pm$ 3.63

\*Se reportan los resultados por cada 100 g de material húmedo

\*\*Se reportan los resultados por cada 100 g de material seco

**Tabla 10.** ANOVA de efectos principales para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los parámetros del análisis proximal en las parcelas de Achipampa, Junín y Ninacaca.

	GL	Humedad	Proteínas	Grasas	Fibra	C. Totales	Cenizas	Fósforo	Hierro	Calcio
Procedencia [P]	2	<b>220.50***</b>	<b>38.73***</b>	1.49	<b>13.05**</b>	<b>3.52*</b>	<b>16.72***</b>	<b>11.67**</b>	<b>46.67***</b>	<b>22.92***</b>
Color [C]	3	<b>7.90***</b>	<b>3.09*</b>	<b>5.08*</b>	<b>6.28**</b>	1.17	<b>8.09**</b>	1.13	<b>5.53**</b>	<b>4.74*</b>
R <sup>2</sup>		82.28%	63.90%	39.82%	62.18%	17.32%	54.07%	43.87%	78.80%	70.17%

\*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001

**Tabla 11.** Matriz de correlación de Pearson entre las variables del análisis proximal de hipocótilos de *L. meyenii* de las 11 accesiones de estudio. Se muestra el coeficiente de correlación (r) con (\*) según su significancia.

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]
[1] Agua	1.000								
[2] Proteína	-.3264	1.000							
[3] Grasa	-.2149	-.1905	1.000						
[4] Fibra	<b>.3441*</b>	<b>-.6471**</b>	.0388	1.000					
[5] C. Totales	-.2304	.3391	-.0615	<b>-.4304*</b>	1.000				
[6] Ceniza	.3333	-.3255	<b>-.3669*</b>	<b>.5829**</b>	<b>-.6786**</b>	1.000			
[7] Fósforo	<b>.7620**</b>	-.2332	-.2378	<b>.4460*</b>	<b>-.4029*</b>	.3392	1.000		
[8] Hierro	<b>-.5169**</b>	<b>-.4719*</b>	.2919	<b>.4472*</b>	-.2423	.1254	-.2565	1.000	
[9] Calcio	.0518	-.0904	.0559	.2801	-.0762	.1323	.0205	.0419	1.000

\*p<0.05, \*\*p<0.001

**Tabla 12.** Factores de carga del PCA de las variables de proteína, fibra, carbohidratos totales, cenizas, fósforo, hierro y calcio. Los valores reportados son coeficientes de correlación. En negrita se resalta las variables que contribuyen en mayor grado a cada componente principal.

	<b>PC 1</b>	<b>PC 2</b>
Proteínas	<b>0.80142</b>	0.15819
Fibra	<b>0.91198</b>	0.086902
C. Totales	<b>-0.6658</b>	-0.20972
Cenizas	<b>0.67946</b>	0.48337
P	0.33747	<b>0.75756</b>
Fe	0.5579	<b>-0.74799</b>
Ca	<b>0.94859</b>	-0.27292
Varianza explicada	52.91	21.69

**Tabla 13.** ANOVA de efectos principales para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los 2 componentes principales del PCA. Los valores significativos se muestran en negrita.

	<b>GL</b>	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>
Procedencia [P]	2	<b>8.1698*</b>	<b>9.2449*</b>
Color [C]	3	2.9219	0.8874
R <sup>2</sup>		62.14%	72.87%

\*p<0.05

**Tabla 14.** MANOVA y ANOVA's univariados para evaluar el efecto de la procedencia sobre los 2 componentes principales del PCA. Los valores significativos se muestran en negrita

	<b>Wilks</b>	<b>F</b>	<b>Df</b>	<b>P</b>
<b>MANOVA</b>				
Procedencia	0.107	7.215284	14	<b>&lt; 0.01</b>
<b>ANOVAs univariados</b>				
PC1 procedencia		9.221334	2	<b>&lt; 0.01</b>
PC2 procedencia		6.658018	2	<b>&lt; 0.05</b>

**Tabla 15.** ANOVA de dos vías con interacción para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los parámetros del análisis proximal para las parcelas de Junín y Ninacaca.

	GL	Humedad	Proteínas	Grasas	Fibra	C. Totales	Cenizas	Fósforo	Hierro	Calcio
Procedencia [P]	1	<b>177.1***</b>	<b>182.40***</b>	0.0136	<b>56.689***</b>	<b>37.24***</b>	0.091	<b>18.81**</b>	<b>9.624*</b>	<b>69.922***</b>
Color [C]	3	<b>12.00***</b>	<b>22.94***</b>	<b>5.7059*</b>	<b>12.718**</b>	2.74	1.638	<b>3.74*</b>	<b>6.682**</b>	<b>8.443**</b>
P x C	3	<b>20.60***</b>	<b>3.55*</b>	<b>5.8257*</b>	<b>12.835**</b>	<b>3.35*</b>	0.512	<b>25.67***</b>	<b>5.644*</b>	<b>10.021**</b>
R <sup>2</sup>		79.24%	89.11%	68.38%	89.29%	63.44%	16.97%	81.68%	74.44%	88.68%

\*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001

**Tabla 16.** Características químicas de los suelos de las procedencias de Achipampa (A), Junín (J) y Ninacaca (N)

	pH (1:1)	CE (es)	MO (%)	P (ppm)	K (ppm)	Ca <sup>+2</sup> (meq/100g)	Mg <sup>+2</sup> (meq/100g)	K <sup>+</sup> (meq/100g)	K/Mg	Ca/Mg
<b>Achipampa (A)</b>	4.57	0.44	12.29	4.90	227	7.16	1.75	0.82	0.47	4.09
<b>Junín (J)</b>	4.98	0.40	10.38	12.4	269	4.47	1.17	0.59	0.50	3.82
<b>Ninacaca (N)</b>	3.58	0.86	7.70	43.7	162	0.94	0.35	0.43	1.23	2.69

**Tabla 17.** Determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los hipocótilos de *L. meyenii*. Se presentan las pruebas químicas utilizadas.

	Accesión										
	AA	AM	AN	JA	JM	JN	JR	NA	NM	NN	NR
<b>Compuestos fenólicos</b>											
Prueba de FeCl <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Taninos</b>											
Prueba de Gelatina-sal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Flavonoides</b>											
Prueba de Shinoda	-	++	-	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Esteroides</b>											
Prueba de Liebermann-Burchard	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Quinonas</b>											
Prueba de Börntrager	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Saponinas</b>											
Prueba de la espuma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Alcaloides</b>											
Prueba de Dragendorff	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de Mayer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prueba de Wagner	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(++): Presencia abundante; (+): Presencia moderada, (-): Ausencia

**Tabla 18.** Valores de R<sub>f</sub> para la cromatografía de papel para el análisis de antocianinas de *L. meyenii*.

	Accesión					
	AM	JM	NM	JR	NR	
R <sub>1</sub>	0.25	0.18	0.21	0.16	0.19	
R <sub>2</sub>	0.31					
R <sub>3</sub>	0.41	0.43	0.39			
R <sub>4</sub>	0.56					

## ANEXO 3: METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS PROXIMAL

### 1. Reactivos

- Acetato de amonio P.A.
- Ácido sulfúrico al 97% P.A.
- Acido clorhídrico al 37% P.A.
- Ácido acético glacial P.A.
- Ácido bórico granulado P.A.
- Ácido oxálico P.A.
- Ácido cítrico P.A.
- Antrona P.A.
- Carbonato de sodio P.A.
- Cloroformo P.A.
- Cloruro de hidroxilamina P.A.
- Dihidrógeno fosfato de potasio P.A
- Éter etílico P.A
- Glucosa anhidra P.A.
- Hidróxido de sodio P.A.
- Metanol P.A.
- Molibdato de amonio P.A.
- 
- 1,10-fenantrolina P.A.
- Oxalato de amonio P.A.
- Permanganato de potasio P.A.
- Rojo de metilo P.A.
- Sal de mohr P.A.
- Sulfato de cobre pentahidratado P.A.
- Sulfato de potasio anhidro P.A.
- Verde bromocresol P.A.
- Yodo puro P.A.

### 2. Instrumentos

- Baguetas de vidrio
- Balones de fondo plano de 250 mL
- Balones Kjeldahl de 200 mL
- Beaker de 600mL
- Beaker de 250 mL
- Beaker de 50 mL
- Cápsulas de porcelana (6.5 mm de diámetro)
- Desecador 300 mL
- Embudos de vidrio (7.5cm de diámetro)
- Equipo de extracción Soxhlet completo
- Espátulas
- Fiolas de vidrio de 1000 mL
- Fiolas de vidrio de 500 mL
- Fiolas de vidrio de 250 mL
- Fiolas de vidrio de 50 mL
- Fiolas de vidrio de 10 mL

- Gradilla para tubos de ensayo
- Matraz esmerilada de 250 mL
- Matraz de 600 mL
- Matraz de 250 mL
- Micropipeta de 100 – 1000 uL (con tips)
- Micropipeta de 10 – 100 uL (con tips)
- Microplaca de 300 uL de capacidad de 96 pozos
- Mortero
- Papel Whatman 41 sin cenizas (120 mm de diámetro)
- Papel Whatman 42 sin cenizas (120 mm de diámetro)
- Papel Whatman 541 sin cenizas (120 mm de diámetro)
- Pipetas graduadas de 25 mL
- Pipetas volumétrica de 5 mL
- Pipetas Pasteur
- Probeta de 10mL
- Probeta de 25 mL
- Probeta de 100mL
- Propipeta
- Tubos de ensayo 25 x 150
- Tubos de ensayo 15 x 150
- Tubos de ensayo 5 x 10

### 3. Equipos

- Balanza analítica Sartorius TE214S
- Centrifugadora IEC Centra CL2
- Equipo Soxhlet
- Mufla Vulcan A550
- Manta térmica Barnstead
- Plancha eléctrica Práctica
- Procesador de alimentos IMACO FP600

### 4. Procedimientos del análisis proximal

#### 4.1. Humedad

Pesar 5 a 8 g. de muestra húmeda en una cápsula de porcelana (previamente secada a 42°C). Colocar la muestra en una estufa de control automático de temperatura con circulación de



aire a  $42^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Al retirar la muestra de la estufa, dejar enfriar en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente y pesar. Volver a introducir la muestra en la estufa durante 30 minutos. Repetir la operación hasta que las variaciones entre dos pesadas sucesivas no excedan 2 mg. Calcular el porcentaje de humedad con la siguiente fórmula

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_i - W_f}{W_i - W_0} \times 100$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la cápsula sin muestra (g)

$W_i$  = Peso de la cápsula de porcelana con muestra fresca (g)

$W_f$  = Peso de la cápsula de porcelana con muestra seca (g)

Expresar la pérdida de peso de la muestra como porcentaje de agua.

#### **4.2. Proteína**

Digestión: Pesar 0.5 g de la muestra en un papel filtro libre de cenizas y agregarla en un balón Kjeldahl de 200 ml, evitando que la muestra quede en el cuello del balón. Adicionar 7.8 g de mezcla catalítica (7 g de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  anhidro y 0.8 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y 13 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Conectar el balón en el equipo de digestión y calentar por 1 hora y 30 minutos hasta que la solución quede color verde claro. Dejar enfriar el balón y agregar 100 ml de agua destilada. Dejar enfriar. Considerar hacer una prueba en blanco con 1 ml de agua destilada.

Destilación: El balón de destilación está constituido por el balón y trampa de Kjeldahl, un refrigerante, alargadera y matraz Erlenmeyer. En el matraz colocar 40 ml de ácido bórico 4% con indicador Tashiro (6 gotas de verde bromocresol y 4 gotas de rojo de metilo). En el balón Kjeldahl, agregar 3-4 trozos de porcelana (rompeburbujas) y 80 ml de NaOH 50%. Conectar el balón al equipo de destilación, de manera que la alargadera quede sumergida en la solución en el matraz. La solución del matraz deberá haber cambiado de rojo a verde azulado

Valoración: Titular la solución del matraz con HCl 0.1 N previamente valorado hasta que se perciba la primera tonalidad roja. Calcular el porcentaje de nitrógeno proteico con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(V_S - V_B) \times N \times 1.401}{W}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

$V_S$  = volumen (ml) de HCl empleado en titular la muestra

$V_B$  = volumen (ml) de HCl empleado en titular el blanco

N = Normalidad del HCl estandarizado

W = Peso de la muestra (g)

F = factor de conversión del nitrógeno en proteína (se empleó el factor 6.25 para este caso)

### 4.3. Grasas

Pesar 5 g de muestra seca en un cartucho de extracción (hecho de papel Whatmann 42) y colocar este en el equipo de extracción Soxhlet. Pesar el balón del equipo (previamente secado a 105°C y enfriado en estufa) y agregar 100 ml de éter etílico. Conectar el balón en el equipo y extraer durante 6 horas a una velocidad de condensación de 5 o 6 gotas por segundo. Recuperar el exceso de éter del balón por evaporación. Terminar el secado del balón en la estufa a 105°C durante 1 hora. Dejar enfriar en el desecador y pesar. Calcular el porcentaje de grasa total con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasas} = \frac{W_f - W_i}{W_0} \times 100$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la muestra (g)

$W_i$  = Peso inicial del balón (g)

$W_f$  = Peso final del balón (g)

#### 4.4. Fibra

De la muestra desengrasada, tomar 2 g y transferirlos a un beaker de 600 ml. Agregar 200 ml de  $H_2SO_4$  1.25% hirviendo y agitar con una bagueta para desintegrar los grumos. Cubrir el vaso con un vidrio de reloj y hervir durante 30 minutos reponiendo con agua destilada las pérdidas de volumen producidas durante la ebullición y evitando que la muestra se adhiera a las paredes internas del beaker. Filtrar la solución caliente a través de un papel filtro Whatmann N°54, lavando el residuo con agua destilada. Pasar el residuo sólido al beaker lavando el papel con 200 ml de NaOH 1.25%- Hervir durante 30 minutos teniendo las mismas consideraciones previas. Filtrar la muestra a través de un papel Whatmann N°54 previamente secado por 15 minutos a 80°C en estufa y pesado. Lavar con agua destilada caliente hasta comprobar con papel tornasol rojo que las aguas del lavado sean neutras. Pesar el papel filtro con muestra e introducir la muestra de fibra en un crisol previamente pesado. Calcinar la muestra en la mufla a 500°C - 550°C durante 5 horas. Pesar el crisol con cenizas.

Calcular el contenido de fibra usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{(C_f - C_i)}{W_0} \times (100 - P)$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la muestra (g)

$C_f$  = Peso del crisol con fibra (g)

$C_i$  = Peso del crisol con cenizas (g)

$P$  = Contenido de grasa de la muestra (%)

#### 4.5. Carbohidratos totales

Pesar 0.01 g de muestra desengrasada en un tubo de ensayo 25 x 150. Agregar 15 ml de HCl 2N, cubrir el tubo con parafilm y calentar en baño maría por 3 horas.

Retirar el tubo, dejar enfriar y agregar  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  poco a poco hasta que no se observe efervescencia. Pasar el contenido a una fiola de 100 ml, lavar el tubo de ensayo y completar con agua destilada. Agitar bien y transferir parte de esta solución a tubos de centrifuga. Centrifugar la muestra y coleccionar 1 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo de 15 x 150. Agregar 5 ml de antrona 0.2% y calentar en baño maría por 12 minutos.

Retirar el tubo de ensayo y enfriar en un baño de hielo. Transferir 200 uL de la muestra a un pozo de la microplaca y leer a 620 nm en el espectrofotómetro dentro de los siguientes 15 minutos. En paralelo, hacer una curva de calibración con soluciones de 0%, 0.002%, 0.004%, 0.006%, 0.008% y 0.010% de glucosa.

A partir de las absorbancias de los estándares de glucosa, ingresar los datos en una hoja de cálculos y hallar el modelo lineal que describan los datos.

$$y = Ax + B$$

Donde:

Y = absorbancia experimental

X = contenido de glucosa en 100 ml de muestra

A, B = valores hallados por el modelo

Para determinar los carbohidratos totales en la muestra, se usa la siguiente fórmula

$$\% \text{ Carbohiratos totales} = \frac{X}{M} \times (100 - P)$$

Donde:

X = glucosa determinada

M = peso de la muestra (g)

P = Contenido de grasa de la muestra (%)

#### 4.6. Cenizas

Pesar 2 g de muestra seca en una cápsula de porcelana (previamente pesada tras haber sido incinerada a 600 °C). Carbonizar previamente la muestra y luego calcinar la muestra a 550°C en la mufla durante 8 horas hasta que las cenizas adquieran un color blanco o grisáceo. Pasar la cápsula a un desecador, dejar enfriar hasta temperatura ambiente y pesar. Calcular el porcentaje de cenizas con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{W_f - W_0}{W_i - W_0} \times 100$$

Donde:

$W_0$  = Peso de la cápsula sin muestra (g)

$W_i$  = Peso de la cápsula de porcelana con muestra seca (g)

$W_f$  = Peso de la cápsula de porcelana con cenizas (g)

#### 4.7. Fósforo

Tomar 0.5 ml de la solución de cenizas y transferirla a una fiola de 10 ml. Agregar 1 ml de buffer\*, 0.1 ml de ácido ascórbico al 1% en ácido oxálico al 0.5 % y 0.5 ml de molibdato de amonio 4.5% en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 13%. Agitar para mezclar, aforar a 10 ml y dejar reposar al menos 30 minutos. Trasladar 200 uL en la microplaca y leer a 660 nm.

\*34 g de acetato de sodio + 57 ml de ácido acético en 1000 mL

Preparar una solución patrón de fósforo disolviendo 0.4398 g de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) puro y seco en 1000 ml de agua destilada. Esta solución contiene 100 ppm de fósforo. A partir de esta solución, preparar estándares de 0, 20, 40, 60 y 80 ppm de fósforo y realizar la curva de calibración.

A partir de las absorbancias de los estándares de fósforo, ingresar los datos en una hoja de cálculos y hallar el modelo lineal que describan los datos.

$$y = Ax + B$$

Donde:

Y = absorbancia experimental

X = contenido de fósforo en 0.5 ml de muestra

A, B = valores hallados por el modelo

Para determinar los carbohidratos totales en la muestra, se usa la siguiente fórmula

$$mg \% Fósforo = \frac{X}{M} \times F \times 100$$

Donde:

X = fósforo determinado en 0.5 ml de muestra

M = peso de la muestra (g)

F = factor de dilución (F = 100)

#### **4.8. Hierro**

Tomar 1 ml de la solución de cenizas y transferirla a una fiola de 10 ml, agregar 6 ml de agua destilada, 0.2 ml de cloruro de hidroxilamina al 10% y mezclar. Agregar 0.5 ml de fenantrolina al 0.3% en metanol, 0.5 ml de buffer\*. Hervir 15 a baño maría y completar el

volumen hasta 10 ml. Trasladar 200 uL de la muestra a la microplaca y leer a 510 nm en el espectrofotómetro.

\*100 g de acetato de amonio / 600 mL agua + 200 mL de ácido acético glacial. Diluir hasta 1000 mL

Preparar una solución patrón de hierro disolviendo 0.8636 g de sal de Mohr ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.FeSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O) puro y seco en 1000 ml de HCl 0.1 N. Esta solución contiene 100 ppm de Fe<sup>+2</sup>. A partir de esta solución, preparar estándares de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 ppm de fósforo y realizar la curva de calibración.

A partir de las absorbancias de los estándares de hierro, ingresar los datos en una hoja de cálculos y hallar el modelo lineal que describan los datos.

$$y = Ax + B$$

Donde:

Y = absorbancia experimental

X = contenido de hierro en 1 ml de muestra

A, B = valores hallados por el modelo

Para determinar los carbohidratos totales en la muestra, se usa la siguiente fórmula

$$mg \% Hierro = \frac{X}{M} \times F \times 100$$

Donde:

X = hierro determinado en 1 ml de muestra

M = peso de la muestra (g)

F = factor de dilución (F=50)

#### 4.9. Calcio

De la solución de cenizas, transferir 5 ml a un tubo de centrífuga de 15 ml. Agregar al tubo 1 ml de acetato de sodio al 20% y 4 gotas de verde bromocresol. Agregar gotas de HCl 6N (si la solución está azul) o NH<sub>4</sub>OH 50% (si la solución está amarilla), hasta que la solución vire a verde. Agregar a cada tubo 1ml de oxalato de amonio al 3

Mezclar y dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente. Centrifugar y decantar la solución sobrenadante. Lavar el precipitado 4 veces con NH<sub>4</sub>OH 2%. Agregar 2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% y disolver el precipitado.

Colocar el tubo en baño maría y, a una temperatura no menor a 70°C. Titular con KMnO<sub>4</sub> 0.01N (previamente valorado) hasta que una débil coloración rosada persista por un minuto. Calcular el contenido de calcio según la siguiente fórmula:

$$mg \% \text{ Calcio} = \frac{(V_S - V_B) \times N \times 20}{W} \times F \times 100$$

Donde:

V<sub>S</sub> = volumen (ml) de KMnO<sub>4</sub> empleado en titular la muestra

V<sub>B</sub> = volumen (ml) de KMnO<sub>4</sub> empleado en titular el blanco

N = Normalidad del KMnO<sub>4</sub> estandarizado

W = Peso de la muestra (g)

F = Factor de dilución (F=10)



## ANEXO 4: MARCHA FITOQUÍMICA

### 1. Reactivos

- Ácido clorhídrico 35% P.A.
- Ácido sulfúrico 97% P.A
- Anhídrido acético P.A
- Cloruro férrico 10%
- Cloruro de mercurio P.A
- Cloruro de sodio 5%
- Gelatina 10%
- Hidróxido de sodio 5%
- Magnesio metálico
- Metanol P.A
- Nitrato de bismuto
- Yoduro de potasio
- Yodo en perlas

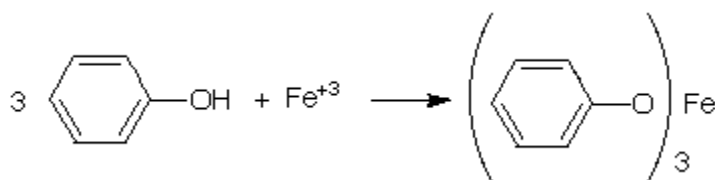
### 2. Instrumentos

- Balón de reflujo de 250 mL
- Beakers de 50 mL
- Embudo de vástago largo
- Gradilla de tubos de ensayo
- Parafilm
- Papel filtro grueso
- Pipetas pasteur de plástico
- Tubos de ensayo 10 x 150

### 3. Procedimientos

#### 3.1. Determinación de compuestos fenólicos (reacción con $\text{FeCl}_3$ )

Se transfirió 1 ml de la solución acuosa en un tubo de ensayo y se agregó gotas de  $\text{FeCl}_3$  10%. La aparición de coloración verde o negra indica la presencia de compuestos fenólicos. El ion férrico reacciona con los grupos fenólicos formando compuestos colores oscuros (Fig. 25).



**Figura 25.** Reacción general de compuestos fenólicos con  $\text{Fe}^{+3}$

#### 3.2. Determinación de saponinas (método de la espuma)

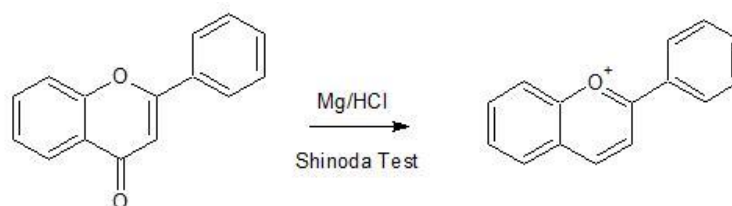
Transferir 0.1 g de muestra seca y pulverizada en un tubo de ensayo. Agregar 1 ml de agua destilada, cubrir con parafilm y agitar la muestra durante 5 minutos. Si se forma una capa de espuma que permanece durante 30 minutos, se considera positivo para saponinas.

#### 3.3. Determinación de taninos (reacción de gelatina-sal)

De la solución metanólica, se toman 3 muestras de 1 ml en 3 tubos de ensayo diferentes. En el primer tubo, agregar 1 ml de  $\text{NaCl}$  5%, en el segundo agregar 1 ml de gelatina 1% y en el tercero agregar 1 ml de una mezcla de gelatina- $\text{NaCl}$ . Si hay precipitación en los tubos de gelatina y de gelatina-sal, se considera positiva la presencia de taninos.

### 3.4. Determinación de flavonoides (método de Shinoda)

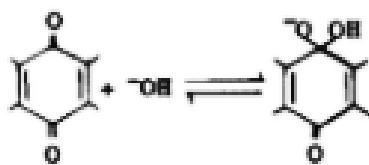
Tomar 1 ml de la solución metanólica y agregar un trozo de magnesio metálico y gotas de HCl concentrado. Si la solución vira a colores rojos, se considera positiva la presencia de flavonoides. (Fig. 26)



**Figura 26.** Reacción general de Shinoda para flavonoides

### 3.5. Determinación de quinonas (método de Bornträger)

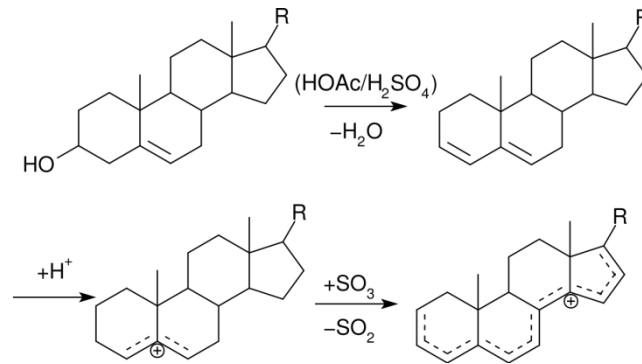
De la solución clorofórmica, tomar 1 ml y agregar 1 ml de NaOH 5%. Si en la fase acuosa vira a color rojo, se considera positiva la presencia de quinonas. La reacción general se muestra a continuación (Fig. 27).



**Figura 27.** Reacción general de Bornträger para el reconocimiento de quinonas

### 3.6. Determinación de esteroides (método de Liebermann-Burchard)

De la solución clorofórmica, tomar 1 ml y agregar 3 ml de una solución reciente de  $\text{Ac}_2\text{O}:\text{H}_2\text{SO}_4$  (50:1). Se observa el desarrollo de color a los 2, 5, 20 y 60 minutos. Si se observa una coloración verde o azul, se considera positiva para la presencia de esteroides (Fig. 28).



**Figura 28.** Reacción de Liebermann-Burchard para el reconocimiento de esteroides

### 3.7. Determinación de alcaloides (métodos de Dragendorff, Mayer y Wagner)

Las reacciones de reconocimiento de alcaloides se desarrollan con el grupo amina protonado. En medio ácido, dicho grupo reacciona con iones hidronio (11).

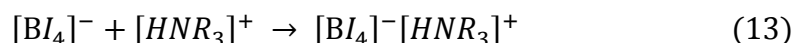
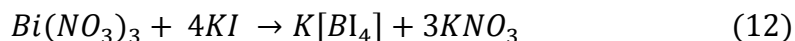


#### Método de Dragendorff:

De la solución ácida, tomar 1 ml y agregar gotas del reactivo de Dragendorff\*. Si la solución vira a color rojo a naranja, se considera positiva la presencia de alcaloides.

\*8 g  $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  / 20 mL  $HNO_3$  + 27.2 g  $KI$  / 50 mL  $H_2O$ . Mezclar, filtrar y diluir hasta 100 mL.

El nitrato de bismuto reacciona con el yoduro de potasio, formando bismuyoduro de potasio: (12), el cual formará sales color rojizo en presencia de alcaloides en medio ácido (13)

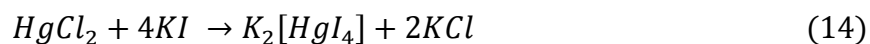


#### Método de Mayer:

De la solución ácida, tomar 1 ml y agregar gotas del reactivo de Mayer\*. Si la solución vira a color blanco a crema, se considera positiva la presencia de alcaloides.

\*1.36 g  $HgCl_2$  / 60 mL  $H_2O$  + 5 g  $KI$  / 10 mL  $H_2O$ . Mezclar y diluir hasta 100 mL.

El reactivo de Mayer se forma al preparar cloruro de mercurio con yoduro de potasio (14): El ion mercuyoduro precipita en sales cremas con las aminas protonadas de los alcaloides (15).



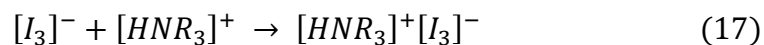
Método de Wagner:

De la solución ácida, tomar 1 ml y agregar gotas del reactivo de Wagner\*. Si la solución vira a color marrón, se considera positiva la presencia de alcaloides.

\*1.27 g I<sub>2</sub> + 2 g KI / 5 mL H<sub>2</sub>O. Mezclar y diluir hasta 100 mL.

El reactivo de Wagner se prepara con KI y I<sub>2</sub> en medio acuoso, formando el ion triyoduro I<sub>3</sub><sup>-</sup>

(16) Este anión forma sales con los alcaloides:



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura general de flavanoles y algunos sustituyentes	8
<b>Figura 2.</b> Estructuras de esteroides reportados en <i>L. meyenii</i>	8
<b>Figura 3.</b> Alcaloides reportados en <i>L. meyenii</i>	9
<b>Figura 4.</b> Estructura general de glucosinolatos	9
<b>Figura 5.</b> Productos de degradación de glucosinolatos	11
<b>Figura 6.</b> Macamidas reportadas en <i>L. meyenii</i>	12
<b>Figura 7.</b> Macaeno reportado en <i>L. meyenii</i>	12
<b>Figura 8.</b> Esquema propuesto para la biosíntesis de macamidas y macaenos a partir de glucosinolatos	13
<b>Figura 9.</b> Proceso de selección y preparación de los hipocótilos	16
<b>Figura 10.</b> Distribución de la muestra biológica para los análisis químicos	17
<b>Figura 11.</b> Procedimiento general del análisis proximal	18
<b>Figura 12.</b> Hidrólisis de almidón (polisacárido) en unidades de glucosa	20
<b>Figura 13.</b> Deshidratación de glucosa en 5-hidroxiacetilfurfural	20
<b>Figura 14.</b> Reacción de hidroximetil furfural con la antrona	20
<b>Figura 15.</b> Formación del complejo entre iones $Fe^{+2}$ y o-fenantrolina	22
<b>Figura 16.</b> Determinación de metabolitos secundarios en hipocótilos de <i>L. meyenii</i> (Basado en Lock, 2016)	24
<b>Figura 17.</b> Distribución de las zonas de colecta de hipocótilos de <i>L. meyenii</i> . Se muestran los puntos: A: Achipampa, B: Junín, C: Ninacaca	41
<b>Figura 18.</b> Hipocótilos de <i>L. meyenii</i> . Se muestran los hipocótilos por procedencia y colores: A: Achipampa, B: Ninacaca, C: Junín.	42
<b>Figura 19.</b> Pesos frescos de hipocótilos de <i>L. meyenii</i> . Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre accesiones.	43
<b>Figura 20.</b> Análisis proximal de hipocótilos de <i>L. meyenii</i> Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre accesiones.	44
<b>Figura 21.</b> Análisis proximal (fósforo, hierro, calcio) de hipocótilos de <i>L. meyenii</i> Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre accesiones.	45

<b>Figura 22.</b> Ordenamiento de las accesiones según los parámetros del análisis proximal. Se muestra la salida gráfica del análisis de componentes principales (PCA)	46
<b>Figura 23.</b> Representación gráfica de la similitud entre accesiones para cada componente. (A) PC1 (proteínas, fibra, calcio), (B) PC2 (fósforo, hierro). Las letras sobre las barras representan la diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las procedencias.	47
<b>Figura 24.</b> Reacción de Shinoda para la determinación de flavonoides en extracto metanólico de <i>L. meyenii</i> . De izquierda a derecha: AA, AM, AN, JA, JM, JN, JR, NA, NM, NN, NR y metanol. Se observa que la coloración para la accesión AM difiere de JN y NM, a pesar de ser el mismo color de hipocótilo.	48
<b>Figura 25.</b> Reacción general de compuestos fenólicos con $Fe^{+3}$	66
<b>Figura 26.</b> Reacción general de Shinoda para flavonoides	67
<b>Figura 27.</b> Reacción general de Bornträger para el reconocimiento de quinonas	67
<b>Figura 28.</b> Reacción de Liebermann-Burchard para el reconocimiento de esteroides	68



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Análisis proximal en 100 g de material seco de <i>L. meyenii</i> .	7
<b>Tabla 2.</b> Ejemplos de sustituyentes R en glucosinolatos	10
<b>Tabla 3:</b> Descripción del área de estudio por distrito y localización	14
<b>Tabla 4.</b> Lista de accesiones utilizadas en el análisis químico de hipocótilos de <i>L. meyenii</i>	15
<b>Tabla 5.</b> Pruebas químicas cualitativas empleadas para determinar los metabolitos secundarios de <i>L. meyenii</i>	25
<b>Tabla 6.</b> Características generales de hipocótilos de <i>L. meyenii</i> . Se presentan los promedios ( $\pm$ error estándar) por zonas, colores y accesiones. Las letras representan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre accesiones.	49
<b>Tabla 7.</b> ANOVA de efectos principales para evaluar el efecto de la procedencia y color de sobre los pesos de hipocótilo en las parcelas de Achipampa, Junín y Ninacaca.	49
<b>Tabla 8.</b> ANOVA de dos vías con interacción para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los parámetros del análisis proximal para las parcelas de Junín y Ninacaca.	49
<b>Tabla 9..</b> Estadística descriptiva del análisis proximal de hipocótilos de <i>L. meyenii</i> . Se presentan los promedios por zonas [Achipampa (A), Junín (J), Ninacaca (N)], colores [Amarillo (A*), morado (M), negro (N*), rojo (R)] y por accesiones. Se reportan los valores promedio $\pm$ error estándar.	50
<b>Tabla 10.</b> ANOVA de efectos principales para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los parámetros del análisis proximal en las parcelas de Achipampa, Junín y Ninacaca.	51
<b>Tabla 11.</b> Matriz de correlación de Pearson entre las variables del análisis proximal de hipocótilos de <i>L. meyenii</i> de las 11 accesiones de estudio. Se muestra el coeficiente de correlación (r) con (*) según su significancia.	51

<b>Tabla 12.</b> Factores de carga del PCA de las variables de proteína, fibra, carbohidratos totales, cenizas, fósforo, hierro y calcio. Los valores reportados son coeficientes de correlación. En negrita se resalta las variables que contribuyen en mayor grado a cada componente principal.	52
<b>Tabla 13.</b> ANOVA de efectos principales para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los 2 componentes principales del PCA. Los valores significativos se muestran en negrita.	52
<b>Tabla 14. Tabla 14.</b> MANOVA y ANOVA's univariados para evaluar el efecto de la procedencia sobre los 2 componentes principales del PCA. Los valores significativos se muestran en negrita	52
<b>Tabla 15.</b> ANOVA de dos vías con interacción para evaluar el efecto de la procedencia y color de hipocótilo sobre los parámetros del análisis proximal para las parcelas de Junín y Ninacaca.	53
<b>Tabla 16.</b> Características químicas de los suelos de las procedencias de Achipampa (A), Junín (J) y Ninacaca (N)	53
<b>Tabla 17.</b> Determinación cualitativa de metabolitos secundarios de los hipocótilos de <i>L. meyenii</i> . Se presentan las pruebas químicas utilizadas.	54
<b>Tabla 18.</b> Valores de R <sub>f</sub> para la cromatografía de papel para el análisis de antocianinas de <i>L. meyenii</i> .	54