

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



“EFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO POST-COSECHA EN LA SÍNTESIS  
DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE  
DE MASHUA MORADA (*Tropaeolum tuberosum*)”

Presentada por:

BLGA. MÓNICA LUCÍA SANTAYANA RIVERA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Lima – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

ESCUELA DE POST-GRADO

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“Efecto del estrés abiótico post-cosecha en la síntesis de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum*)”

Presentado por:

Bлга. Mónica Lucía Santayana Rivera

Tesis para optar el título profesional de:

MAGÍSTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Mg. Sc. Beatriz Hatta Sakoda

PRESIDENTE

---

Dra. Rosana Chirinos Gallardo

PATROCINADORA

---

Dra. Indira Betalleluz Pallardel

CO-PATROCINADORA

---

Dra. Ana Aguilar Gálvez

MIEMBRO

---

Dr. David Campos Gutiérrez

MIEMBRO

## DEDICATORIA

*A Wally y Jurgen, se les extraña.*

*Gracias por tanta felicidad.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, todos mis logros son gracias a él.

A mi familia por inculcarme los valores que me definen actualmente.

A mis asesoras, la Profesora Rosana Chirinos y la Profesora Indira Betalleluz por la confianza depositada en mí para el desarrollo de esta investigación y su apoyo en todo momento. Agradezco particularmente la comprensión de ambas y la paciencia durante este proceso.

Al Mg. Sc. Iván Manrique, curador de Raíces y Tuberosas Andinas del Centro Internacional de la Papa (CIP), por apoyarme con ideas de tesis y brindarme amablemente el germoplasma de mashua para poder realizar esta investigación.

A los miembros de mi comité consejero: el Dr. David Campos, la Profesora Ana Aguilar y a la Mg. Sc. Beatriz Hatta por el tiempo dedicado a revisar esta investigación, sus consejos y la motivación a lo largo de la maestría.

A los miembros del IBT, especialmente a Adelaida Pardo y Martín Aquino por su orientación y ayuda durante la fase experimental.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto “Análisis proteómico y metabolómico focalizado de tubérculos de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) sometidos a estreses abióticos post-cosecha: énfasis en las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de glucosinolatos y antioxidantes” (Contrato N° 189-PNICP-PIAP-2015).

# ÍNDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| ÍNDICE GENERAL.....  |    |
| ÍNDICE DE CUADROS.....   |    |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....   |    |
| ÍNDICE DE ANEXOS.....  |    |
| RESUMEN .....  |    |
| ABSTRACT.....  |    |
| I. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA .....   | 3  |
| 2.1 La Mashua.....   | 3  |
| 2.1.1 Taxonomía y distribución.....  | 3  |
| 2.1.2 Sistemas de cultivo, cosecha y post-cosecha .....  | 4  |
| 2.1.3 Valor nutricional y propiedades medicinales.....   | 5  |
| 2.2 Metabolitos secundarios .....  | 7  |
| 2.2.1 Compuestos fenólicos.....  | 8  |
| 2.2.2 Terpenoides / isoprenoides .....   | 12 |
| 2.2.3 Alcaloides y glucosinolatos.....   | 13 |
| 2.3 Capacidad antioxidante.....  | 13 |
| 2.4 Estrés oxidativo en plantas .....  | 15 |
| 2.4.1 Síntesis de flavonoides bajo estrés abiótico.....  | 17 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 19 |
| 3.1 Material vegetal.....  | 19 |
| 3.2 Procesamiento de muestras.....   | 19 |
| 3.3 Materiales, equipos y reactivos.....   | 21 |
| 3.3.1 Reactivos.....   | 21 |
| 3.3.2 Equipos .....  | 22 |
| 3.3.3 Materiales.....  | 22 |
| 3.4 Métodos de análisis .....  | 23 |
| 3.4.1 Determinación de humedad .....   | 23 |
| 3.4.2 Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) .....  | 23 |
| 3.4.3 Extracción y cuantificación de antocianinas totales (ACYT) .....   | 23 |
| 3.4.4 Determinación de capacidad antioxidante hidrofílica (ABTS) .....   | 24 |
| 3.4.5 Determinación de capacidad antioxidante (ORAC).....  | 24 |
| 3.4.6 Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de ultra performance ..... | 24 |

|  |    |
|--|----|
| 3.4.7 Determinación del perfil de antocianinas mediante cromatografía líquida de ultra performance .....                 | 25 |
| 3.5 Análisis estadístico .....   | 26 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 27 |
| 4.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y determinación de perfil de compuestos fenólicos no antocianos ..... | 27 |
| 4.2 Cuantificación de antocianinas totales y determinación del perfil de antocianinas .....                              | 36 |
| 4.3 Capacidad antioxidante hidrofílica .....   | 43 |
| V. CONCLUSIONES.....   | 53 |
| VI. RECOMENDACIONES .....  | 55 |
| VIII. ANEXOS .....   | 66 |

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Información nutricional de la mashua, oca y arracacha.....  | 5  |
| Cuadro 2. Condiciones promedio de temperatura (°C) y humedad relativa (%) de los tres tratamientos post-cosecha evaluados.....  | 20 |
| Cuadro 3. Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos no antocianos encontrados en los tubérculos del genotipo ARB5241.....                                       | 30 |
| Cuadro 4. Concentración de los principales compuestos fenólicos no antocianos encontrados en los tubérculos del genotipo ARB5241 durante los tratamientos post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra. .... | 32 |
| Cuadro 5. Características cromatográficas y espectrales de las principales antocianinas encontradas en los tubérculos del genotipo ARB5241. Las lecturas se hicieron a 520 nm.....                          | 39 |
| Cuadro 6. Concentración de las principales antocianinas encontradas en los tubérculos del genotipo ARB5241 durante los tratamientos post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra.....                        | 41 |
| Cuadro 7. Capacidad antioxidante específica para cada tratamiento post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada.....   | 47 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. <i>Tropaeolum tuberosum</i> accesión ARB5241. a) Porte de la planta, b) corte transversal del tubérculo.....  | 3  |
| Figura 2. Interacción entre las vías del metabolismo primario y secundario.....   | 8  |
| Figura 3. Esquema de las vías involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos.....  | 9  |
| Figura 4. Estructura básica de la antocianidina, núcleo flavilio.....   | 10 |
| Figura 5. Temperaturas internas máximas y mínimas registradas a partir de seis tubérculos de mashua para cada tratamiento post-cosecha.....   | 20 |
| Figura 6. Evolución del contenido de compuestos fenólicos totales para los diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada.....  | 28 |
| Figura 7. Perfil cromatográfico a 280 nm de los compuestos fenólicos no antocianos principales de la accesión ARB5241 de mashua morada bajo distintos tratamientos post-cosecha.....                      | 32 |
| Figura 8. Evolución del contenido total de los compuestos fenólicos determinados por cromatografía líquida UPLC®-PAD para los diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada..... | 33 |
| Figura 9. Evolución del contenido de antocianinas totales para diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada.....  | 36 |
| Figura 10. Evolución del perfil cromatográfico a 520 nm de las antocianinas principales del genotipo ARB5241 de mashua morada bajo distintos tratamientos post-cosecha.....                               | 40 |
| Figura 11. Evolución del contenido de antocianinas totales para diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada determinado por UPLC®-PDA.....                                     | 42 |
| Figura 12. Evolución de la capacidad antioxidante hidrofílica (CAH) para cada tratamiento post-cosecha del genotipo ARB524. a) Mediante la metodología ABTS y b) Mediante la metodología ORAC.....        | 45 |



## ÍNDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| Anexo 1. Compuestos fenólicos totales (CFT) para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241.....   | 66 |
| Anexo 2. Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de CFT con los factores tratamiento post-cosecha, día y la interacción de ambos como fuentes de variación.....        | 66 |
| Anexo 3. Contenido de antocianinas totales (ACYT) para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241.....   | 67 |
| Anexo 4. Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de ACYT con los factores tratamiento post-cosecha, día y la interacción de ambos como fuentes de variación.....       | 67 |
| Anexo 5. Capacidad antioxidante ABTS para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241.....  | 68 |
| Anexo 6. Capacidad antioxidante ORAC para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241. ....   | 68 |
| Anexo 7. Correlaciones entre el perfil de compuestos fenólicos y antocianinas determinados por UPLC® con el contenido de CFT, ACYT y CAH bajo el tratamiento soleado.....     | 69 |
| Anexo 8: Correlaciones entre el perfil de compuestos fenólicos y antocianinas determinados por UPLC® con el contenido de CFT, ACYT y CAH bajo el tratamiento refrigerado..... | 70 |
| Anexo 9: Correlaciones entre el perfil de compuestos fenólicos y antocianinas determinados por UPLC® con el contenido de CFT, ACYT y CAH bajo el tratamiento sombra.....      | 71 |

## RESUMEN

La mashua, *Tropaeolum tuberosum*, es un cultivo andino que produce tubérculos con un alto contenido de compuestos fenólicos y glucosinolatos. La síntesis de estos metabolitos secundarios está influenciada por el estrés abiótico durante su etapa vegetativa y post-cosecha. Es importante identificar el efecto del manejo post-cosecha en la síntesis de metabolitos secundarios para la obtención de tubérculos con una mayor concentración de compuestos fenólicos de interés funcional. En la presente investigación, los tubérculos de mashua morada (genotipo ARB5241) se almacenaron bajo tres tipos de estrés abiótico post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra. Cada tres días y durante quince días, se evaluaron el contenido de compuesto fenólicos totales (CFT), antocianinas totales (ACYT), capacidad antioxidante hidrofílica (CAH) y el perfil de compuestos fenólicos y antocianinas mediante cromatografía UPLC®-PDA. El valor más alto de CFT y ACYT se obtuvo para el tratamiento sombra a los 12 días con 14,9 mg ácido gálico equivalente (AGE)·g ms<sup>-1</sup> y 3,7 mg delfinifina 3-glucósido equivalente (DGE)·g ms<sup>-1</sup>, respectivamente. Los máximos valores de CAH resultaron, según las metodologías ORAC y ABTS, al día 12 del tratamiento sombra con 215,3 μmol TE·g ms<sup>-1</sup> y al día 3 del tratamiento refrigerado con 256,4 μmol TE·g ms<sup>-1</sup>, respectivamente. En el tratamiento soleado la disminución de CFT fue progresiva a partir del tercer día y la disminución de ACY fue inmediata desde el inicio del tratamiento llegando a valores de 3,5 mg AGE·g ms<sup>-1</sup> y 0,29 mg DGE·g ms<sup>-1</sup>, respectivamente. Entre los compuestos fenólicos no antocianos identificados por UPLC® se encontró el ácido gálico y se detectó derivados de la familia de los flavanoles y flavonoles, un derivado de ácido cinámico y derivados de ácidos hidroxibenzoicos. Por otro lado se identificó a la antocianina delfinidina 3-glucósido y se detectó derivados de delfinidina, pelargonidina y cianidina. La CAH se correlacionó fuertemente con el contenido de ACYT para los tratamientos soleado y sombra de forma negativa y positiva, respectivamente; indicando que la evolución de estos compuestos afecta directamente a la capacidad antioxidante de los tuberculos de mashua.

Palabras clave: Mashua, metabolitos secundarios, post-cosecha, compuestos fenólicos, antocianinas, capacidad antioxidante.

## ABSTRACT

Mashua, *Tropaeolum tuberosum*, is an Andean crop that produces tubers with a high content of phenolic compounds and glucosinolates. The synthesis of these secondary metabolites is highly affected by abiotic stress during its vegetative phase and post harvest manipulation. Thus it is important to characterize its effect on the synthesis of phenolic compounds to increase the functional qualities of mashua tubers. In this thesis mashua tubers (ARB5241 genotype) were subjected to three abiotic stress types: sunny, refrigerated and shade. Each three days during fifteen days the total phenolic content (CFT), total anthocyanins (ACYT), hydrophilic antioxidant capacity (HAC) and the phenolic and anthocyanin profiles through UPLC®-PDA were evaluated. The highest values of CFT and ACYT were at 12 days of the shade treatment with 14,9 mg gallic acid equivalent (AGE)·g ms<sup>-1</sup> and 3,7 mg delphinidin 3-glucoside equivalent (DGE)·g ms<sup>-1</sup>, respectively. The highest values for HAC were at 12 days of shade treatment with 215,3 μmol TE·g ms<sup>-1</sup> and at 3 days of refrigerated treatment with 256,4 μmol TE·g ms<sup>-1</sup> for ORAC and ABTS, respectively. In the sunny treatment, CFT decreased after the third day of treatment and ACYT decreased from the first day, reaching 3,5 mg AGE·g ms<sup>-1</sup> and 0,29 mg DGE·g ms<sup>-1</sup> respectively. Among the non-anthocyanin phenolic compounds, gallic acid was identified by UPLC® and flavanols, flavonols, cinnamic acid and hydroxybenzoic acid derivatives were detected. Among anthocyanins, delphinidine 3-glucoside was identified and delphinidin, cyanidin and pelargonidin derivatives were detected. The HAC correlated strongly with the content of ACYT for the sunny and shade treatments in a negative and positive way respectively, indicating that the evolution of these compounds directly affect the antioxidant capacity of the mashua tubers.

Key words: Mashua, secondary metabolites, post harvest, phenolic compounds, anthocyanins, antioxidant capacity.

## I. INTRODUCCIÓN

La mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) es una planta herbácea perenne originaria de la región andina. Se distribuye desde Colombia hasta el norte de Argentina desde los 2400 hasta 4300 msnm (Manrique *et al.*, 2014). Este cultivo tiene un elevado contenido de proteínas (mayores a los de la papa, la oca y el olluco), carbohidratos, fibra y ácido ascórbico (vitamina C). Asimismo, contiene una elevada concentración de metabolitos secundarios como los glucosinolatos aromáticos y los compuestos fenólicos antioxidantes (Manrique *et al.*, 2014; Chirinos *et al.*, 2007a).

Los antioxidantes son sustancias que neutralizan a las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno llamadas también radicales libres (Devasagayam *et al.*, 2004). Existe evidencia que relaciona el consumo de alimentos con una alta capacidad antioxidante con una menor incidencia de múltiples enfermedades, cáncer y la desaceleración del proceso de envejecimiento (Dudonné *et al.*, 2009). En la medicina folclórica de los Andes, la mashua es utilizada por sus propiedades antibióticas, insecticidas, nematicidas, anticancerígenas y diuréticas.

En los tubérculos de mashua se ha cuantificado un contenido importante de fenólicos totales, 9-21 mg·g ms<sup>-1</sup> (materia seca) (Chirinos *et al.*, 2007a). Estos valores son comparables e incluso mayores a cultivos reconocidos por su alto contenido de compuestos fenólicos como las moras (12,1-23,1 mg·g ms<sup>-1</sup>), frambuesa (3,7-16,25 mg·g ms<sup>-1</sup>) y fresas (9,4-13,9 mg·g ms<sup>-1</sup>) (Wang y Lin, 2000).

Así mismo, Campos *et al.* (2006) encontraron que la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y carotenoides de la mashua es significativamente mayor que otros tubérculos andinos como la papa nativa (*Solanum tuberosum* ssp. andigena), oca (*Oxalis tuberosa*) y olluco (*Ullucus tuberosus*). Chirinos *et al.* (2007b)

optimizó las condiciones de extracción para compuestos fenólicos, antocianinas y flavanoles en mashua para su aprovechamiento en la industria de nutraceúticos.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que pueden ser sintetizados por las plantas como respuesta de defensa frente al ataque de animales herbívoros, pestes y varios patógenos. El estrés abiótico causado por variaciones en temperatura, radiación ultravioleta, golpes de calor, estrés hídrico o daños físicos pueden incrementar la síntesis de metabolitos secundarios (Cisneros-Zevallos, 2003). Por esta razón, el estrés abiótico como tratamiento controlado puede ser utilizado en la industria de alimentos para incrementar la concentración de metabolitos secundarios y así mismo incrementar sus efectos benéficos para consumo directo, procesado o para la fabricación de suplementos nutraceúticos (Cisneros-Zevallos, 2003).

Es importante estudiar el efecto del estrés abiótico durante la fase de desarrollo de la planta y durante el manejo post-cosecha para tener pautas de manejo que permitan obtener tubérculos con un mayor contenido de metabolitos secundarios y compuestos antioxidantes. Este tema ha sido explorado previamente en el tubérculo de la mashua sin embargo en esta investigación se pretende profundizar y evaluar los efectos de distintos tratamientos post-cosecha sobre el conjunto y perfil de compuestos fenólicos.

El conocimiento generado por este estudio contribuirá a la revalorización de la mashua y establecerá pautas para su manejo post-cosecha. La revalorización y uso de cultivos alternativos tiene ventajas a nivel de la seguridad alimentaria por los beneficios que trae la diversificación de la dieta. Así mismo, una mayor utilización de los recursos genéticos oriundos del Perú es importante para la conservación de la biodiversidad para el futuro.

Los objetivos que se persiguen en esta tesis es determinar el efecto de los tratamientos post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra en la síntesis de los metabolitos secundarios, antocianinas y compuestos fenólicos; y su capacidad antioxidante hidrofílica en el genotipo ARB5241 de mashua morada. Así como determinar la evolución del perfil de antocianinas y compuestos fenólicos mediante cromatografía UPLC®-PDA.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 La Mashua

#### 2.1.1 Taxonomía y distribución

La mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) es una planta herbácea perenne que produce tubérculos comestibles de alto valor nutricional e importantes propiedades medicinales (Manrique *et al.*, 2014; Grau *et al.*, 2003). Taxonómicamente es una Angiosperma, perteneciente al orden Brassicales, familia Tropaeolaceae (Ortega *et al.*, 2007). En la Figura 1 se puede observar el hábito de la planta en floración y el tipo de tubérculo. Otros nombres comunes son maswa, isaño, cubio o navo y su uso depende de la región, por ejemplo, en la sierra central y sur son más utilizados los nombres mashua e isaño, respectivamente (Grau *et al.*, 2003).



**Figura 1.** *Tropaeolum tuberosum* accesión ARB5241. a) Porte de la planta, b) corte transversal del tubérculo.

**FUENTE:** Manrique *et al.* (2014).

Especies silvestres (*T. tuberosum* subsp *silvestre*) y domesticadas (*T. tuberosum* subsp *tuberosum*) se han encontrado en los Andes desde Colombia hasta el noroeste de Argentina entre los 2400 – 4300 msnm. Es posible que el proceso de domesticación se haya dado en el área comprendida entre la región de Ecuador y Bolivia debido a la gran diversidad encontrada en esta área (Manrique *et al.*, 2014; Grau *et al.*, 2003).

### **2.1.2 Sistemas de cultivo, cosecha y post-cosecha**

El ciclo de cultivo de la mashua puede ser de seis a nueve meses. A partir de los tres meses empieza la floración, uno o dos meses más tarde la producción de semilla y a partir de los siete meses es posible cosechar los tubérculos. La propagación es clonal seleccionando tubérculos que servirán como semilla asexual la siguiente temporada de siembra (Grau *et al.*, 2003).

La mashua es un componente fundamental de los sistemas tradicionales de cultivo. El sistema de producción agrícola en los Andes se basa en la rotación y en el policultivo. En la rotación de cultivos, la mashua junto con la oca y el ulluco se siembran en pequeñas parcelas de monocultivo antes o después de la cebada, habas o chocho. En policultivo, la mashua se intercala con otros tubérculos como la papa, oca o ulluco o con otros cultivos como haba, quinua o chocho. En altitudes más bajas, como en los valles interandinos del Ecuador (altitud inferior a 3000 msnm), la mashua es intercalada con maíz y calabaza. La mashua también es utilizada como cerco en las filas fronterizas de los campos de cultivo pues se cree que esta práctica repele a las plagas (Grau *et al.*, 2003).

A menudo los agricultores cosechan la mashua progresivamente, de acuerdo a sus necesidades, a veces dejando tubérculos en el suelo durante varias semanas hasta el periodo de cosecha normal. Estos tubérculos pueden mantenerse en el suelo durante 1-2 meses después de la completa madurez sin deteriorarse. Es posible que la resistencia al deterioro y enfermedades se deba a su contenido de glucosinolatos y a las bajas temperaturas de las regiones donde es cultivada y se suele almacenar (Ramallo *et al.*, 2004).

Las prácticas post-cosecha incluyen la limpieza de los tubérculos para eliminar la tierra (en

caso sea cosechado de suelo mojado y/o arcilloso), la clasificación de los tubérculos según el tamaño y el color, y la eliminación del material golpeado o rasgado. En el Perú los tubérculos son comúnmente llevados al aire libre en montones y tradicionalmente se cubren con una capa de hierba seca ichu (*Stipa ichu* (R. & P.) Kunth) o de rafia (fibra sintética). Esta capa es de unos pocos centímetros de espesor, lo suficiente para mantener a los tubérculos en la oscuridad y aislarlos contra las heladas nocturnas y las temperaturas altas del día. La variación de la temperatura por debajo de la cubierta es pequeña y oscila alrededor de la temperatura ambiente promedio (Grau *et al.*, 2003).

Antes del consumo de los tubérculos de mashua, estos se exponen a la luz solar directa durante unos días para mejorar la dulzura y la palatabilidad. Esta práctica aumenta el contenido de azúcar probablemente mediante la inducción de la degradación del almidón; aunque también puede reducir el contenido de glucosinolatos (Grau *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Valor nutricional y propiedades medicinales

Espin *et al.* (2004) realizaron un estudio nutricional de las raíces y tubérculos andinos. En el Cuadro 1 se puede observar las principales características nutricionales de los cultivos que presentaban mayor representatividad en número de accesiones. Los valores para mashua, oca y arracacha fueron promedios de 68, 46 y 31, accesiones respectivamente.

**Cuadro 1.** Información nutricional de la mashua, oca y arracacha

|                         | <b>Mashua</b> | <b>Oca</b>    | <b>Arracacha</b> |
|-------------------------|---------------|---------------|------------------|
| Materia seca (%)        | 7,20 - 19,70  | 13,14 - 27,64 | 8,69 – 24,38     |
| Energía (kcal/g)        | 4,13 - 4,25   | 3,87 - 4,05   | 3,73 – 4,01      |
| Proteína (%)            | 7,22-13,99    | 3,39 - 5,49   | 2,95 – 9,04      |
| Almidón (%)             | 20,01 - 79,46 | 28,28 - 45,89 | 48,55 – 85,58    |
| Azúcar Total (%)        | 6,77 - 55,23  | 4,27          | 3,82 – 15, 22    |
| Azúcares reductores (%) | 6,41 - 45,29  | 2,16 - 12,72  | 1,73 - 3,48      |

**FUENTE:** Espin *et al.* (2004)

El Instituto Nacional de Salud (INS Perú, 2009) indica que la mashua posee un contenido de Vitamina C de 77,5 mg/100g, este valor es superior al de la oca (30-32 mg/100g), arracacha (27,10 mg/100g) y tubérculos conocidos como la papa (8-27,13 mg/100g) o yuca (22,70 mg/100g).



A parte de sus características nutricionales, la mashua es importante por su contenido de compuestos fenólicos y glucosinolatos. Dependiendo del genotipo de mashua, amarilla o negra, el contenido de compuestos fenólicos comprende entre 10,9 – 57,4 mg AGE·g ms<sup>-1</sup> y el contenido de antocianinas entre 0 – 13,6 mg cianidina 3-glucósido equivalente (CGE)·g ms<sup>-1</sup>. La correspondiente capacidad antioxidante hidrofílica determinada por el método ORAC fue 165 - 601 μmol TE·g ms<sup>-1</sup> (Chirinos *et al.*, 2008b).

Estos valores de compuestos fenólicos son comparables e incluso mayores a cultivos reconocidos por su alto contenido de compuestos fenólicos como las moras (12,1-23,1 mg·g ms<sup>-1</sup>), frambuesa (3,7-16,25 mg·g ms<sup>-1</sup>) y fresas (9,4-13,9 mg·g ms<sup>-1</sup>) (Wang y Lin, 2000). Los valores ORAC para la mayoría de bayas (*berries*) se encuentra entre 35-162,1 μmol TE g<sup>-1</sup> bs (Chirinos *et al.*, 2007a).

En un estudio realizado por Campos *et al.* (2006) compararon la capacidad antioxidante de cuatro cultivos andinos. La mashua obtuvo el valor más alto 955-9800 μg TE g bh<sup>-1</sup>, seguido de la papa nativa 860-3780 μg TE g bh<sup>-1</sup>, la oca 1637-4771 μg TE g bh<sup>-1</sup> y el olluco, 483-1524 μg TE g bh<sup>-1</sup>.

El sabor fuerte de la mashua se debe a su alto contenido de glucosinolatos. Según la variedad de mashua la concentración de glucosinolatos comprende entre 36,5 – 90 μmol g ms<sup>-1</sup> y supera a otras crucíferas reconocidas por su contenido de glucosinolatos como la acelga con 11 – 53 μmol g ms<sup>-1</sup> y la col con 10,9 y 17 μmol g ms<sup>-1</sup> (Cartea *et al.*, 2008). El tipo de glucosinolato encontrado en mashua es el aromático: *p* – metoxibenzil glucosinolato (glucoaubrietin) (Ramallo *et al.*, 2004). Este tipo de compuestos son importantes por su actividad fungicida, bactericida, nematicidas y anticancerígenas (Prakash y Gupta, 2012; Grau *et al.*, 2003).

La mashua es reconocida por sus propiedades antiafrodisiacas, inductoras de la menstruación, se le recomienda para el tratamiento de enfermedades renales, dolor hepático, eczemas y algunos tipos de cáncer. También tiene propiedades antifúngicas, insecticidas, nematicidas, antibióticas y diuréticas. Es posible que estas propiedades estén relacionadas con el contenido de glucosinolatos y compuestos fenólicos en los tubérculos (Ramallo *et al.*, 2004; Grau *et al.*, 2003).

## **2.2 Metabolitos secundarios**

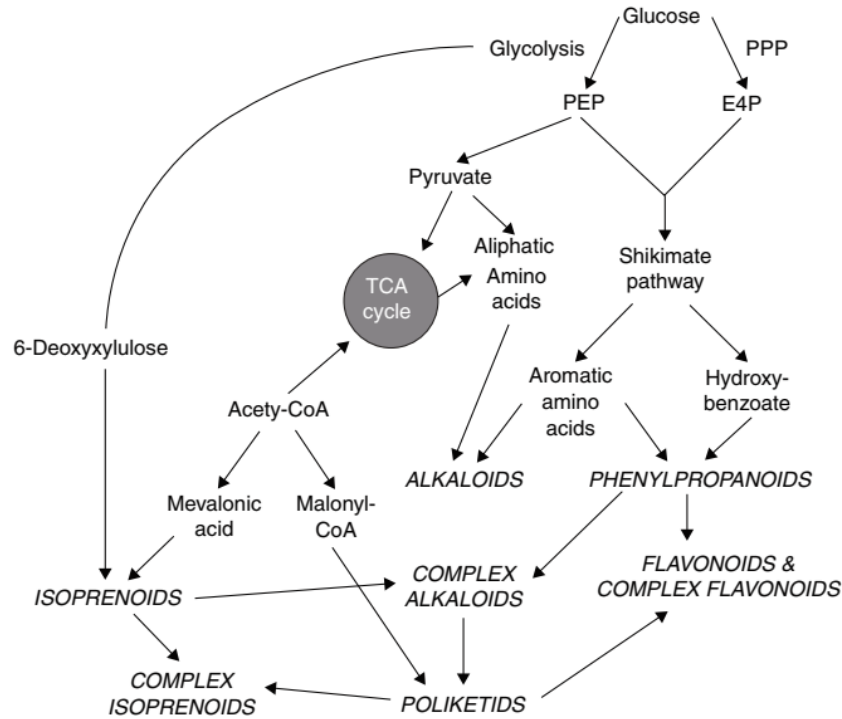
Las plantas vasculares contienen una infinidad de compuestos químicos distintos a los intermediarios y productos primarios del metabolismo. A estos compuestos se les conoce como metabolitos secundarios y son los responsables de otorgar el olor, color y sabor característicos a las plantas. La distribución de estos compuestos permite que sean usados como marcadores taxonómicos (Bennet y Wallsgrove, 1994).

A pesar de ser llamados metabolitos secundarios juegan un importante rol en la etapa de madurez de la planta pues forman parte de distintos mecanismos de defensa o reproductivos (Bennet y Wallsgrove, 1994). La capacidad de sintetizar metabolitos secundarios ha sido sujeta a selección natural durante la evolución del reino vegetal y por esta razón estos metabolitos abordan necesidades específicas. Por ejemplo, los compuestos volátiles aromáticos y los pigmentos han evolucionado para atraer a los insectos polinizadores. La capacidad de sintetizar químicos tóxicos ha evolucionado para repeler a los patógenos y herbívoros (desde microorganismos hasta insectos y mamíferos) o para suprimir el crecimiento de las plantas vecinas. Otros productos químicos cumplen funciones celulares que son exclusivas de la planta particular en la que se producen (por ejemplo, resistencia a salinidad o sequía) (Pichersky y Gang, 2000)

Durante los últimos miles de años, los metabolitos secundarios se han utilizado para propósitos, tales como tintes, sabores, fragancias, estimulantes, alucinógenos, insecticidas, y como agentes terapéuticos. En los últimos años ha habido un mayor interés en su producción ya que muchas investigaciones señalaron que la ingesta modesta y a largo plazo de estos compuestos previene la incidencia de cánceres y muchas enfermedades crónicas. Actualmente, ramas de la ciencia como la ingeniería metabólica y/o, biotecnología vegetal tienen como objetivo re-direccionar los flujos de carbono desde las vías del metabolismo primario hacia el metabolismo secundario sin afectar el desarrollo normal de la planta (Aharoni y Galili, 2011).

Las principales clases de metabolitos secundarios pueden clasificarse en tres grupos: 1) los compuestos fenólicos, 2) terpenoides / isoprenoides y 3) compuestos con nitrógeno o

azufre en su composición como los alcaloides y glucosinolatos respectivamente. Todos se sintetizan a partir de distintas vías del metabolismo primario como la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA, Krebs), pentosas fosfato, vía del shikimato y la vía de aminoácidos aromáticos (Figura 2) (Aharoni y Galili, 2011).

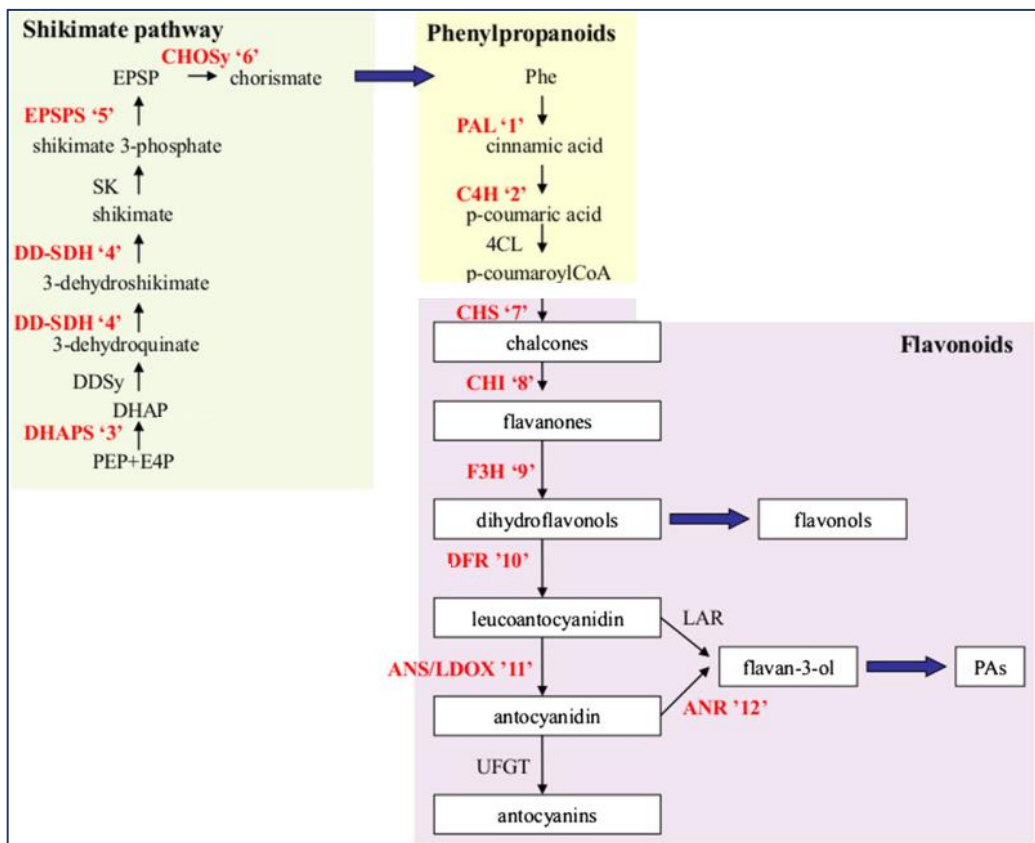


**Figura 2.** Interacción entre las vías del metabolismo primario y secundario  
**FUENTE:** Aharoni y Galili (2011).

### 2.2.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos engloban a un grupo amplio de metabolitos secundarios con diversas estructuras que en común comparten anillos aromáticos hidroxilados. La mayoría de compuestos fenólicos polimerizan hasta formar moléculas más grandes como las proantocianidinas, taninos condensados y/o lignanos. En plantas los compuestos fenólicos ocurren como ésteres o glicósidos conjugados con otros compuestos naturales como los flavonoides, alcoholes, ácidos grasos y esteroides. Los dos compuestos más importantes encontrados en plantas son los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos (Kabera *et al.*, 2014).

Estructuralmente los compuestos fenólicos se dividen en cuatro grupos: (1) los compuestos con un solo anillo aromático que pueden tener añadido hasta tres carbonos adicionales (C6-C1; C6-C2; C6-C3). (2) Compuestos con dos anillos aromáticos, como las benzoquinonas y xantonas unidos por un átomo de carbono (C6-C1-C6), los estilbenos, unidos por dos átomos de carbono (C6-C2-C6) y los flavonoides, unidos por tres átomos de carbono (C6-C3-C6). (3) Las quinonas y (4) los polímeros (Kabera *et al.*, 2014). La ruta de síntesis de estos compuestos involucra a la vía del shikimato, vía de fenilpropanoides y la vía de flavonoides (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de las vías involucradas en la síntesis de compuestos fenólicos. PEP: fosfoenol piruvato, E4P: eritrosa 4-fosfato, DHAP: 3-deoxi-D-arabino heptuloseonato 7-fosfato, EPSP: 5-enol-piruvilshikimato-fosfato, Phe: fenilalanina, PAs: proantocianidinas. Enzimas: DHAPS: 3-deoxi-D-arabino heptuloseonato 7-fosfato sintasa, DD-SDH: dihidroquinato deshidratasa shikimato:NADP oxidoreductasa, EPSPS: 5-enol-piruvilshikimato-fosfato sintasa, CHOS: corismato sintasa, PAL: fenilalanina amoníaco liasa, C4H: cinamato 4-hidroxilasa, CHI: chalcona isomerasa, F3H: flavonoide 3-hidroxilasa, DFR: Dihidroflavonol 4-reductasa, ANS/LDOX: antocianidina sintasa/leucoantocianidina dioxigenasa, UFGT: UDP-glucosa flavonoide

3-O-glucosiltransferasa, ANR: antocianidina reductasa y LAR: leucoantocianidina reductasa.

**FUENTE:** Martínez *et al.* (2013)

Los polifenoles pueden dividirse en flavonoideos y no flavonoideos.

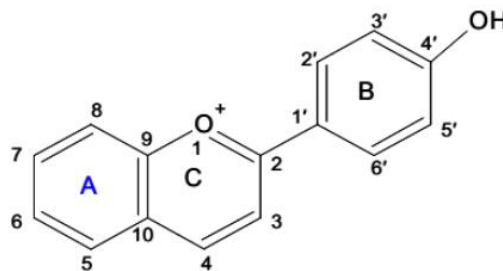
### a. Flavonoides

Son compuestos hidrosolubles que se almacenan en las vacuolas de las células vegetales (Jing, 2006). Son responsables del color amarillo, rojo o azul, de la filtración de rayos UV, fijación simbiótica del nitrógeno, también están involucrados en la señalización química y regulación del ciclo celular (Kabera *et al.*, 2014).

Los flavonoides son bastante populares porque se les atribuye efectos benéficos como antialérgicos, anticancerígenos, antioxidantes, antiinflamatorios y antivirales. Se pueden dividir en las siguientes clases: antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas, chalconas, flavononas, isoflavonas, flavanoles y proantocianidinas (Kabera *et al.*, 2014). A continuación se describirán las clases más comunes y pertinentes para esta tesis.

#### - Antocianinas

Las antocianinas son glicósidos de la antocianidina. La estructura básica de la antocianidina o aglicona es una cadena de carbonos C6-C3-C6 denominada núcleo flavilio (Figura 4). Las seis antocianidinas más comunes son la cianidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina (Jing, 2006).



**Figura 4.** Estructura básica de la antocianidina, núcleo flavilio.

**FUENTE:** Jing. (2006).

En vegetales, las antocianidinas suelen presentarse glicosiladas bajo la forma 3-glicósido y/o 3,5-diglicósido. Los azúcares más comunes son la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. Adicionalmente los azúcares pueden encontrarse acilados por ácidos cinámicos como el cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, gálico, *p*-hidroxibenzoico o sinápico; o ácidos orgánicos como el acético, málico, malónico, oxálico o succínico (Chirinos *et al.*, 2006; Jing, 2006).

### - Flavonas y flavonoles

Las flavonas tienen sustituciones en los anillos A y B y carecen de oxígeno en la posición 3 del anillo C. Los flavonoles pueden ser considerados como 3-hidroxi-flavonas. Las diferencias individuales surgen del número y la distribución de los grupos hidroxilo, así como de la naturaleza y el grado de alquilación y / o glicosilación de estos grupos. Al igual que otros flavonoides, las flavonas y flavonoles que se encuentran con mayor frecuencia en las plantas son aquellos con hidroxilación del anillo B en las posiciones 3 'y 4', seguidos de los hidroxilados en la posición 4' (Iwashina, 2000).

Las flavonas y flavonoles no contribuyen notablemente a la coloración de la planta, excepto cuando ocurren en altas concentraciones, como en las hojas suculentas de la cebolla, o cuando están acomplejados con un metal (Herrmann, 1976).

El sitio de unión más común del azúcar a los flavonoides es la posición 3, y menos frecuente la posición 7. En el caso de los diglicósidos, los 3-O-biósidos y 3,7-di-O-glucósidos ocurren con mayor frecuencia. Las flavonas se presentan principalmente como 7-O-glucósidos. La D-Glucosa es el residuo de azúcar más frecuente, pero también se encuentran D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa, D-apiosa, así como ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico (Herrmann, 1976).

La acilación se produce con ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, así como con los ácidos benzoico, malónico, acético y otros. En estos casos, los ácidos están esterificados con los azúcares y no están unidos a los grupos hidroxilo fenólicos. Los flavonoles más comunes son el kaempferol, la quercetina, la myrcetina e isorhamnetina. Las flavonas más comunes son la apigenina, la luteolina, la tricina y el crisoeriol (Herrmann, 1976).

## - Flavanoles

Son flavonoides que carecen un grupo carbonilo en la posición 4'. Se distribuyen ampliamente en el reino vegetal pero no ocurren en las familias que contienen betalainas posiblemente a la falta de dihidroflavonol 4-reductasa. Las más importantes son las catequinas, epicatequinas y epigallocatequinas (Iwashina, 2000).

### b. No Flavonoideos

Los compuestos no flavonoideos se dividen en ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, fenoles volátiles, estilbenos, lignanos y cumarinas. También se considera a los polifenoles polimerizados como los taninos, estos polifenoles precipitan las proteínas y pueden formar complejos con proteínas, almidón, celulosa y minerales. Son sintetizados por la vía del shikimato y se dividen en dos grupos: taninos hidrolizables, como los galotaninos y elagitaninos, y los taninos condensados (Kabera *et al.*, 2014; Rentzsch *et al.*, 2009).

### 2.2.2 Terpenoides / isoprenoides

Son derivados del isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), estos compuestos son los precursores de la biosíntesis de isoprenoides que tendrán luego función en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La síntesis de isoprenoides puede utilizar la vía del mevalonato (Figura 2) o la vía del metileritritol fosfato. La vía del mevalonato provee los precursores para la biosíntesis en el citosol de sesquiterpenos, poliprenoles, fitoesteroles, brassinoesteroides y triterpenoides y para la síntesis de terpenoides en mitocondria (ubiquinonas y poliprenoles). La vía del metileritritol fosfato se utiliza para la síntesis de hemiterpenoides, monoterpenoides, diterpenoides, carotenoides y sus productos de lisis como citoquininas, giberelinas, clorofila, tocoferoles y plastoquinonas (Tholl, 2015).

### **2.2.3 Alcaloides y glucosinolatos**

Los alcaloides son derivados de aminoácidos, básicos y contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico. La potente actividad biológica de algunos alcaloides ha llevado a su explotación como productos farmacéuticos, estimulantes, narcóticos y venenos. Los alcaloides derivados de plantas incluyen a los analgésicos morfina y codeína, los agentes anticancerígenos vinblastina y taxol, la supresora de la gota colchicina, el relajante muscular tubocurarina, la ajmalina antiarrítmica, el antibiótico sanguinarina y el sedante escopolamina. Otros alcaloides importantes de origen vegetal son la cafeína, la nicotina, la cocaína y la heroína derivada de la morfina sintética (Facchini, 2001).

Los alcaloides pueden agruparse en cuatro grupos. (1) Alcaloides indólicos terpenoides, como la vinblastina y quinina; (2) alcaloides benzilisoquinolínicos, como la morfina y colchicina; (3) alcaloides purínicos, como la cafeína y teobromina y (4) alcaloides del tropano, como la atropina y hiosciamina (Facchini, 2001).

Los glucosinolatos (-tioglucosido-N-hidroxisulfatos), son los precursores de los isotiocianatos, están presentes en 16 familias de angiospermas dicotiledóneas que incluyen un gran número de especies comestibles. Los glucosinolatos y / o sus productos de degradación se conocen desde hace mucho tiempo por sus propiedades fungicidas, bactericidas, nematocidas y alelopáticas y quimioprotectoras contra el cáncer. Las principales familias que presentan glucosinolatos son Brassicaceae, Capparaceae y Caricaceae (Fahey *et al.*, 2001).

Los glucosinolatos pueden ser del tipo alifático, metiltioalquílicos, aromáticos y heterocíclicos. También se pueden clasificar de acuerdo a la estructura de las cadenas laterales: lineales, ramificadas, con dobles enlaces, grupos carbonilo o hidroxilo o sulfúricos (Fahey *et al.*, 2001).

### **2.3 Capacidad antioxidante**

Los antioxidantes son sustancias que neutralizan a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno llamadas en general radicales libres (Devasagayam *et al.*, 2004). Existe evidencia que relaciona el consumo de alimentos con una alta capacidad antioxidante con



una menor incidencia de múltiples enfermedades, cáncer y la desaceleración del proceso de envejecimiento (Dudonné *et al.*, 2009).

Es sabido que los compuestos fenólicos ejercen una acción antioxidante en los sistemas biológicos. La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos está relacionada con el número de grupos hidroxilos disponibles en su estructura química y por ende de su concentración en la matriz de reacción. La interacción entre compuestos fenólicos es fundamental porque pueden tener un efecto sinérgico o antagonista sobre la capacidad antioxidante final (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009).

Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos (2009) recomiendan el uso de la capacidad antioxidante específica (razón entre la capacidad antioxidante total y el contenido de fenólicos solubles) como un mejor parámetro para entender y comparar la capacidad antioxidante entre genotipos, estados de maduración y/o tratamientos como el almacenamiento post-cosecha.

La medición de la capacidad antioxidante en alimentos y suplementos dietéticos se puede realizar por distintos métodos. La elección del método depende del tipo de antioxidante y del tipo de radical o fuente oxidante. Los antioxidantes pueden neutralizar a los radicales libres por dos mecanismos principales: por transferencia de un átomo de hidrógeno, HAT (por sus siglas en inglés *Hydrogen atom transfer*) y por transferencia de un electrón, SET (por sus siglas en inglés *Single electron transfer*) (Prior *et al.*, 2005). Algunas consideraciones para la elección de un método para la cuantificación de la capacidad antioxidante son que el método se haya utilizado durante una cantidad suficiente de tiempo y en un número de diferentes laboratorios de tal manera que los puntos fuertes y débiles del ensayo hayan sido puestos en evidencia.

Un método estandarizado según la Official Method of Analysis International (AOC, 1995) debe cumplir los siguientes requisitos: (1) mide la química que ocurre realmente en aplicaciones potenciales; (2) utiliza una fuente de radicales biológicamente relevante; (3) simplicidad; (4) utiliza un método con un punto final y mecanismo químico definidos; (5) instrumentación fácilmente disponible; (6) reproducibilidad; (7) adaptabilidad para el ensayo de antioxidantes hidrófilos y lipófilos y uso de distintas fuentes de radicales; (8)

alto rendimiento para análisis rutinario de control de calidad. Las características de rendimiento que deben ser considerados en la estandarización de un ensayo incluyen (a) rango analítico, (b) recuperación, (c) repetitividad, (d) reproducibilidad, y (e) el reconocimiento de sustancias interferentes (Prior *et al.*, 2005). Los métodos más utilizados basados en el mecanismo HAT son: ORAC (capacidad de absorción de radicales oxígeno) y TRAP (potencial antioxidante total). El más utilizado basado en el mecanismo SET es: FRAP (capacidad de reducción férrica del plasma). También existen variantes que utilizan un átomo de Cu en vez de Fe. Algunos métodos utilizan ambos mecanismos como: TEAC (capacidad antioxidante equivalente de Trolox) y DPPH (ensayo de 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) (Prior *et al.*, 2005).

## 2.4 Estrés oxidativo en plantas

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) provienen de la reducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ). Cuando la estructura electrónica del oxígeno se altera da lugar a moléculas altamente reactivas que dañan la estructura celular y su función. En plantas, las EROS más comunes son el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ). Radicales secundarios como el radical alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ), radical peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ) y peróxidos orgánicos se producen por la peroxidación enzimática de lípidos o iniciada por  $O_2^-$  (Reilly *et al.*, 2003).

En sistemas vegetales las EROS se forman en los organelos donde ocurre el flujo de electrones del metabolismo como los cloroplastos, la mitocondria y peroxisomas. Bajo condiciones de alta luminosidad los cloroplastos y peroxisomas son los principales productores de EROS mientras que en oscuridad la mitocondria se vuelve la fuente principal (Impa *et al.*, 2012).

Las EROS pueden formarse durante la fotosíntesis cuando los electrones del agua reducen al NADP. Cuando el NADP no es regenerado o la concentración de  $CO_2$  es limitada, los electrones de la cadena transportadora de electrones son aceptados por el oxígeno molecular y se forman los radicales superóxido. Bajo condiciones de estrés la vía de fotorespiración se activa y se produce  $H_2O_2$  por la enzima glicolato oxidasa de los peroxisomas. Las EROS se producen tanto bajo condiciones normales como de estrés porque cumplen un rol importante de señalización celular, el balance entre las EROS y las

defensas antioxidantes es vital para el desarrollo vegetal. La explosión oxidativa ( $O_2^-$  y  $H_2O_2$ ) como respuesta a estímulos externos promueve la expresión de genes involucrados en defensa que inducen engrosamiento de pared celular y muerte celular (Martinez *et al.*, 2016; Reilly *et al.*, 2003).

Cuando las plantas son expuestas a condiciones ambientales adversas como sequía, heladas, calor, deficiencia de oxígeno y contaminación del aire, sufren estrés y las plantas solo expresan una fracción de su potencial genético. Para mitigar los efectos citotóxicos de la acumulación de ROS, las plantas han desarrollado una maquinaria antioxidante que consiste en componentes enzimáticos y no enzimáticos. Entre los componentes enzimáticos la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la glutatión reductasa (GR), la catalasa (CAT) y la peroxidasa son las más importantes; mientras que los compuestos antioxidantes no enzimáticos más importantes son el glutatión, ácido ascórbico, carotenoides y flavonoides, entre otros. Su función combinada (enzimática y no enzimática) mantiene a la célula con un equilibrio adecuado de EROS (Martinez *et al.* 2016). Los principales metabolitos secundarios afectados por estrés abiótico son las vías involucradas en la síntesis de: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Cisneros-Zevallos, 2003).

Ghosh y Xu (2014) hacen una revisión de las proteínas expresadas durante distintos tipos de estrés abiótico en diferentes cultivos. Proteínas involucradas en prevención de daño oxidativo y secuestrantes de EROS incrementan su expresión en raíces bajo distintos tipos de estreses (sequía, salinidad y/o frío), las plantas se valen de distintos mecanismos de respuesta: Puede haber un incremento de síntesis de proteínas del metabolismo primario con la finalidad de mejorar la demanda de energía; pueden incrementar el número de canales transmembrana con la finalidad de mantener el balance osmótico; pueden incrementar la síntesis de metabolitos secuestradores de EROS para prevenir el daño oxidativo y/o puede haber una mayor síntesis de proteínas de defensa y para la remoción de proteínas dañadas o desnaturalizadas.

La respuesta por parte de la planta luego del periodo de estrés (recuperación) involucra la síntesis de proteínas relacionadas al proceso de lignificación para otorgar una mayor resistencia mecánica; proteínas del citoesqueleto para mantenimiento y reparación de la célula y proteínas de señalización relacionadas con el crecimiento (Ghosh y Xu 2014).

Las variaciones en temperatura pueden tener distintos efectos, fisiológicos en las plantas, pueden alterar la tasa de reacciones a menudo causando senescencia a temperaturas elevadas sobre el promedio y a temperaturas por debajo del promedio puede haber una mayor producción de antocianinas. También se ha reportado una correlación positiva entre el contenido de fenólicos y el incremento de la intensidad lumínica. El estrés causado por frío puede generar una respuesta de síntesis de sustancias crioprotectoras como azúcares – alcohol, azúcares solubles y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular y/o inducir un aumento de compuestos fenólicos e incorporarlos en la pared celular como suberina o lignina (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011).

El estrés causado por altas temperaturas altera la composición de los lípidos de las membranas celulares y las vuelven más fluidas; afecta la actividad de las enzimas porque ocurre desnaturalización y disociación de la estructura cuaternaria. En conjunto el daño en membranas y proteínas ocasiona la generación de EROS y un desbalance metabólico. Si el desbalance no es controlado por la planta resulta en un daño oxidativo causado por el calor y los síntomas fisiológicos son una menor tasa fotosintética, disminución de fijación de carbono, baja asimilación transmembranal, fallas reproductivas y senescencia (Larkindale *et al.*, 2005).

Una de las respuestas al estrés por calor es la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés). Y son un tipo de proteínas chaperonas involucradas en el pliegue y despliegue de proteínas para mantener o modificar su actividad (Larkindale *et al.*, 2005). Bajo condiciones normales las HSP están constitutivamente bloqueadas por los factores de transcripción de choque térmico (HSF). Bajo estrés por calor los HSF liberan a las HSP y se unen a promotores de genes asociado a las respuesta al calor para inducir su síntesis (Lurie y Pedreschi, 2014).

#### **2.4.1 Síntesis de flavonoides bajo estrés abiótico.**

Los flavonoides son el tipo de metabolito secundario que se sintetiza y distribuye con mayor frecuencia bajo condiciones de estrés severo en plantas. El estrés puede inactivar a las enzimas antioxidantes e inducir la biosíntesis de flavonoides. Por ejemplo, el exceso de luz es estresante para las plantas a diario y podría reducir la actividad de las enzimas

antioxidantes del cloroplasto y a la vez regular positivamente la biosíntesis de los flavonoides, incluso en ausencia de radiación UV. Por lo tanto, la actividad de los flavonoides puede constituir un sistema antioxidante "secundario" que se activa como consecuencia del agotamiento de la actividad de las enzimas antioxidantes (Agatti *et al.*, 2012).

Los flavonoides se pueden ubicar en las vacuolas de células del mesófilo, en cloroplastos, en el núcleo protegiendo el ADN o interactuando con membranas. Debido a sus características hidrofílicas interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos y pueden reorganizar las membranas para prevenir daños oxidativos (Agatti *et al.*, 2012).

El estrés causado por radiación UV-B y/o completa radiación solar suele regular positivamente la síntesis de flavonoides sin tener efectos significativos en la síntesis de ácidos hidroxicinámicos o hidroxibenzoicos. La inducción por radiación UV afecta principalmente a los anillos B dihidroxilados como la quercitina o luteolina sobre los anillos B monohidroxilados como el kaempferol o apigenina respectivamente. Adicionalmente estos compuestos pueden quelar iones como el Fe y el Cu y prevenir la generación de EROS (Agatti *et al.*, 2012; Di Ferdinando *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que los flavonoides también se acumulan como consecuencia de un descenso en la temperatura en las células epidérmicas de varias especies vegetales. Este aumento se detectó en plantas irradiadas con luz blanca en ausencia de radiación UV, por lo tanto la acumulación era una respuesta al daño fotooxidativo inducido por frío. Este tipo de estrés también induciría la expresión de genes relacionados con la síntesis de flavonoles de anillo B dihidroxilado (Di Ferdinando *et al.*, 2012; Bilger *et al.*, 2007).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material vegetal**

Se trabajó con el número de accesión de mashua CIP203021 conservada en el banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP). Los datos pasaporte de la accesión son:

Número de colección/genotipo: ARB5241

Nombre de la accesión: Yana año

Lugar de colecta: Comunidad Amaru, distrito Písac, provincia Písac, departamento Cusco.

Altura del sitio de colección: 3754 msnm.

La colección de germoplasma de mashua que custodia el CIP es mantenida en la comunidad La Libertad (~ 3700 msnm), en el distrito Heroínas Toledo de la provincia de Concepción en el departamento de Junín. En este lugar se sembraron las plantas de mashua utilizadas en esta investigación. La siembra fue en octubre del 2014 y la cosecha en junio del 2015.

#### **3.2 Procesamiento de muestras**

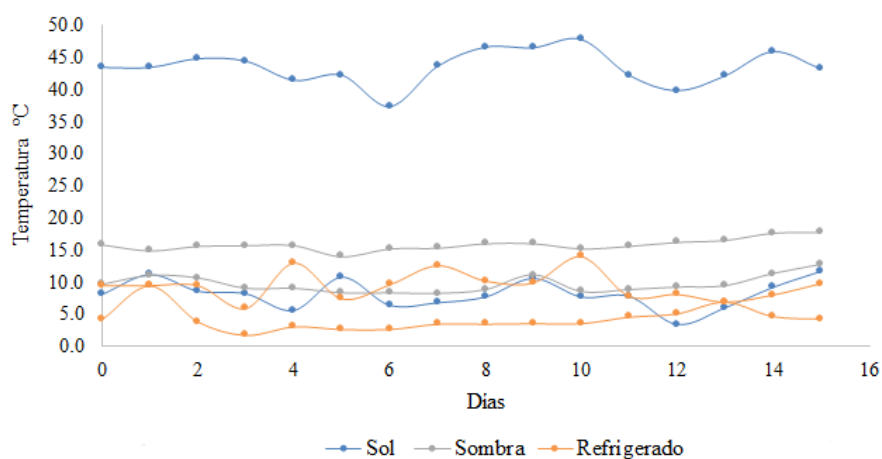
Inmediatamente después de la cosecha se seleccionaron tubérculos de tamaño homogéneo (~ 30 gramos por tubérculo) hasta alcanzar aproximadamente 10 Kg de muestra total. Se dividieron los tubérculos en tres grupos correspondientes a los tres tratamientos post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra. En el tratamiento soleado los tubérculos se extendieron sobre bolsas de yute y se mantuvieron sobre el techo de un cuarto, en el tratamiento sombra los tubérculos se extendieron sobre una tarima en un cuarto cerrado, para ambos casos en las noches se cubrían los tubérculos con bolsas de yute para protegerlos de la helada. Para el tratamiento refrigerado se envió 4,5 Kg de tubérculos

recién cosechados a Lima y se guardaron en una refrigeradora graduada a 4 °C y ~ 90% de humedad relativa. La duración de cada tratamiento fue de 15 días y se muestreó 0,5 Kg de tubérculos cada tres días. Las muestras colectadas en los tratamientos soleado y sombra se empacaron en bolsas de papel y enviaron rápidamente a Lima luego de su colecta. El procesamiento de la muestra y análisis se realizó en las instalaciones del Instituto de Biotecnología – Área Biotecnología Industrial de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

Las condiciones promedio de temperatura y humedad durante el desarrollo de los tratamientos post-cosecha se muestran en el Cuadro 2. Adicionalmente se monitoreó la temperatura interna de seis tubérculos de mashua durante todo el experimento (Cuadro 2). Para este fin se introdujo sensores al interior del tubérculo y al retirarlos se sellaba la herida producida con silicona. La fluctuación diaria de las temperaturas máximas y mínimas para los tres tratamientos se muestra en la (Figura 5).

**Cuadro 2.** Condiciones promedio de temperatura (°C) y humedad relativa (%) de los tres tratamientos post-cosecha evaluados.

| Condición               | Soleado    | Refrigerado | Sombra     |
|-------------------------|------------|-------------|------------|
| T máxima (°C) ambiental | 45,8 ± 2,1 | 11,4 ± 1,8  | 17,0 ± 0,5 |
| T mínima (°C) ambiental | 8,0 ± 1,4  | 4,0 ± 0,8   | 9,8 ± 0,7  |
| T máxima (°C) interna   | 43,4 ± 1,3 | 9,5 ± 1,1   | 15,8 ± 0,5 |
| T mínima (°C) interna   | 8,1 ± 1,1  | 4,2 ± 0,9   | 9,6 ± 0,6  |
| HR % máxima             | 64,5 ± 4,6 | 83,4 ± 2,7  | 59,1 ± 4,5 |
| HR % mínima             | 17,8 ± 8   | 52,8 ± 4,4  | 43,7 ± 2,6 |



**Figura 5.** Temperaturas internas máximas y mínimas registradas a partir de seis tubérculos de mashua para cada tratamiento post-cosecha.

El procesamiento que siguieron las muestras se describe a continuación:

- Selección: Los tubérculos que presentaban daño mecánico o microbiológico fueron descartados.
- Lavado: Los tubérculos se lavaron manualmente con agua potable, con el fin de retirar el barro, tierra y cualquier elemento extraño. Posteriormente, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm.
- Molienda. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido (-180 °C) y se molieron.
- Liofilización. Las muestras molidas se liofilizaron y colocaron en bolsas de aluminio, se aplicó gas nitrógeno para evitar la presencia de oxígeno y se sellaron. Las condiciones de liofilización fueron: -45 °C (condensador) y  $133 \times 10^{-3}$  mBar de presión.
- Almacenamiento: A -80 °C hasta el momento de análisis.

### **3.3 Materiales, equipos y reactivos**

#### **3.3.1 Reactivos**

- 2,2' azinobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) (Sigma Aldrich)
- 2,2' azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6- sulfonate) (ABTS) (Sigma Aldrich)
- Acetonitrilo (Fermont)
- Ácido acético (Fermont)
- Ácido clorhídrico al 37% (Fisher)
- Acetato de Sodio (Acetato de sodio trihidratado, HiMedia)
- Cloruro de Potasio (Cloruro de potasio, HiMedia)
- Fluoresceína (Sigma Aldrich)
- Folin- Ciocalteau 2N (Merck)
- Fosfato de potasio monobásico (Merck)
- Metanol (grado HPLC, J.T. Baker, Trinidad y Tobago)
- Nitrógeno gaseoso N<sub>2</sub>UHP (AGA)



- Nitrógeno líquido
- Persulfato de potasio (Sigma Aldrich)
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxílico, Sigma Aldrich)

### 3.3.2 Equipos

- Agitador magnético (CAT, modelo M6, Alemania)
- Agitador rotatorio (Heidolph Polymax 2040, Alemania)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2140, USA)
- Centrífuga (Hettich, Rotofix 32, Alemania)
- Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución (UPLC®) con detector de arreglo de fotodiodos (PAD) (Waters, USA)
- Espectrofotómetro (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, USA)
- Estufa al vacío (VWR, 1400E-2, USA)
- Lector de microplacas-Fluorímetro (Biotek Modelo Synergy 2, U.S.A.)
- Potenciómetro (Thermo-Orion, modelo Star A211, USA)
- Rotavapor (Heidolph Modelo Heizbad HB, Alemania)
- Sensores de temperatura y humedad relativa Coolbox
- Selladora Oster V2240

### 3.3.3 Materiales

- Beakers de 50, 100, 200 ml
- Columna ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 µm (2,1 x 100 mm)
- Filtro tipo GV de 0,22 µm Millipore
- Fiolas de 500 ml
- Matraces de 250 ml
- Micropipetas y tips de 20- 200 µl, 100-1000 µl y 500-5000 µl
- Microplacas
- Placas Petri de 5cm de diámetro
- Tubos Falcon de 50 ml
- Tubos de ensayo

### **3.4 Métodos de análisis**

#### **3.4.1 Determinación de humedad**

Se determinó por el método gravimétrico porcentual Método 920.151 (AOAC, 1995). Se colocó 0,5 g de liofilizado en placas de vidrio en una estufa a 75 °C, 5 bar de presión durante 5 horas. Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **3.4.2 Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT)**

Se utilizó 0,5 g de mashua liofilizada para la extracción con 25 ml de metanol al 80%. Se agitó durante 5 minutos y se dejó incubando a 4 °C por 24 horas. Luego se centrifugó a 2397 g por 10 minutos y el sobrenadante se trasladó a viales ámbar. Para almacenar, los extractos (sobrenadante) fueron inyectados con nitrógeno gaseoso y se congelaron a -20 °C. Todo el proceso se desarrolló protegiendo las muestras de la luz. Se prepararon extractos por triplicado de cada muestra.

Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron mediante la metodología de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). La absorbancia se midió a 755 nm, se utilizó ácido gálico como estándar y los resultados se expresaron en miligramo de ácido gálico por gramo de materia seca ( $\text{mg AGE} \cdot \text{g ms}^{-1}$ ). Los análisis se realizaron por triplicado.

#### **3.4.3 Extracción y cuantificación de antocianinas totales (ACYT)**

Se homogenizaron 0,2 g de mashua liofilizada con 15 ml de solvente de extracción (85:15 etanol al 95%: HCl 1,5 N, v/v), se agitó por 5 minutos y se mantuvieron a 4°C por 24 horas. Luego se centrifugó a 150 g por 15 minutos y se utilizó el sobrenadante inmediatamente para la cuantificación por la metodología de pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001).

Las absorbancias se midieron a 520 y 700 nm para las diluciones en buffers pH 1 y pH 4,5. En trabajos anteriores se determinó que la antocianina predominante es la delfinidina 3-glucósido, por lo tanto, los cálculos se realizaron en base a este compuesto (Chirinos *et al.*, 2006). Se utilizó un peso molecular de  $500,83 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  y un coeficiente de extinción molar

de 29000 (Sadilova *et al.*, 2006). Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de delfinidina 3-glucósido (DGE) por gramo de materia seca ( $\text{mg DGE} \cdot \text{g ms}^{-1}$ ).

#### **3.4.4 Determinación de capacidad antioxidante hidrofílica (ABTS)**

La capacidad antioxidante hidrofílica ABTS se determinó de acuerdo al procedimiento propuesto por Re *et al.* (1999), con algunas modificaciones. La solución de ABTS y los extractos se diluyeron con metanol y el tiempo de reacción fue de 3 horas a temperatura ambiente. Se usó como blanco el metanol y las lecturas fueron realizadas a 734 nm. La capacidad antioxidante se calculó como los micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de materia seca ( $\mu\text{mol TE} \cdot \text{g ms}^{-1}$ ), utilizando al Trolox como estándar.

#### **3.4.5 Determinación de capacidad antioxidante (ORAC)**

El ensayo ORAC se realizó de acuerdo a la metodología estandarizada por Chirinos *et al.* (2008b). Se utilizó 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) como generador de radicales peroxilo, Trolox como estándar y fluoresceína como sonda fluorescente. Para la reacción se tomaron 25  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 (blanco), estándar de Trolox o muestra diluida en buffer PBS y se mezcló con 250  $\mu\text{l}$  de fluoresceína 55 nM y se incubó a 37 °C por 10 minutos. La inyección de 25  $\mu\text{l}$  de AAPH 153 nM fue automática. La fluorescencia se midió a 485 nm (excitación) y a 520 nm (emisión) cada minuto durante 50 minutos. Los valores finales de ORAC se calcularon midiendo el área debajo de la curva de decaimiento y se expresaron como  $\mu\text{mol}$  de Trolox por gramo de materia seca ( $\mu\text{mol TE} \cdot \text{g ms}^{-1}$ ).

#### **3.4.6 Determinación del perfil de compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida de ultra performance**

Los extractos fenólicos obtenidos en el acápite 3.4.2 se concentraron en un rotavapor a 50 °C hasta la sequedad y se resuspendieron en metanol grado HPLC hasta una concentración promedio de 2 mg AGE $\cdot\text{ml}^{-1}$ . Se utilizó un equipo UPLC® Waters Acquity H. Los extractos fueron pasados por filtros tipo GV de 0,22  $\mu\text{m}$  Millipore, el filtrado fue pasado por nitrógeno y se congelaron a -80°C protegidos de la luz hasta el momento de la corrida por UPLC-PAD. Se utilizó una columna ACQUITY UPLC ® BEH C<sub>18</sub> 1,7  $\mu\text{m}$  (2,1 x 100

mm). La temperatura de corrida fue 30 °C y la duración fue de 30 minutos en total bajo un flujo de 0,2 ml·min<sup>-1</sup>, el volumen de inyección fue 2,0 µl. Los solventes utilizados fueron Agua (Solvente A) y Acetonitrilo (Solvente B), ambos con 0,1% de ácido fórmico. El gradiente del solvente fue de 2% de B de 0 - 2 min; 7% de B de 2 – 4 min; 12% de B de 4 – 15 min; 26% de B de 15 – 20 min; 55% de B de 20 – 25 min; 95% de B de 25 – 29 min y 2% de B de 29 – 30 min. Los compuestos fenólicos fueron identificados con estándares previamente inyectados a las longitudes de onda de: 250 nm para ácidos hidroxibenzoicos y flavanoles, 320 nm para el ácido cinámico y 360 nm para los flavonoles.

### **3.4.7 Determinación del perfil de antocianinas mediante cromatografía líquida de ultra performance**

Las antocianinas obtenidas en el acápite 3.4.3 se concentraron en un rotavapor a 50 °C hasta la sequedad y se resuspendieron en metanol grado HPLC hasta una concentración promedio de 2 mg DGE·ml<sup>-1</sup>. Los extractos fueron pasados por filtros tipo GV de 0,22 µm Millipore, el filtrado fue pasado por nitrógeno y se congelaron a -80 °C protegidos de la luz hasta el momento de la corrida por UPLC®-PDA. Se utilizó una columna ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> 1,7 µm (2,1 x 100 mm). La temperatura de corrida fue 30 °C y la de la muestra fue 5 °C, la duración fue de 15 minutos en total bajo un flujo de 0,4 ml·min<sup>-1</sup>, el volumen de inyección fue 2,0 µl. Se utilizó un equipo UPLC Waters Acquity H. Los solventes utilizados fueron Agua con 5% de ácido fórmico (Solvente A) y Acetonitrilo (Solvente B). El gradiente del solvente fue de 5% de B de 0 - 1 min; 30% de B de 1 – 8 min; 95% de B de 8 – 11,5 min y 5% de B de 11,5 – 15 min. Los últimos 5 minutos fueron de limpieza. Las muestras se analizaron por duplicado. Las antocianinas fueron identificadas con estándares previamente inyectados a la longitud de onda de 520 nm.

### **3.5 Análisis estadístico**

El diseño experimental utilizado fue un diseño factorial completamente al azar de dos factores. Uno de los factores fueron los tratamientos post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra y el segundo factor fueron los días transcurridos desde la cosecha: 0, 3, 6, 9, 12 y 15 días.

Los efectos principales, simples y de interacción fueron determinados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparaciones múltiples, usando para ellos el software R (A Language and Environment for Statistical Computing) (R Core team, 2013).

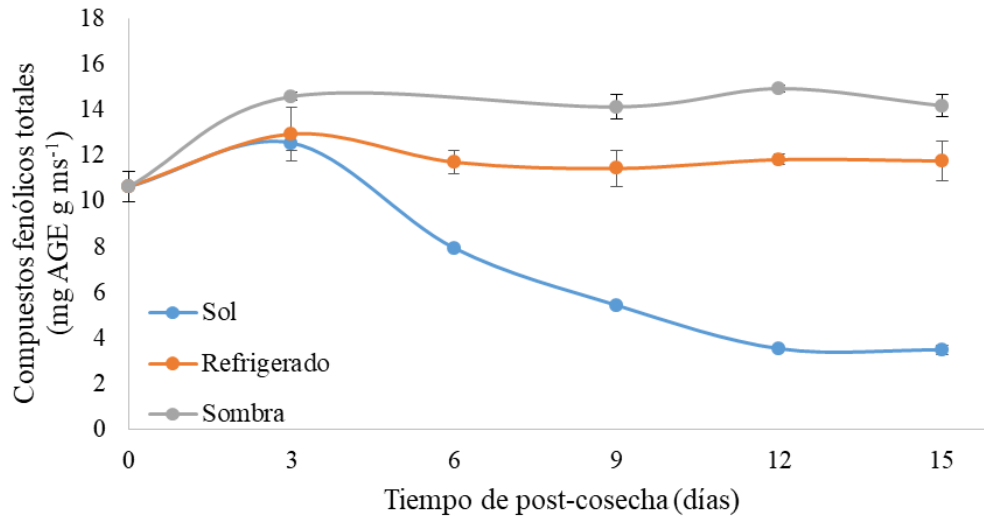
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y determinación de perfil de compuestos fenólicos no antocianos

La evolución de los compuestos fenólicos totales (CFT) para el genotipo ARB5241, de acuerdo a los distintos tratamientos post-cosecha evaluados, se presentan en la Figura 6. Las medias de los resultados de los CFT para cada tratamiento se presentan en el Anexo 1. La concentración inicial de CFT fue  $10,63 \pm 0,67$  mg AGE·g ms<sup>-1</sup>. La mashua es reconocida por poseer un elevado contenido de CFT, según la variedad, color de piel y/o color de pulpa, se ha reportado que el contenido de CFT se encuentra entre 14 - 24 mg de ácido clorogénico·g ms<sup>-1</sup> (Chirinos *et al.*, 2007a), o de 10,9 - 57, 4 mg de AGE·g ms<sup>-1</sup> (Chirinos *et al.*, 2008b) y específicamente para el genotipo ARB 5241 se ha determinado valores de hasta 57,4 mg AGE·g ms<sup>-1</sup> (Chirinos *et al.*, 2008b), siendo este valor superior al encontrado en el presente estudio.

De la Figura 6 se observa que, al tercer día hubo un incremento en la concentración de CFT para todos los tratamientos post-cosecha, siendo significativo solo para los tratamientos refrigerado y sombra ( $p < 0,05$ ), alcanzándose valores de  $12,54 \pm 0,33$ ;  $12,93 \pm 1,16$  y  $14,57 \pm 0,18$  mg AGE·g ms<sup>-1</sup> para los tratamientos soleado, refrigerado y sombra, respectivamente. En los días sucesivos, para los tratamientos refrigerado y sombra, los valores se mantuvieron constantes, sin diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) hasta el final de la evaluación, mientras que, para el tratamiento soleado los CFT disminuyeron progresivamente hasta llegar a una concentración de  $3,48 \pm 0,22$  mg AGE·g ms<sup>-1</sup> para el día 15 de tratamiento post-cosecha, perdiendo el 67,2% de su contenido inicial. Esta pérdida estaría asociada a la oxidación de los compuestos fenólicos de la mashua expuestos a altas temperaturas e irradiación. Chirinos *et al.* (2007a) evaluaron los efectos del soleado en diez genotipos de mashua durante 35 días con evaluaciones cada siete días y hallaron

que los CFT para el genotipo ARB5241 disminuyeron progresivamente hasta el día 14, perdiendo casi el 40% del contenido inicial y luego no presentaron cambios significativos hasta el día 35.



**Figura 6.** Evolución del contenido de compuestos fenólicos totales para los diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada.

Es posible que la cantidad y velocidad de disminución de CFT en la investigación de Chirinos *et al.* (2007a) haya sido menor porque la temperatura promedio durante el soleado post-cosecha fue 10 °C mientras que en la presenta investigación, el estrés fue más severo con una temperatura ambiental promedio de 26,9 °C y un rango promedio de diferencia entre la temperatura máxima y mínima de  $37,8 \pm 3$  °C. La temperatura interna promedio de los tubérculos se mantuvo entre 2 y 0,2 grados por debajo de la máxima y mínima ambiental respectivamente (Cuadro 2).

El proceso de suberización podría explicar el incremento de compuestos fenólicos al tercer día para los tres tipos de estrés. La piel del tubérculo, peridermis, está compuesta por el felema, el felógeno y la felodermis (de exterior a interior). Existe evidencia que involucra al felógeno y la felodermis con la expresión de proteínas de defensa e interacción planta-microorganismo y la felodermis con la expresión de proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) involucradas en la proliferación celular y diferenciación (Lurie y Pedreschi, 2014). El objetivo de la suberización es proteger al tubérculo de la desecación y

del ataque por patógenos debido a daños mecánicos. El tejido suberizado se caracteriza por los depósitos de polifenoles, ácidos grasos y glicerol (Yang y Bernards, 2007).

En los tubérculos de papa se ha observado que el proceso de suberización está relacionado con depósitos de homogalacturonanos y extensinas en el felógeno del peridermo maduro (Sabba y Lulai, 2005) y la formación de geles por la presencia de pectato de calcio en la pared celular (Thakur *et al.*, 1997). Ramón (2017) reportó un incremento de fibra dietaria soluble en mashua morada (genotipo ARB5241) al tercer día bajo tres tipos de estrés abiótico post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra, esto posiblemente indique que, durante los tres primeros días existe una alta actividad del felógeno y acumulación de homogalacturonanos, pectatos y compuestos fenólicos en el proceso de suberización de mashua.

En general el análisis de varianza factorial (ANOVA) indicó diferencias significativas en la concentración de CFT entre los factores día, tratamiento post-cosecha y su interacción (Anexo 2).

Los resultados de los compuestos fenólicos determinados por UPLC®-PDA, se muestran en el Cuadro 3 y 4, y Figura 7. Un total de 11 principales compuestos fenólicos no antocianos fueron detectados en el perfil cromatográfico de los tubérculos del genotipo ARB5241. En función a sus características espectrales, se identificó al ácido gálico (pico 1) y los compuestos fenólicos restantes pertenecieron a la familias de los flavanoles (picos 2 y 3), flavonoles (picos 4 y 11), un ácido cinámico (pico 5) y a ácidos hidroxibenzoicos (picos 6-10), compuestos que han sido reportados previamente por Chirinos *et al.* (2008a). Diez compuestos fenólicos se encontraron en común para los tres tratamientos post-cosecha (picos 1-10) y solo un flavonol del tipo rutina (pico 11) fue exclusivo del tratamiento soleado.

Del análisis cromatográfico, el total de compuestos fenólicos no antocianos para el día inicial fue  $1070,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g ms}^{-1}$ . Al término de los 15 días de almacenamiento, en los tratamientos soleado y refrigerado se incrementó la concentración de compuestos fenólicos en 1,5 veces y para el tratamiento sombra se redujo a un 70% del valor inicial (Cuadro 4).



**Cuadro 3.** Características cromatográficas y espectrales de los principales compuestos fenólicos no antocianos encontrados en los tubérculos del genotipo ARB5241.

| Pico | Tiempo de retención (min) | Longitud de onda máxima (nm) | Compuesto fenólico asignado           |
|------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| 1    | 2,17                      | 274,6                        | Ácido gálico                          |
| 2    | 7,14                      | 271                          | Derivado de flavanol (a)              |
| 3    | 10,58                     | 278,1                        | Derivado de flavanol (a)              |
| 4    | 20,26                     | 354.0                        | Derivado de flavonol (b)              |
| 11   | 21,01                     | 354.0                        | Derivado de flavonol (b)              |
| 5    | 21,50                     | 281,7                        | Derivado de ácido cinámico (d)        |
| 6    | 22,2                      | 248,4 / 269,8                | Derivado de ácido hidroxibenzoico (c) |
| 7    | 22,39                     | 248,4 / 269,9                | Derivado de ácido hidroxibenzoico (c) |
| 8    | 22,97                     | 252.0                        | Derivado de ácido hidroxibenzoico (c) |
| 9    | 23,27                     | 248,4                        | Derivado de ácido hidroxibenzoico (c) |
| 10   | 23,82                     | 252                          | Derivado de ácido hidroxibenzoico (c) |

(a) Cuantificados como catequina, (b) cuantificados como rutina, (c) derivados de ácido vainílico o protocatéquico pero cuantificados como ácido gálico y (d) cuantificado como *p*-cumárico.

En el tratamiento de soleado, durante el curso del almacenamiento, se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la concentración de nueve de los compuestos fenólicos detectados entre el inicio y el término del almacenamiento. Así, el pico 1 (ácido gálico) aumentó 1,6 veces; el pico 2 (derivado de flavanol) aumentó hasta 7 veces su concentración; el pico 4 (derivado de flavonol) perdió el 80% de su contenido, el pico 11 (derivado de flavonol) se detectó luego de quince días del tratamiento post-cosecha y el pico 8 (derivado de ácido hidroxibenzoico) se redujo en 0,2 veces su contenido inicial. Finalmente, los picos 5, 6, 7 y 10 (derivados de ácido cinámico e hidroxibenzoicos), se degradaron por completo (Cuadro 4).

En el tratamiento refrigerado solo se presentaron variaciones significativas ( $p < 0,05$ ) en los contenidos del pico 2 (derivado de flavanol) y el pico 6 (derivado de ácido hidroxibenzoico), que aumentaron progresivamente su concentración desde el día 9 hasta alcanzar valores de 4,4 y 2,1 veces su concentración al finalizar los 15 días de tratamiento (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Concentración de los principales compuestos fenólicos no antocianos encontrados en los tubérculos del genotipo ARB5241 durante los tratamientos post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra. Se muestran las medias y desviación estándar.

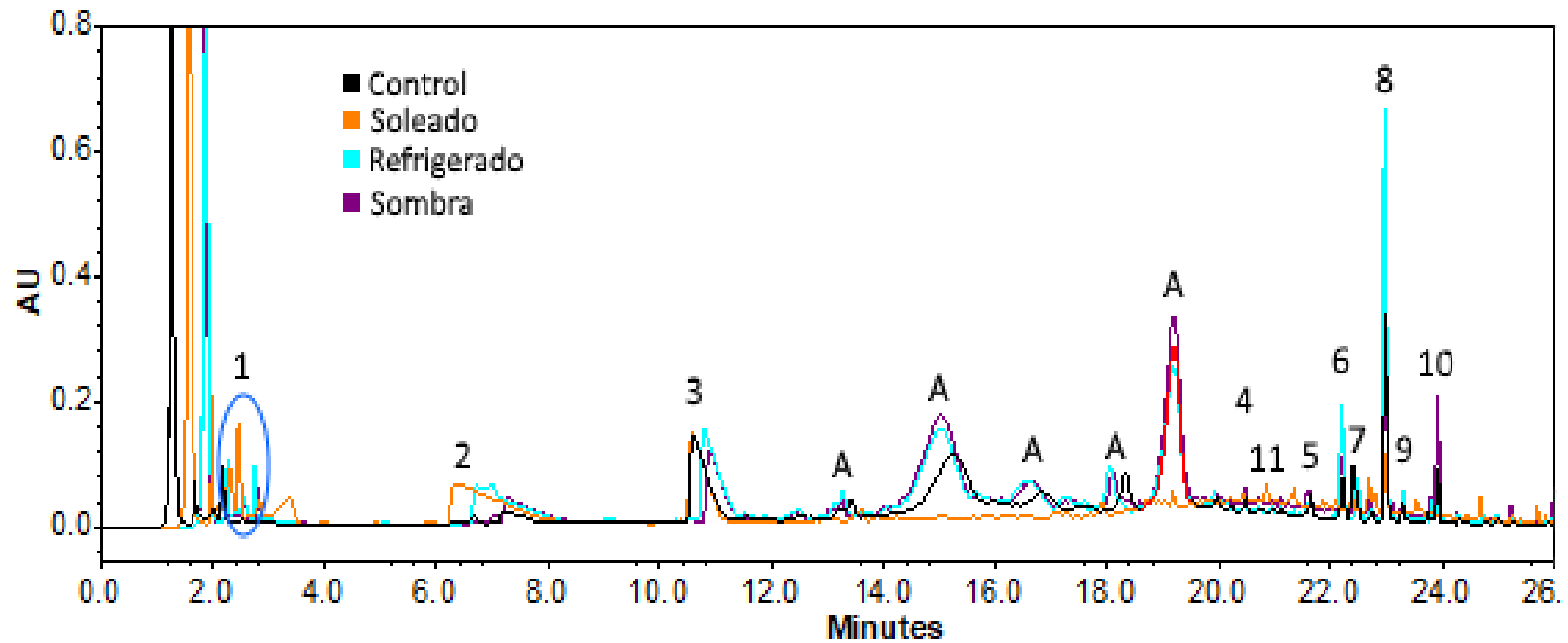
| Trat.       | Día | mg • (100 g ms) <sup>-1</sup> |                 |                |              |              |              |              |               |                |              |               |                 |
|-------------|-----|-------------------------------|-----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|--------------|---------------|-----------------|
|             |     | Ac. Hbz.                      | Flavanol        | Flavanol       | Flavonol     | Flavonol     | Ac. Hcn      | Ac. Hbz.     | Ac. Hbz.      | Ac. Hbz.       | Ac. Hbz.     | Ac. Hbz.      |                 |
|             |     | P1                            | P2              | P3             | P4           | P11          | P5           | P6           | P7            | P8             | P9           | P10           | Total           |
| Control     | D0  | 28,26 ± 0,96                  | 121,61 ± 7,00   | 664,96 ± 21,13 | 18,4 ± 0,86  | 0,00 ± 0,00  | 12,91 ± 0,09 | 34,29 ± 1,24 | 47,57 ± 2,38  | 95,33 ± 3,42   | 19,89 ± 0,00 | 27,31 ± 1,22  | 1070,5 ± 35,81  |
|             | D3  | 38,49 ± 1,86                  | 241,35 ± 20,84  | 697,39 ± 36,42 | 20,16 ± 2,18 | 0,00 ± 0,00  | 12,69 ± 0,00 | 34,97 ± 0,57 | 6,69 ± 0,00   | 107,57 ± 13,17 | 28,18 ± 0,92 | 28,69 ± 9,34  | 1216,2 ± 63,65  |
|             | D6  | 34,17 ± 2,76                  | 166,01 ± 10,37  | 660,45 ± 32,31 | 11,09 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00  | 4,02 ± 0,00  | 23,61 ± 0,71 | 0,00 ± 0,00   | 75,69 ± 6,63   | 34,26 ± 1,01 | 13,03 ± 0,00  | 1022,3 ± 53,81  |
|             | D9  | 32,92 ± 0,12                  | 203,77 ± 6,94   | 540,22 ± 0,28  | 9,10 ± 5,08  | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 40,25 ± 1,51   | 32,54 ± 1,49 | 17,83 ± 0,00  | 876,6 ± 12,16   |
|             | D12 | 46,38 ± 0,46                  | 801,57 ± 3,43   | 662,07 ± 23,41 | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 2,93 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 28,19 ± 0,2,00 | 29,93 ± 0,08 | 13,79 ± 0,37  | 1584,8 ± 26,66  |
|             | D15 | 45,64 ± 6,46                  | 850,39 ± 149,43 | 617,3 ± 109,89 | 3,14 ± 0,00  | 12,85 ± 1,85 | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00   | 19,3 ± 0,00    | 26,18 ± 3,32 | 0,00 ± 0,00   | 1574,8 ± 270,96 |
| Refrigerado | D3  | 26,42 ± 0,18                  | 268,94 ± 0,47   | 490,45 ± 30,09 | 29,41 ± 7,77 | 0,00 ± 0,00  | 11,31 ± 0,00 | 34,86 ± 0,00 | 44,13 ± 21,28 | 84,82 ± 14,07  | 15,86 ± 0,00 | 62,19 ± 18,77 | 1068,4 ± 31,52  |
|             | D6  | 26,88 ± 3,54                  | 132,38 ± 15,38  | 662,8 ± 92,86  | 18,70 ± 2,27 | 0,00 ± 0,00  | 13,98 ± 0,00 | 36,08 ± 5,20 | 32,08 ± 4,27  | 134,37 ± 20,61 | 18,85 ± 3,08 | 35,31 ± 6,99  | 1111,4 ± 154,21 |
|             | D9  | 30,13 ± 9,27                  | 269,6 ± 17,08   | 584,00 ± 0,00  | 26,45 ± 9,57 | 0,00 ± 0,00  | 33,02 ± 0,00 | 55,59 ± 0,00 | 39,14 ± 0,00  | 178,24 ± 56,22 | 37,66 ± 0,00 | 60,66 ± 19,30 | 1314,5 ± 111,45 |
|             | D12 | 27,03 ± 0,01                  | 430,68 ± 39,44  | 777,60 ± 61,31 | 20,15 ± 0,70 | 0,00 ± 0,00  | 12,42 ± 0,04 | 66,13 ± 0,50 | 35,85 ± 0,81  | 173,77 ± 0,71  | 21,77 ± 0,37 | 25,42 ± 2,13  | 1590,8 ± 100,27 |
|             | D15 | 27,89 ± 1,28                  | 530,71 ± 4,84   | 707,98 ± 29,86 | 16,57 ± 1,06 | 0,00 ± 0,00  | 13,28 ± 3,94 | 72,22 ± 5,4  | 37,42 ± 3,54  | 180,08 ± 11,09 | 27,33 ± 2,49 | 27,96 ± 10,47 | 1641,4 ± 18,38  |
| Sombra      | D3  | 20,44 ± 1,65                  | 180,48 ± 8,65   | 556,28 ± 55,25 | 18,27 ± 2,58 | 0,00 ± 0,00  | 5,08 ± 0,62  | 25,48 ± 3,54 | 22,80 ± 0,00  | 61,36 ± 12,49  | 0,00 ± 0,00  | 41,88 ± 2,51  | 932,1 ± 70,00   |
|             | D6  | 21,15 ± 0,19                  | 183,32 ± 2,61   | 593,11 ± 5,57  | 10,21 ± 3,16 | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00  | 41,2 ± 2,62  | 25,26 ± 0     | 75,56 ± 6,69   | 10,1 ± 0     | 28,53 ± 4,19  | 988,4 ± 0,08    |
|             | D9  | 18,25 ± 0,90                  | 194,3 ± 10,18   | 514,75 ± 88,19 | 19,7 ± 1,73  | 0,00 ± 0,00  | 6,01 ± 0,5   | 27,93 ± 0,78 | 22,19 ± 0,33  | 64,18 ± 8,97   | 0,00 ± 0,00  | 31,71 ± 0,67  | 899,0 ± 89,90   |
|             | D12 | 16,68 ± 0,28                  | 210,06 ± 0      | 425 ± 11,59    | 18,84 ± 0,16 | 0,00 ± 0,00  | 5,69 ± 0,01  | 20,46 ± 0,13 | 15,87 ± 0,07  | 70,45 ± 0,95   | 0,00 ± 0,00  | 40,68 ± 0,06  | 823,7 ± 10,48   |
|             | D15 | 24,69 ± 7,67                  | 92,57 ± 0       | 443,73 ± 14,22 | 19,34 ± 1,97 | 0,00 ± 0,00  | 5,33 ± 1,03  | 27,64 ± 1,53 | 16,89 ± 0     | 73,77 ± 4,82   | 9,73 ± 0     | 46,05 ± 11,36 | 759,7 ± 27,27   |

Ac. Hbz: Ácido Hidroxibenzoico, Ac. Hcn: Ácido Hidroxicinámico.±

El nivel de significancia y los incrementos y decrementos en la concentración de cada compuesto fenólico con respecto al valor inicial están representados por:

| Incremento      | Decremento      |
|-----------------|-----------------|
| 0-0,001 (***)   | 0-0,001 (***)   |
| 0,001-0,01 (**) | 0,001-0,01 (**) |
| 0,01-0,05 (*)   | 0,01-0,05 (*)   |

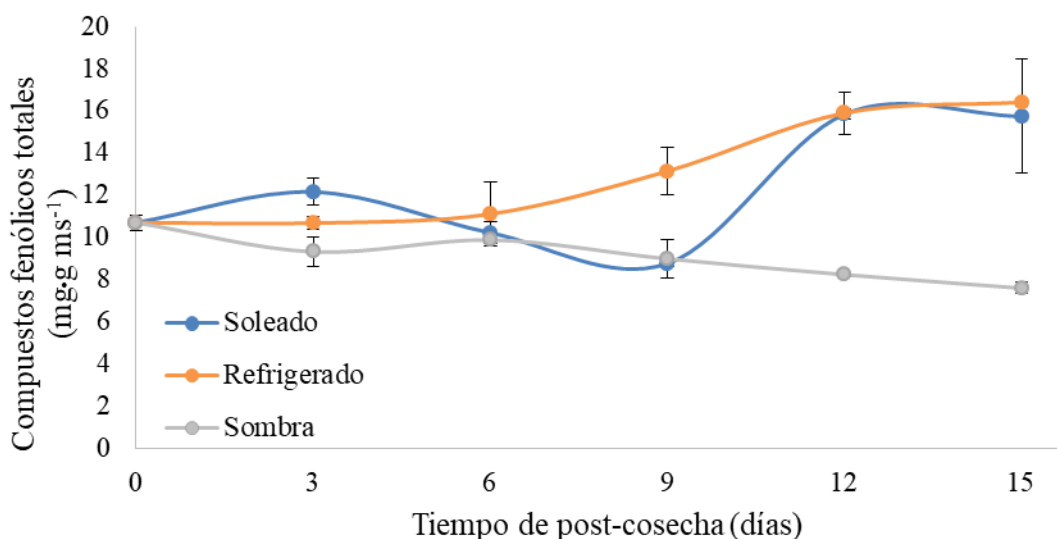
Las diferentes tonalidades indican diferentes niveles de significancia.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico a 280 nm de los compuestos fenólicos no antocianos principales de la accesión ARB5241 de mashua morada bajo distintos tratamientos post-cosecha. El control es el día 0 y se comparó con el día 15 de de los tres tratamientos evaluados. Picos: 1: Ácido gálico; 2 – 3: derivados de flavanol; 4 y 11: derivados de flavonol; 5: derivado de ácido cinámico; 6 – 10: derivados de ácido hidroxibenzoico. A: picos antocianos.

Con respecto al tratamiento sombra, se presentaron diferencias significativas en la concentración de seis compuestos fenólicos. El pico 2 aumentó 1,7 veces hasta el día 12 para luego disminuir significativamente a un valor correspondiente a 0,8 veces con respecto al inicial. El pico 3 (derivado de flavanol), disminuyó hasta quedar 0,7 veces de su contenido inicial. Los picos 5, 7 y 9 se redujeron entre 0,4 - 0,5 veces con respecto a sus contenidos iniciales (Cuadro 4).

La evolución del total de los compuestos fenólicos no antocianos determinados por UPLC®-PDA por cada día y cada tratamiento post-cosecha se muestran en la Figura 8. En los tratamientos soleado y refrigerado se observa un incremento significativo de su contenido desde el día 12. Mientras que en el tratamiento sombra la concentración de fenólicos no antocianos, disminuyó significativamente desde el día 12 de tratamiento post-cosecha y en general es menor que los tratamientos soleado y sombra.



**Figura 8.** Evolución del contenido total de los compuestos fenólicos determinados por cromatografía líquida UPLC®-PAD para los diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada

Estos resultados difieren de las curvas descritas en la Figura 6, donde se observa la evolución de los CFT determinados por espectrofotometría. Una de las causas de la diferencia, se debería al análisis espectrofotométrico realizado en donde se incluyó a las antocianinas así como a otros compuestos de carácter reductor (azúcares reductores, ácido ascórbico, proteínas, entre otros) que pudieron interferir en mayor o menor grado en la cuantificación de los mismos.

Los incrementos del total de compuestos fenólicos no antocianos, en los tratamientos soleado y refrigerado (Figura 8), se debieron principalmente a una mayor síntesis de un compuesto del tipo flavanol (pico 2). Otros compuestos que contribuyeron al total de los compuestos fenólicos no antocianos fue un flavonol (pico 11) en el tratamiento soleado y un derivado del ácido hidroxibenzoico (pico 6) en el tratamiento refrigerado (Cuadro 4).

Los resultados de esta investigación muestran en el tratamiento soleado, un incremento significativo de ácido gálico (pico 1), un derivado de flavanol (pico 2), de un derivado de flavonol (pico 11) y un derivado de hidroxibenzoico (pico 9). Los picos 2 y 11 se sintetizan a partir de la vía de flavonoides y los picos 1 y 9 a partir de la vía del shikimato (Figura 3). Estos resultados concuerdan con la inducción de la vía de flavonoides bajo estrés por calor (Martínez *et al.* 2016)

Así mismo, la concentración del derivado de ácido cinámico (pico 5) disminuye hasta ser indetectable en el tratamiento soleado (Cuadro 4). La disminución de este compuesto concuerda con la represión de los compuestos derivados del ácido cinámico en la vía fenil propanoides (Martínez *et al.*, 2013, Rivero *et al.*, 2001).

Chobot *et al.* (2009) evaluaron el desarrollo *in vitro* de plántulas de mostaza sometidas a estrés oxidativo por aplicación de metanol en el medio y exposición a oscuridad completa o doce horas de fotoperiodo. Ellos reportan que las catequinas (perteneciente a la familia de los flavanoles) pueden ayudar a las plantas a sobrevivir periodos de estrés. Este compuesto fenólico tiene una alta capacidad antioxidante pues reduce a los EROS y quelaciones de hierro. También se ha reportado que en el deterioro fisiológico post-cosecha (PPD) por daño mecánico en raíces de yuca hay una acumulación de flavanoles como las catequinas, galocatequinas y compuestos cumáricos como la escopoletina y esculetina que en conjunto tienen la función de reducir las EROS y disminuir el daño oxidativo (Reilly *et al.*, 2003)

Durante la evaluación del deterioro fisiológico post-cosecha (PPD) se determinó que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, compuesto involucrado en los estadios tempranos del PPD, se da durante las primeras 24 horas y la producción de catequinas se da entre los 4 y 6 días de post-cosecha más en dos cultivares durante las 24-48 horas. Los autores sugieren realizar

estudios enfocados en determinar el estadio donde comienza la síntesis de flavanoles (Buschmann *et al.*, 2000).

El derivado de flavonol del pico 4 es posiblemente un compuesto fenólico involucrado en la respuesta al estrés abiótico en el tratamiento soleado. Este compuesto cuantificado como derivado de flavonol sufriría una modificación solo en el tratamiento soleado que modifica su tiempo de retención convirtiéndolo en el derivado de flavonol del pico 11, posiblemente una acilación, pues este tipo de modificaciones incrementan el tiempo de retención (Kumar, 2017). Martínez *et al.* (2016) hallaron que plantas de tomate sometidas a estrés por calor o en combinación con salinidad ven estimulada la expresión de genes y enzimas relacionadas a la vía de flavonoides con una consecuente acumulación de flavonoles como kaempferol, rutina, quercetina y dehidrokaempferol.

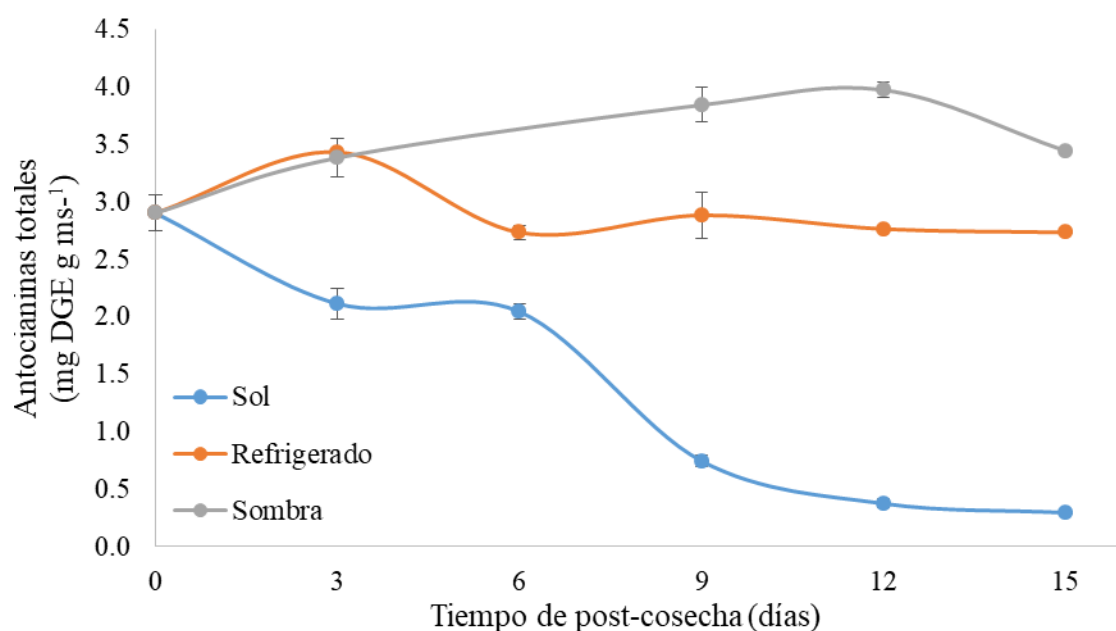
Otro ejemplo de acumulación de flavonoles bajo estrés abiótico es el mecanismo de tolerancia a la salinidad en la quinua, si bien este cultivo posee distintos mecanismos como enzimas antioxidantes y metabolitos osmoprotectores. Algunos cultivares (como el cultivar Titicaca) tienen como principal mecanismo el incremento de compuestos fenólicos, particularmente la rutina incrementa su concentración foliar entre 23 y 27 veces en las plantas sometidas a estrés salino. La rutina estaría involucrada indirectamente en la prevención de la pérdida de  $K^+$  porque al interactuar con las EROS impide la activación de las vías de eflujo de  $K^+$  inducidas por EROS. De esta forma se retiene el  $K^+$  y se bombea  $Na^+$  fuera de la célula (Hebatollah *et al.*, 2016).

Cuanto mayor sea el estrés por temperatura y radiación, la respuesta fisiológica por parte de la planta será más severa. El calor puede ocasionar daños a nivel de membranas celulares, alterar la eficiencia de la actividad enzimática y generar EROS al aumentar la tasa respiratoria mediada por la NADPH oxidasa de membrana plasmática (Lurie y Pedreschi, 2014; Königshofer *et al.*, 2008). Incluso en tubérculos de papa existe evidencia *in vitro* que las HSPs, específicamente la HSP17.7 estarían involucradas en la habilidad de tuberización bajo condiciones de estrés por calor (Ahn y Zimmerman, 2006). Esto demuestra que, un estrés por calor con temperaturas más altas ocasionaría los daños descritos con mayor severidad incluida la degradación de compuestos fenólicos.

## 4.2 Cuantificación de antocianinas totales y determinación del perfil de antocianinas

El contenido inicial de ACYT cuantificado por espectrofotometría fue  $2,9 \pm 0,16$  mg DGE·g ms<sup>-1</sup>. La evolución del contenido de ACYT se presenta en la Figura 9. Estudios previos en el genotipo ARB5241 han reportado un contenido de ACYT de 4,7 mg CGE g ms<sup>-1</sup> para tubérculos cosechados a los 7,5 meses (Chirinos *et al.*, 2007a). Para el mismo genotipo también se ha reportado ACYT en el rango entre 1,2 - 1,26 mg CGE g bh<sup>-1</sup> (base húmeda) (Chirinos *et al.*, 2006).

La concentración de ACYT para el tratamiento soleado disminuyó progresivamente. A los 15 días de tratamiento post-cosecha, se perdió el 90% del contenido inicial llegando a un valor de  $0,29 \pm 0,01$  mg DGE·g ms<sup>-1</sup>. Por lo tanto, la degradación por exposición al sol/calor de los compuestos antociánicos en la mashua es más severa e inmediata que con respecto a otras familias de compuestos fenólicos.



**Figura 9.** Evolución del contenido de antocianinas totales para diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada.

La degradación casi total de las antocianinas identificadas y cuantificadas bajo el tratamiento soleado correspondería posiblemente a una represión de las enzimas antocianidina sintasa/ leucoantocianidina dioxigenasa (ANS/LDOX) o UDP-glucosa flavonoide 3-*O*-glucosiltransferasa (UFGT) de la vía de flavonoides y una regulación

positiva de las enzimas antocianidina reductasa (ANR) y leucoantocianidina reductasa (LAR) para la síntesis de catequinas y epicatequinas (Liu *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2016).

Liu *et al.* (2018) indican que los factores involucrados en la regulación de la síntesis y degradación de antocianinas en Solanaceas son el tipo de luz y la temperatura. Una alta radiación de luz UV/azul (280 – 460 nm) puede activar factores de transcripción para la síntesis de antocianinas (SIAN<sub>2</sub> and CaMYB<sub>A</sub>); mientras que, en oscuridad se activan represores de los factores de transcripción involucrados en la degradación de antocianinas (PhMYB27).

Así mismo, bajas temperaturas estimulan la síntesis de antocianinas por activación de los factores de transcripción SIAN2, SIAN1 y SIJAF13. Altas temperaturas inducen la degradación por inhibición de activadores o inducción de represores. Si al estrés por calor se suma la producción de peróxidos y la actividad peroxidasa como consecuencias del estrés oxidativo la disminución del contenido de antocianinas se acelera considerablemente (Liu *et al.*, 2018).

En pétalos de petunia y el fruto de ciruela se ha detectado un incremento de peroxidasa clase III que se correlacionaba positivamente a la degradación de antocianinas. Si se aplicaban inhibidores de peroxidasa se observaba un incremento en el contenido de antocianinas a pesar de la alta concentración de peróxidos (Niu *et al.*, 2017; Movahed *et al.*, 2016).

Niu *et al.* (2017) reporta que durante el almacenamiento de ciruelas a 35 °C, la degradación de antocianinas resulta en un incremento de ácido protocatéquico. El ácido protocatéquico es el producto de la reacción de las antocianinas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es posible que en nuestro estudio el incremento del pico 9 (derivado de ácido hidroxibenzoico) durante el tratamiento soleado sea un reflejo de este fenómeno.

En el tratamiento refrigerado el contenido de ACYT aumentó significativamente al tercer día alcanzando  $3,43 \pm 0,00$  mg DGE·g ms<sup>-1</sup>, luego al sexto día disminuyó a  $2,73 \pm 0,06$  mg DGE·g ms<sup>-1</sup>, un contenido similar al inicial y se mantiene sin cambios significativos hasta el final del tratamiento post-cosecha. Estos resultados concuerdan con una represión de la



degradación de antocianinas a bajas temperaturas y una posible inhibición de la síntesis bajo condiciones de oscuridad (Liu *et al.*, 2018).

El tratamiento sombra mostró un incremento significativo y progresivo en la concentración de ACYT hasta el noveno día y luego se mantuvo sin cambios significativos hasta el término del tratamiento post-cosecha. Alcanzó un máximo valor de  $3,97 \pm 0,07$  mg DGE·g ms<sup>-1</sup> al día 12 y en los últimos tres días la concentración disminuyó en un 13%. Es posible que, en la mashua, el frío moderado y una baja intensidad de luz desempeñen un rol importante induciendo la síntesis de antocianinas.

Chirinos *et al.* (2006) determinaron el perfil de antocianinas para tres accesiones de mashua morada así como la capacidad antioxidante y la cuantificación de fenólicos totales y antocianinas. Determinaron que, para el genotipo ARB5241 las antocianinas contribuyen en un 28,8% en su capacidad antioxidante, mientras que para otros genotipos puede contribuir hasta 43,1% (DP0224). Los autores también, concluyeron que, otros grupos de compuestos fenólicos son los responsables de su capacidad antioxidante.

Los resultados presentados en las Figuras 8 y 9 son consistentes con la observación de Chirinos *et al.* (2006), se muestra que a los tres días del tratamiento soleado hay una síntesis e incremento en el contenido de CFT, que no corresponderían con la disminución constante de antocianinas. Incluso a partir del tercer día, la disminución de los CFT ocurre a una menor velocidad que las ACYT. Por lo tanto, durante los tres primeros días post-cosecha ocurriría la respuesta al estrés oxidativo por parte de los compuestos fenólicos no antocianos.

Las medias de los resultados de ACYT para los tres tratamientos post-cosecha evaluados a los diferentes días, se presentan en el Anexo 3. En general el ANOVA indicó diferencias significativas en la concentración de ACYT entre los factores día, tratamiento post-cosecha y su interacción (Anexo 4).

Con respecto al perfil de antocianinas obtenido por UPLC®-PDA, se pudo identificar a la delfinidina 3-glucósido (pico 2) y a la pelargonidina 3-glucósido (pico 5), adicionalmente se detectaron derivados de delfinidina 3-glucósido (picos 1, 3, 7, 8 y 9), un derivado de

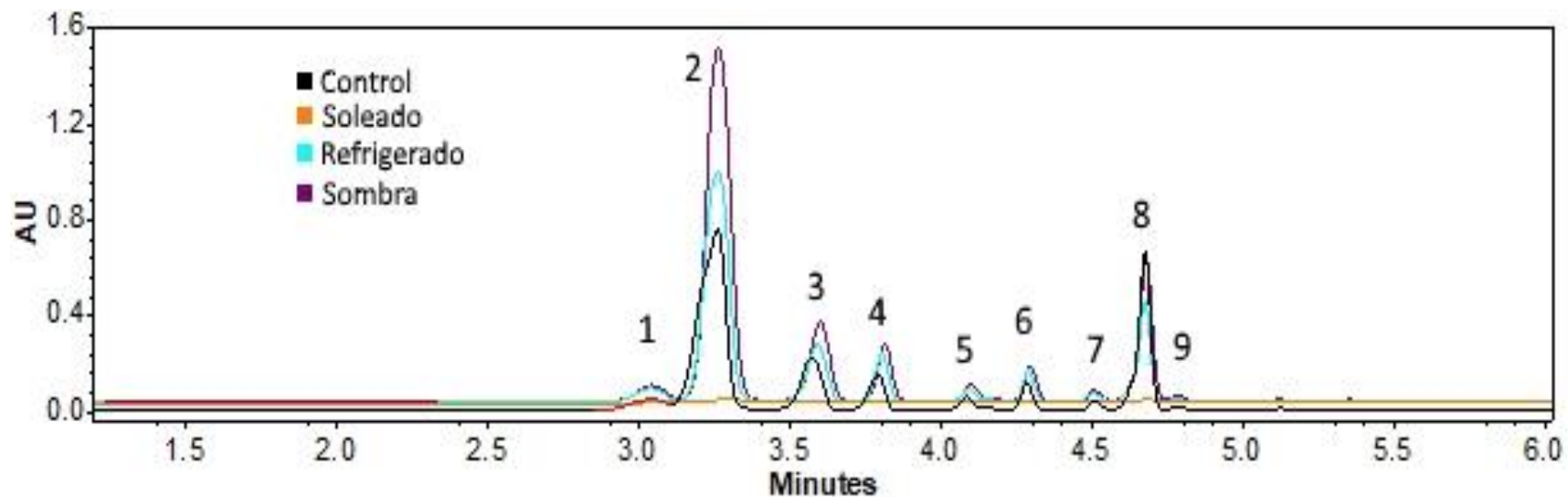
cianidina 3-rutinósido (pico 4) y un derivado de pelargonidina 3-glucósido (pico 6) (Cuadro 5 y Figura 10).

**Cuadro 5.** Características cromatográficas y espectrales de las principales antocianinas encontradas en los tubérculos del genotipo ARB5241. Las lecturas se hicieron a 520 nm.

| Pico | Tiempo de retención (min) | Antocianina asignada                    |
|------|---------------------------|---|
| 1    | 3,06                      | Derivado de Delfinidina 3-glucósido     |
| 2    | 3,27                      | Delfinidina 3-glucósido                 |
| 3    | 3,58                      | Derivado de Delfinidina 3-glucósido     |
| 4    | 3,80                      | Derivado de Cianidina 3-rutinósido      |
| 5    | 4,09                      | Pelargonidina 3-glucósido *             |
| 6    | 4,29                      | Derivado de Pelargonidina 3-glucósido * |
| 7    | 4,51                      | Derivado de Delfinidina 3- glucósido    |
| 8    | 4,68                      | Derivado de Delfinidina 3- glucósido    |
| 9    | 4,79                      | Derivado de Delfinidina 3- glucósido    |

\* Cuantificados como delfinidina 3-glucósido

Siete pigmentos antociánicos encontrados en esta tesis concuerdan con los obtenidos por Moscol (2013) y Chirinos *et al.* (2006). En el estudio de Chirinos *et al.* (2006) evalúan el contenido de antocianinas en tres genotipos de mashua, ARB5241, DP0224 y AGM5109, mediante (HPLC-DAD) y espectrometría de masas. Los pigmentos mayoritarios comunes para los tres genotipos fueron: delfinidina 3-glucósido-5-acetilramnósido, delfinidina 3-soforósido-5-acetilramnósido, delfinidina 3-glucósido-5-ramnósido, delfinidina 3-soforósido-5-ramnósido, delfinidina 3-glucósido, cianidina 3-soforósido, cianidina 3-soforósido-5-ramnósido. Dos pigmentos únicos se encontraron en el genotipo AGM5109: pelargonidina 3-soforósido y pelargonidina 3-soforósido-5-ramnósido.



**Figura 10.** Evolución del perfil cromatográfico a 520 nm de las antocianinas principales del genotipo ARB5241 de mashua morada bajo distintos tratamientos post-cosecha. Picos: 1, 3, 7-9 derivados de delphinidina 3-glucósido; 2: identificado como delphinidina 3-glucósido, 4: derivado de cianidina 3-rutinósido; 5: identificado como pelargonidina 3-glucósido; 6: derivado de pelargonidina 3-glucósido.

**Cuadro 6.** Concentración de las principales antocianinas encontradas en los tubérculos del genotipo ARB5241 durante los tratamientos post-cosecha: soleado, refrigerado y sombra.

| Trat.       | Día | mg • (100 g ms) <sup>-1</sup> |                |              |                |               |               |              |                |             | Total           |
|-------------|-----|-------------------------------|----------------|--------------|----------------|---------------|---------------|--------------|----------------|-------------|-----------------|
|             |     | Delfinidina                   | Delfinidina    | Delfinidina  | Cianidina      | Pelargonidina | Pelargonidina | Delfinidina  | Delfinidina    | Delfinidina |                 |
|             |     | A1                            | A2             | A3           | A4             | A5            | A6            | A7           | A8             | A9          |                 |
| Control     | D0  | 33,32 ± 4,75                  | 268,60 ± 1,52  | 64,34 ± 1,48 | 178,31 ± 24,34 | 14,73 ± 0,87  | 18,00 ± 1,82  | 9,39 ± 0,05  | 97,86 ± 19,02  | 7,21 ± 1,02 | 691,76 ± 42,34  |
|             | D3  | 35,98 ± 15,61                 | 243,34 ± 13,68 | 56,21 ± 4,72 | 162,48 ± 54,08 | 13,53 ± 3,11  | 15,23 ± 6,56  | 10,84 ± 3,61 | 114,06 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00 | 651,67 ± 53,49  |
|             | D6  | 16,67 ± 5,49                  | 134,91 ± 18,05 | 30,52 ± 4,22 | 104,75 ± 18,42 | 8,88 ± 2,42   | 9,90 ± 2,02   | 6,10 ± 2,02  | 46,41 ± 3,12   | 0,00 ± 0,00 | 358,13 ± 49,51  |
|             | D9  | 0,00 ± 0,00                   | 46,65 ± 6,95   | 10,49 ± 2,03 | 30,97 ± 6,42   | 0,00 ± 0,00   | 2,96 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00  | 16,12 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00 | 107,19 ± 11,33  |
|             | D12 | 0,00 ± 0,00                   | 12,85 ± 3,32   | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00    | 0,00 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00    | 0,00 ± 0,00 | 12,85 ± 3,32    |
|             | D15 | 0,00 ± 0,00                   | 7,70 ± 0,00    | 0,00 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00    | 0,00 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00   | 0,00 ± 0,00  | 2,70 ± 0,00    | 0,00 ± 0,00 | 10,40 ± 0,00    |
| Refrigerado | D3  | 43,21 ± 1,95                  | 309,26 ± 35,16 | 77,56 ± 5,01 | 211,77 ± 29,49 | 16,78 ± 0,28  | 21,87 ± 1,78  | 11,86 ± 0,71 | 125,96 ± 15,18 | 3,69 ± 0,37 | 821,97 ± 84,59  |
|             | D6  | 37,41 ± 1,58                  | 279,52 ± 24,46 | 66,85 ± 0,96 | 188,63 ± 12,75 | 15,04 ± 0,62  | 18,21 ± 1,26  | 10,68 ± 0,56 | 117,39 ± 5,15  | 3,49 ± 0,58 | 737,23 ± 43,64  |
|             | D9  | 24,94 ± 0,00                  | 309,30 ± 17,49 | 58,17 ± 3,25 | 245,82 ± 9,71  | 17,22 ± 1,34  | 24,70 ± 0,74  | 8,80 ± 0,01  | 147,14 ± 14,42 | 4,97 ± 0,91 | 841,05 ± 19,02  |
|             | D12 | 31,57 ± 7,56                  | 257,52 ± 8,72  | 60,06 ± 5,49 | 193,20 ± 33,83 | 13,99 ± 0,83  | 18,85 ± 3,59  | 9,05 ± 1,10  | 120,74 ± 57,69 | 3,42 ± 1,27 | 708,38 ± 74,36  |
|             | D15 | 31,65 ± 5,78                  | 347,82 ± 30,89 | 71,96 ± 5,76 | 231,38 ± 19,94 | 16,69 ± 3,15  | 22,91 ± 2,12  | 9,90 ± 3,16  | 60,97 ± 23,18  | 4,33 ± 0,00 | 797,61 ± 47,61  |
| Sombra      | D3  | 49,85 ± 17,2                  | 286,51 ± 0,00  | 74,33 ± 6,85 | 182,88 ± 46,25 | 19,95 ± 4,35  | 20,23 ± 1,07  | 16,21 ± 6,01 | 113,74 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00 | 763,71 ± 26,60  |
|             | D6  | 28,07 ± 6,26                  | 288,98 ± 12,93 | 64,57 ± 6,29 | 179,42 ± 3,29  | 12,87 ± 0,78  | 16,89 ± 0,26  | 8,09 ± 1,45  | 96,50 ± 4,20   | 0,00 ± 0,00 | 695,39 ± 27,08  |
|             | D9  | 39,98 ± 10,59                 | 462,98 ± 34,26 | 95,96 ± 7,48 | 286,86 ± 22,02 | 19,23 ± 0,67  | 27,46 ± 2,51  | 11,75 ± 2,50 | 147,58 ± 0,00  | 0,00 ± 0,00 | 1091,81 ± 29,63 |
|             | D12 | 37,59 ± 0,00                  | 359,47 ± 28,01 | 79,74 ± 4,25 | 288,97 ± 12,59 | 20,41 ± 1,12  | 28,21 ± 1,76  | 11,22 ± 0,20 | 189,96 ± 0,15  | 0,00 ± 0,00 | 1015,57 ± 38,88 |
|             | D15 | 43,94 ± 15,85                 | 437,62 ± 73,30 | 93,83 ± 1,68 | 276,24 ± 4,30  | 19,96 ± 1,8   | 26,21 ± 0,86  | 12,74 ± 3,73 | 149,08 ± 51,28 | 0,00 ± 0,00 | 1059,61 ± 2,84  |

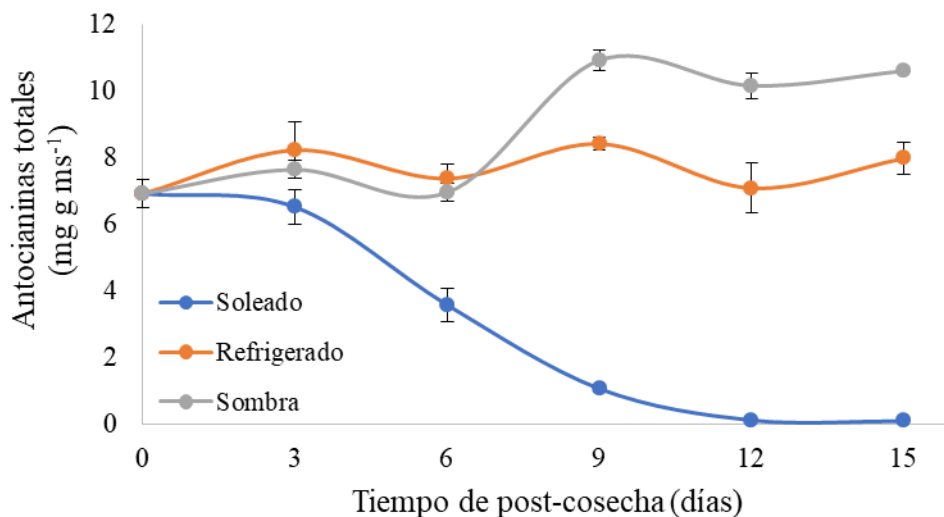
El nivel de significancia y los incrementos y decrementos en la concentración de cada compuesto fenólico con respecto al valor inicial están representados por:

| Incremento      | Decremento      |
|-----------------|-----------------|
| 0-0,001 (***)   | 0-0,001 (***)   |
| 0,001-0,01 (**) | 0,001-0,01 (**) |
| 0,01-0,05 (*)   | 0,01-0,05 (*)   |

Las diferentes tonalidades indican diferentes niveles de significancia.

El contenido de antocianinas totales inicialmente fue de  $691,8 \text{ mg} \cdot (100 \text{ g ms})^{-1}$  (Cuadro 6). Luego de 15 días de tratamiento soleado el contenido de antocianinas disminuyó significativamente a  $5,2 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g ms}^{-1}$ . El tratamiento refrigerado incremento su contenido a  $795,5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g ms}^{-1}$  y el tratamiento sombra presentó el más alto incremento significativo llegando al valor de  $1059,6 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g ms}^{-1}$ .

Los resultados en contenido de antocianinas hallado por UPLC® conservaron una tendencia similar con respecto a las ACYT halladas por el método de pH diferencial sin embargo los valores obtenidos por UPLC® casi duplicaron aquellos obtenidos por espectrofotometría (Figuras 10 y 11). Las diferencias entre los valores obtenidos por ambas metodologías ya han sido reportadas (Lee *et al.* 2008). Se considera que el método de pH diferencial no toma en cuenta las variaciones de acuerdo al grado de acilación y glicosilación que pueden influir al leer el conjunto de antocianinas bajo una sola longitud de onda. Adicionalmente el método cromatográfico con estándares adecuados puede cuantificar distintas antocianinas complejas (Lee *et al.* 2008).



**Figura 11.** Evolución del contenido de antocianinas totales para diferentes estreses post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada determinado por UPLC®-PDA.

Para el tratamiento soleado todas las antocianinas disminuyeron su concentración significativamente. El contenido de cada antocianina del tratamiento refrigerado se mantuvo sin alteraciones significativas al término de los 15 días de tratamiento.

El tratamiento sombra presentó incrementos significativos de 1,6 para la delfinidina 3-glucósido (pico 2) y de 1,5 veces para los derivados de delfinidina 3-glucósido (picos 3 y 8), el derivado de cianidina 3-rutinósido (pico 4), para el derivado de pelargonidina 3-glucósido (pico 6) y para el total de antocianinas. El incremento de las antocianinas totales fue significativo a partir del día 9. El derivado de delfinidina 3-glucósido (pico 9) se degrada completamente desde el inicio del tratamiento (Cuadro 6).

Al graficar los contenidos totales de antocianinas a partir del análisis cromatográfico (Figura 11) se observa que en el tratamiento soleado la concentración de antocianinas disminuye significativamente a partir del sexto día y en el tratamiento refrigerado se mantiene casi constante durante los 15 días de tratamiento post-cosecha. Sin embargo, para el tratamiento sombra hay un incremento significativo a partir del noveno día de tratamiento post-cosecha. Esta tendencia es interesante porque es un fenómeno inverso al que ocurre con los compuestos fenólicos no antociánicos del tratamiento soleado (Figura 6) y podría indicar algún tipo de regulación donde se puedan compartir las mismas enzimas en una vía metabólica.

### **4.3 Capacidad antioxidante hidrofílica**

La capacidad antioxidante hidrofílica (CAH) se cuantificó por dos metodologías: ORAC y ABTS, la evolución de estos resultados durante los 15 días post-cosecha se presentan en la Figura 12.

Los valores iniciales de CAH fueron en promedio 161,2 y 166,1  $\mu\text{mol TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$  para los métodos ORAC y ABTS, respectivamente. El desarrollo de esta característica por ambas metodologías (Figura 12) muestra un incremento al tercer día de la CAH, significativo para ABTS en los tres tratamientos post-cosecha y solo significativo para el tratamiento sombra bajo la metodología ORAC (Anexos 5 y 6). Luego, los valores disminuyen para el tratamiento soleado y se mantienen constantes para refrigerado y sombra (el nivel de significancia varió de acuerdo a la metodología utilizada).

Mediante la metodología ABTS el máximo valor de la CAH resultó para el día 3 del tratamiento refrigerado ( $256,4 \pm 1,67 \mu\text{mol TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$ ). Sin embargo, para la metodología

ORAC el máximo valor de capacidad antioxidante resultó para el día 12 del tratamiento sombra con  $215,1 \pm 2,67 \mu\text{mol TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$ . Ambas metodologías coinciden en señalar el mínimo valor de CAH para el día 12 del tratamiento soleado, con 82,8 y 114,6  $\mu\text{mol TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$  para ABTS y ORAC respectivamente.

Los resultados obtenidos por ambas metodologías se correlacionaron positivamente en los tres tratamientos post-cosecha,  $r = 0,95$ ; 0,47 y 0,80 para soleado, refrigerado y sombra respectivamente (Anexos 7, 8 y 9). Chirinos *et al.* (2007a) también reportaron una alta correlación para la evaluación de capacidad antioxidante por ABTS y ORAC en ocho genotipos de mashua ( $r = 0,79 - 0,95$ ).

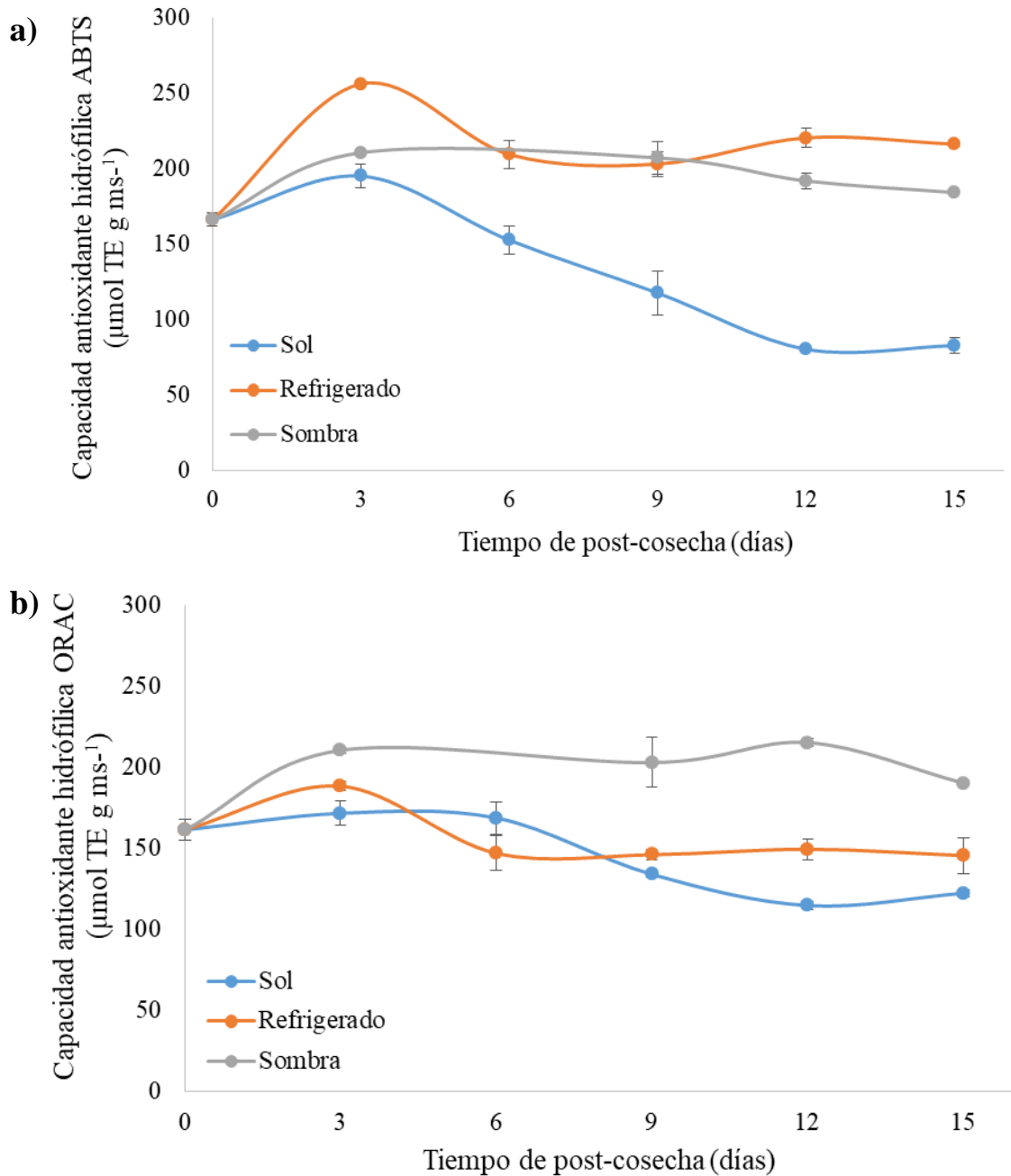
Las diferencias entre los resultados obtenidos por las metodologías ORAC y ABTS pueden deberse a la naturaleza del radical oxidante, la metodología misma y la interacción del medio de reacción con la muestra (Thaipong *et al.*, 2006; Prior *et al.*, 2003), por estas razones es recomendable utilizar más de una metodología para evaluar la capacidad antioxidante.

La CAH presentó una correlación negativa con los CFT no antocianos y positiva con las antocianinas bajo el tratamiento soleado ( $r = -0,55 - -0,47$  y  $r = 0,87 - 0,93$ ). Bajo el tratamiento refrigerado no hubo correlaciones significativas entre la CAH y alguna familia de compuestos en particular. Bajo el tratamiento sombra hubo una correlación negativa de la CAH con los CFT no antocianos y positiva con las antocianinas ( $r = -0,55 - -0,43$  y  $r = 0,46 - 0,63$ ) (Anexos 7, 8 y 9).

Los resultados indicarían que en el tratamiento soleado la pérdida en el contenido de antocianinas estaría directamente ligada con la disminución en la CAH en el tiempo. En el tratamiento sombra, el aumento en el tiempo de la CAH indicaría, una vez más, que las antocianinas son responsables de la evolución de la CAH durante los tratamientos post-cosecha.

En el tratamiento refrigerado el comportamiento oscilatorio puede deberse a la represión de la degradación de antocianinas a bajas temperaturas (Liu *et al.*, 2018) o inducción de la síntesis de antocianinas en frío como ocurre en el almacenamiento de papa a 4 °C (Lewis *et al.*, 1999). Chalker-Scott (1999) sugiere que algunos genes involucrados en la síntesis de

antocianinas se relacionan con la tolerancia al frío y por lo tanto serían inducidos a bajas temperaturas, sin embargo, también refieren que las temperaturas extremadamente bajas en ausencia de luz destruirían la capacidad biosintética.



**Figura 12.** Evolución de la capacidad antioxidante hidrofílica (CAH) para cada tratamiento post-cosecha del genotipo ARB524. a) Mediante la metodología ABTS y b) Mediante la metodología ORAC.



Chirinos *et al.* (2007a) cuantificaron la CAH para tres accesiones de mashua moradas. En promedio los valores obtenidos fueron 80 - 378  $\mu\text{mol de TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$  (ABTS) y 59 - 389  $\mu\text{mol de TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$  (ORAC), específicamente la accesión ARB5241 alcanzó el mayor valor: 446  $\mu\text{mol de TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$  (bajo la metodología ORAC). También cuantificaron los CFT, ACYT y flavanoles, y determinaron que la CAH estaba más correlacionada con los flavanoles ( $r = 0,948$ ) que con las antocianinas ( $r = 0,867$ ) durante el soleado post-cosecha. Se cree que los flavanoles pueden ser del tipo procianidinas (oligómeros de catequinas y epicatequinas).

La alta correlación con los flavanoles en la investigación de Chirinos *et al.* (2007a) puede deberse a que bajo el soleado post-cosecha, los compuestos fenólicos mayoritarios son los flavanoles debido a la degradación de las antocianinas (Cuadros 4 y 6). La capacidad antioxidante presente en los tubérculos soleados puede ser el resultado del contenido de flavanoles u otros compuestos como el ácido ascórbico (Ramón, 2017).

Otros valores calculados de CAH para la accesión ARB5241 fueron: 45,7  $\mu\text{mol TE}\cdot\text{g bh}^{-1}$  (ORAC) (Chirinos *et al.*, 2006); 601  $\mu\text{mol TE}\cdot\text{g ms}^{-1}$  (ORAC) (Chirinos *et al.*, 2008b). En esta investigación el valor inicial de la CAH fue menor con respecto a los obtenidos por Chirinos *et al.* (2007a, 2008b) posiblemente debido a las diferencias metodológicas en la preparación de los extractos. Chirinos *et al.* (2007a) utilizaron como solvente de extracción para la determinación de la CAH metanol puro, mientras que Chirinos *et al.* (2008b) utilizaron como solvente de extracción una mezcla de metanol/acetona/agua 45:45:10, y luego realizaron una re-extracción. Estos métodos son recomendables para cálculos de caracterización de la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos. En la presente investigación la extracción se realizó con metanol al 80. Si bien, los valores no alcanzan a los máximos reportados, el método fue práctico y permitió cumplir los objetivos de esta investigación que son la comparación entre los tratamientos post-cosecha y su efecto en el perfil de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del genotipo ARB5241 de mashua morada.

De otra parte, se calculó la capacidad antioxidante específica promediando los valores de la CAH hallados para ORAC y ABTS y dividiéndolos entre el promedio del contenido de CFT para cada tratamiento post-cosecha (Cuadro 7).

Los valores de capacidad antioxidante específica iniciales obtenidos en esta investigación coinciden con aquellos reportados previamente al momento de cosecha: 10,47-15,32  $\mu\text{mol TE}\cdot\text{mg AGE}^{-1}$  (Chirinos *et al.*, 2008b; Chirinos *et al.*, 2008a; Chirinos *et al.*, 2006).

**Cuadro 7.** Capacidad antioxidante específica para cada tratamiento post-cosecha del genotipo ARB5241 de mashua morada.

| Día | Capacidad antioxidante específica $\mu\text{mol TE}\cdot\text{mg AGE}^{-1}$ * |                               |                               |
|-----|---|-------------------------------|-------------------------------|
|     | Soleado   | Refrigerado                   | Sombra                        |
| 0   | 15,63 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>   | 15,63 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup> | 15,63 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup> |
| 3   | 15,57 $\pm$ 1,86 <sup>a</sup>   | 19,83 $\pm$ 5,16 <sup>a</sup> | 14,46 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> |
| 6   | 19,23 $\pm$ 1,96 <sup>a</sup>   | 17,91 $\pm$ 5,25 <sup>a</sup> | 15,6 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>  |
| 9   | 21,67 $\pm$ 2,91 <sup>a</sup>   | 17,79 $\pm$ 4,91 <sup>a</sup> | 14,68 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup> |
| 12  | 22,76 $\pm$ 9,51 <sup>a</sup>   | 18,68 $\pm$ 5,91 <sup>a</sup> | 12,87 $\pm$ 1,52 <sup>a</sup> |
| 15  | 23,81 $\pm$ 11,08 <sup>b</sup>  | 18,42 $\pm$ 5,92 <sup>a</sup> | 13,01 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>  |

\* Se promediaron los resultados de ORAC y ABTS. Distintas letras dentro de una columna indican diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

Se puede observar que la capacidad antioxidante específica incrementa para el tratamiento soleado llegando a ser significativamente diferente al día 15 de tratamiento post-cosecha. Posiblemente a pesar que el contenido de CFT y la capacidad antioxidante disminuyen en el tiempo, el remanente de CFT (compuestos fenólicos no antocianos) pueden poseer una capacidad antioxidante importante. Esta observación coincide con el incremento altamente significativo de los compuestos ácido gálico (pico 1) y el derivado de flavanol (pico 2) (Cuadro 4).

En el tratamiento refrigerado y en sombra no ocurren cambios significativos en la capacidad antioxidante específica. Posiblemente se deba a la ralentización/inhibición de la degradación de antocianinas del metabolismo por las bajas temperaturas (Liu *et al.*, 2018, Chalker-Scott, 1999).

Para estimar la capacidad inhibitoria de los compuestos fenólicos hacia las EROS, normalmente se reportan los datos de su concentración, la capacidad antioxidante, el cociente (capacidad antioxidante específica) y correlaciones entre estas variables (Jacobo-

Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009). Estas interpretaciones son válidas, pero a veces no consideran las diferencias en el perfil cualitativo y cuantitativo de fenólicos entre las muestras.

Para entender mejor el efecto del estrés abiótico post-cosecha en la evolución y síntesis de los compuestos fenólicos se correlacionó el perfil de compuestos fenólicos no antocianos y antocianinas para cada tratamiento post-cosecha con la CAH. De esta forma, se puede determinar que compuestos específicos son regulados positivamente o negativamente por el estrés y contribuyen a la capacidad antioxidante de estos tubérculos. Solo se discutirán las correlaciones con un  $p < 0.05$  (Anexos 7, 8 y 9).

En el tratamiento soleado, el derivado de flavanol (pico 2) se correlacionó negativamente con la capacidad antioxidante,  $r = -0,8$ . Este valor representa la disminución de la CAH en este tratamiento post-cosecha (Figura 12) y el incremento de la concentración del derivado de flavanol (pico 2, Cuadro 4). De igual forma, el ácido gálico (pico 1) y el derivado de flavonol (pico 11), presentan una correlación negativa moderada con  $r = -0,63$  y  $r = -0,51$ ; respectivamente.

Entre los compuestos que se correlacionaron positivamente con la capacidad antioxidante en el tratamiento soleado están un derivado de flavonol (pico 4,  $r = 0,92$ ), el derivado de ácido cinámico (pico 5,  $r = 0,83$ ) y los derivados de ácido hidroxibenzoico (picos 6, 8 y 10,  $r = 0,93$ ,  $0,97$  y  $0,76$  respectivamente). Así mismo, todas las antocianinas identificadas con los picos 1 al 8 fueron afectadas fuertemente por este tipo de estrés y sus correlaciones con la capacidad antioxidante están en el rango de  $r = 0,90 - 0,93$ . La correlación positiva en este caso indicaría que al disminuir la CAH, como ocurrió en este tratamiento post-cosecha (Figura 12), los compuestos antocianos disminuyen igualmente. Estos compuestos se degradarían o dejarían de sintetizar bajo el tratamiento soleado (Anexo 7).

La relación entre la regulación positiva de los flavonoles bajo el estrés por calor y la regulación negativa de los derivados del ácido cinámico ya ha sido reportada previamente en plantas de tomate sometidas a estrés por calor, salinidad y la combinación de ambos (Martinez *et al.*, 2016). En este estudio, bajo condiciones de estrés por calor hay una inducción de la fenilalanina amonía liasa (PAL) para formar ácido cinámico, luego la vía de fenil propanoides continua hasta formar *p*-cumaril CoA donde hay una represión de las

enzimas de esta vía y se induce la actividad de la chalcona sintasa y otras enzimas de la vía de flavonoides para producir kaemferol, rutina, quercetina y dihidrokaemferol (Figura 3).

Chirinos *et al.* (2007a) reportaron una correlación positiva para los flavanoles de tres accesiones de mashua morada con la capacidad antioxidante ( $r = 0.67 - 0.89$ ). Establecieron que aquellos genotipos con mayor CAH tenían una mayor concentración de flavanoles. Sin embargo en su estudio no se observó la relación directa entre la disminución de la CAH bajo el soleado post-cosecha y la disminución en el contenido de antocianinas ni la relación inversa entre la disminución de la CAH y el aumento de flavanoles (para un mismo genotipo).

En el tratamiento refrigerado la CAH tiene su máximo valor al tercer día y disminuye hasta un valor similar al inicial (ORAC) o superior (ABTS) al final del tratamiento post-cosecha (Figura 12). Debido a estas diferencias las correlaciones de cada compuesto fenólico difieren dependiendo de cada metodología.

En general no hay variaciones altamente significativas en el contenido de fenólicos y antocianinas. Un derivado de flavanol (pico 3) presentó una correlación negativa  $r = -0,63$  (ORAC) y  $r = -0,41$  (ABTS), un derivado de ácido hidroxibenzoico (pico 8) presentó una correlación negativa  $r = -0,70$  en ambas metodologías y una delphinidina 3-glucósido (pico 3) presenta una correlación positiva  $r = 0,64$  (ORAC) y  $r = 0,53$  (ABTS) (Anexo 8). El pico 2 a pesar que aumenta significativamente a partir del día 9 hasta llegar a un aumento de 4,4 veces en el día 15, obtuvo una baja correlación porque su desarrollo fue oscilatorio (Cuadro 4). En general las antocianinas presentaron comportamientos oscilatorios que no presentaban una correlación significativa con la capacidad antioxidante.

Es posible que en mashua el derivado de flavanol (pico 2) esté involucrado en la tolerancia a temperaturas extremas pues aumenta significativamente para soleado y refrigerado. Con respecto a las antocianinas, no hubo síntesis significativas. Es posible que la temperatura extremadamente baja y la oscuridad total en la que se mantuvieron los tubérculos hayan causado una represión de las enzimas ANS/LDOX o UFGT de la vía de flavonoides (Liu *et al.*, 2018). De igual forma la inducción de la síntesis de flavanoles por regulación positiva de la ANR y LAR es menor que en el tratamiento soleado pero mayor con respecto al control.

Existen reportes en variedades de papa que relacionan la respuesta al estrés por frío bajo almacenamiento a 4 °C con una oscilación en la concentración de compuestos fenólicos (Galani *et al.*, 2017; Kulen *et al.*, 2013). En ambos trabajos evalúan clones pigmentados durante tres a siete meses de almacenamiento y reportan que el daño oxidativo es mayor en los días iniciales porque se observaba una disminución de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante sin embargo al final del tratamiento ambos parámetros igualaban o excedían el contenido inicial al momento de cosecha. En general los derivados de ácido hidroxibenzoico aumentaban (ácido clorogénico, vainílico, protocatéquico y gálico) y a diferencia de los resultados de esta tesis, hubo una disminución del ácido *para* cumárico (derivado del ácido cinámico).

La producción del derivado de ácido cinámico (pico 5) en el tratamiento refrigerado no es significativa pero se mantiene constante durante los 15 días de tratamiento post-cosecha. La presencia de este derivado junto con un menor incremento del derivado de flavanol (pico 2) con respecto al tratamiento soleado, puede indicar que la inducción de la vía de flavonoides no es tan fuerte como en el estrés por calor y no se da una represión total de la vía de fenil propanoides (Martínez *et al.*, 2016, Martínez *et al.*, 2013).

El tratamiento sombra fue el único donde la capacidad antioxidante final se incrementó con respecto a la inicial. Incluso según los resultados por la metodología ORAC, el incremento fue significativamente diferente y mayor que los otros dos tratamientos post-cosecha evaluados (Figura 12). La mayoría de compuestos fenólicos presentaron correlaciones negativas: ácido gálico (pico 1,  $r = -0,58$ ), el derivado de flavanol (pico 3,  $r = -0,61$ ) y derivados de ácido hidroxibenzoico (picos 6-9,  $r = -0,64$  -  $-0,87$ ) (Anexo 9). En este caso como la tendencia de la CAH fue creciente, la correlación negativa indicaría que estos compuestos disminuyen y no contribuirían a la capacidad antioxidante total bajo este tipo de estrés

El derivado de catequina (pico 2) presentó una correlación positiva alta  $r = 0,47$ . Este compuesto es fundamental en los dos estreses anteriores (soleado y refrigerado) porque su concentración aumenta al final del tratamiento post-cosecha. En el tratamiento sombra, su concentración aumentó significativamente hasta el día 12 donde alcanzó un valor de  $210,1 \text{ mg} \cdot (100 \text{ g ms})^{-1}$  y luego disminuyó al final del tratamiento post-cosecha (Cuadro 4).

Las antocianinas juegan un rol importante para el tratamiento sombra, todas las antocianinas excepto el derivado de delfinidina 3-glucósido (pico 9) presentaron correlaciones positivas. La delfinidina 3-glucósido (pico 2) con un  $r = 0,47$ , los derivados de delfinidina 3-glucósido (picos 1, 3, 7 y 8) con un  $r = 0,50 - 0,61$ , el derivado de cianidina 3-rutinosido (pico 4) con un  $r = 0,54$  y la pelargonidina 3-glucósido (pico 5) y su derivado (pico 6) con un  $r = 0,77$  y  $0,67$ , respectivamente. Indicando que su aumento en concentración estaría relacionado directamente a la CAH de la mashua en este tratamiento.

Adicionalmente en el tratamiento sombra se pudo observar que la pelargonidina 3-glucósido y su derivado (picos 5 y 6) se correlacionan negativamente con los compuestos fenólicos derivados de flavanol (pico 3) y un derivado de ácido hidroxibenzoico (pico 6) con unos valores  $r = -0,74$  a  $-0,87$ . Esto es consistente pues la síntesis de derivados de flavanoles en este tratamiento disminuye con respecto al control y es probable que las enzimas que estén reguladas positivamente sean la DFR para la síntesis de leucodelfinidina, leucopelargonidina y leucocianidina y las enzimas ANS/LDOX para la síntesis de derivados de delfinidina, pelargonidina y cianidina. Este tratamiento, sombra, es el único donde se incrementa el contenido de antocianinas en un 53,2% y la capacidad antioxidante se incrementa un 14,4% (en promedio ORAC y ABTS) con respecto a la inicial.

Wang *et al.* (2013) reportan que la síntesis de antocianinas en hojas, tallos y raíces de camote morado bajo estrés por frío ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se correlacionan positivamente con la capacidad antioxidante. Ellos utilizaron RNAi (RNA de interferencia) para disminuir la expresión del gen *IbDFR*, responsable de la síntesis y acumulación de antocianinas, y observaron que las plantas transformadas no se recuperaban luego del estrés por frío a diferencia de las plantas control (*wild type*). Por lo tanto señalan que bajo esas condiciones las antocianinas son antioxidantes principales que protegen a los tejidos del daño oxidativo. Es posible que en los tubérculos de mashua bajo sombra el mecanismo de respuesta al estrés considere la síntesis de antocianinas más que en los estreses soleado y refrigerado.

Uno de los motivos por el que se solea la mashua es para incrementar el dulzor de los tubérculos. Sin embargo, el contenido de metabolitos secundarios se ve afectado grandemente, y por ende la mashua perdería sus propiedades benéficas. En un estudio

anterior se demuestra que el máximo contenido de sacarosa se alcanza a los seis días bajo tratamiento Soleado y a los quince días bajo el tratamiento Refrigerado ( $5,67 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  y  $5,12 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  respectivamente). Para el tratamiento sombra el máximo contenido de sacarosa se alcanza a los doce días,  $3,81 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  (Ramón, 2017). Considero que pruebas sensoriales podrían indicar si el nivel de dulzor alcanzado en el tratamiento sombra del día 12 es aceptable.

Poder determinar la evolución de los compuestos fenólicos antocianos y no antocianos en mashua nos permite identificar cual es el mejor tratamiento post-cosecha que se le puede dar a este tubérculo para incrementar su valor funcional. Estos estudios se complementan con los de Ramón (2017) donde se evalúan las propiedades fisicoquímicas y el contenido y evolución de metabolitos primarios en la mashua morada ARB5241 y el estudio de Moscol (2013) donde evalúan los tipos de cocción más adecuados para mantener las concentraciones de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Es importante considerar el objetivo final de los tubérculos, si es consumo en plato o para la industria de alimentos funcionales.

Estos resultados tienen un impacto en el agricultor que puede ofrecer un mejor producto y obtener un mejor precio por la mashua que cultiva o incluso se puede promover el cultivo de este tubérculo. Tiene un impacto sobre los consumidores de mashua como alimento por sus propiedades medicinales y sobre los posibles empresarios que busquen una alta concentración de metabolitos secundarios en mashua para la industria de nutraceuticos.

## V. CONCLUSIONES

- Se encontró una síntesis e incremento de los CFT durante los tres primeros días para los tres tratamientos post-cosecha. El valor más alto de CFT se obtuvo para el tratamiento sombra a los 12 días con  $14,92 \pm 0,23$  mg AGE·g ms<sup>-1</sup> sin embargo este valor no fue significativamente diferente desde el día 9 al 15. Con respecto a las ACYT solo se observó un aumento en el tratamiento sombra, donde el máximo valor fue a los 12 días con  $3,97 \pm 0,05$  mg DGE·g ms<sup>-1</sup> sin embargo no fue significativamente diferente desde el día 9 al 15.
- El máximo valor de CAH resultó para el día de 3 del tratamiento refrigerado con  $256.37 \pm 2.31$  μmol TE·g ms<sup>-1</sup> (ABTS) y para el día 12 del tratamiento sombra,  $215.3 \pm 3.70$  μmol TE·g ms<sup>-1</sup>(ORAC), este último no fue significativamente diferente desde el día 9. La CAH se correlacionó fuertemente con el contenido de ACYT para los tratamientos soleado y sombra de forma negativa y positiva, respectivamente. La correlación de CFT y ACYT con la CAH bajo el tratamiento refrigerado fue distinta y divergente para ambas metodologías.
- Se detectaron 11 compuestos fenólicos y 9 antocianinas principales mediante UPLC®-PAD. Se identificó el ácido gálico y se detectaron derivados de flavanoles, flavonoles, ácido cinámico y ácidos hidroxibenzoicos. Se identificaron las antocianinas delfinidina 3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido, también se detectaron siete derivados de delfinidina, cianidina y pelargonidina.



- El perfil de los compuestos fenólicos en el tratamiento soleado, mostró un incremento marcado de derivados de flavanoles y una disminución del derivado de ácido cinámico hasta la nulidad. Estos resultados muestran la represión de la vía de fenil propanoides para favorecer la vía de flavonoides y la regulación positiva de las enzimas ANR y LNR para la síntesis de flavanoles tipo catequinas y epicatequinas sobre la síntesis de antocianinas ante estreses abióticos. Esto concuerda con la disminución del contenido de antocianinas bajo este tratamiento post-cosecha. Es posible que, los derivados de flavanol estén involucrado en respuesta a temperaturas extremas pues aumenta significativamente para soleado y refrigerado.
- En el tratamiento sombra las antocianinas jugaron un rol importante indicando que su aumento en concentración contribuiría directamente al incremento en la capacidad antioxidante de la mashua en este tratamiento post-cosecha.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- El estudio se puede extender a genotipos amarillos de importantes contenidos en carotenos.
- Realizar pruebas sensoriales para correlacionar los tratamientos post-cosecha con mejores concentraciones de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante con la aceptación por parte del consumidor.
- Continuar el estudio metabolómico a nivel de metabolitos primarios y/o secundarios (otros a parte de los compuestos fenólicos) en muestras de mashua morada ARB5241 separando la piel de la pulpa del tubérculo.
- Realizar un estudio de análisis de RNA para detectar y cuantificar la expresión de genes y proteínas involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agatti, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 196:67-76.
- Aharoni, A., Galili, G. 2011. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology* 22:239-244.
- Ahn, YJ., Zimmerman, JL. 2006. Introduction of the carrot HSP17.7 into potato (*Solanum tuberosum* L.) enhances cellular membrane stability and tuberization in vitro. *Plant, Cell and Environment* 29:95–104.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed. Virginia, USA.
- Bennet, RN., Wallsgrave, RM. 1994. Tansley Review No. 72 Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytologist* 127(4):617-633.
- Bilger, W., Rolland, M., Nybakken, L. 2007. UV screening in higher plants induced by low 22 temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochemical and Photobiological Science* 23(6):190-195.
- Buschmann, H., Reilly, K., Rodriguez, MX., Tohme, J., Beeching, JR. 2000. Hydrogen Peroxide and Flavan-3-ols in Storage Roots of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) during Postharvest Deterioration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:5522-5529.

- Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R., Arbizu, C., Roca, W., Cisneros-Zevallos, L. 2006. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(10):1481-1488.
- Cartea, ME., Velasco, P., Obregon, S., Padilla, G., de Haro, A. 2008. Seasonal variation in glucosinolate content in crucifera oleracea crops grown in northwestern Spain. *Phytochemistry* 69:403-410.
- Chalker-Scott L. 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. *Photochemistry and Photobiology* 70(1):1-9.
- Chirinos, R., Campos, D., Betalleluz, I., Giusti, MM., Schwartz, SJ., Tian, Q., Pedreschi, R., Larondelle, Y. 2006. High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection (HPLC-DAD)/HPLC-Mass Spectrometry (MS) Profiling of Anthocyanins from Andean Mashua Tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz and Pavón) and Their Contribution to the Overall Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7089-7097.
- Chirinos, R., Campos, D., Arbizu, C., Rogez, H., Rees, JF., Larondelle, Y., Noratto, G., Cisneros-Zevallos, L. 2007a. Effect of genotype, maturity stage and post-harvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity, of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:437-446.
- Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R., Larondelle, Y. 2007b. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavon) tubers. *Separations and Purification Technology* 55(2007):217-225.
- Chirinos, R., Campos, D., Costa, N., Arbizu, C., Pedreschi, R., Larondelle, Y. 2008a. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón)

- tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* 106(3):1285-1298.
- Chirinos, R., Campos, D., Arbizu, C., Rogez, H., Rees, JF., Larondelle, Y., Noratto, G., Cisneros – Zevallos, L. 2008b. Effect of genotype, maturity stage and post-harvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity, of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:437-446.
  - Chobot V., Huber, C., Trettenhahn, G., Hadacek, F. 2009. ( $\pm$ )-Catechin: Chemical Weapon, Antioxidant, or Stress Regulator?. *Journal of Chemical Ecology*. 35:980–996.
  - Cisneros-Zevallos, L. 2003. The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables. *Journal of Food Science* 68(5):1560-1565.
  - Devasagayam, TPA., Tilak, JC., Boloor, KK., Sane, KS., Ghaskadbi, SS., Lele, RD. 2004. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of the Association of Physicians of India* 52:794-804.
  - Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., Tattini, M. 2012. Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stress. En: *Abiotic Stress Response in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. P. Ahmad y M.N.V. Prasad (eds). p:159-174.
  - Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., Mérillon, JM. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(5):1768-1774.
  - Espin, S., Villacres, E., Brito, B. 2004. Caracterización fisicoquímica, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos. En: *Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la Conservación y Uso Sostenible en el Ecuador* (editado por V. Barrera, C. Tapia y A. Monteros). Pp. 91–116. Quito-Lima: INAIA, IPC, COSUDE

- Facchini, PJ. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineering Applications. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 52:29-66.
- Fahey, JW., Zalcmann, AT., Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry 56:5-51.
- Galani, YJH., Mankad, MP., Shah, AK., Patel, NJ., Acharya, RR., Talati, JG. 2017. Effect of Storage Temperature on Vitamin C, Total Phenolics, UPLC Phenolic Acids profile and Antioxidant Capacity of Eleven Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties. Horticultural Plant Journal 3:73–89.
- Ghosh, D., Xu, J. 2014. Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. Frontiers in Plant Science 5(6):1-13.
- Giusti, MM., Wrolstad, RE. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Grau, A., Ortega, R., Nieto, C., Hermann, M. 2003. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 25. International Potato Center, Lima, Peru/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 65pp.
- Hebatollah, I., Dragišić, J., Maksimovic, V., Shabala, L., Živanovic, BD., Tian, Y., Jacobsen, SE., Shabala, Sergey. 2016. Rutin, a flavonoid with antioxidant activity, improves plant salinity tolerance by regulating K<sup>+</sup> retention and Na<sup>+</sup> exclusion from leaf mesophyll in quinoa and broad beans. Functional Plant Biology 43:75–86.
- Herrmann, K. 1976. Flavonols and flavones in food plants: a review. Journal of Food Science and Technology 11:433-448.

- Impa, SM., Nadaradjan, S., Jagadish, SVK. 2012. Drought Stress Induced Reactive Oxygen Species and Anti-oxidants in Plants. En: *Abiotic Stress Response in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. P. Ahmad y M.N.V. Prasad (eds). p:131-142.
- Instituto Nacional de Salud (INS Perú). 2009. *Tablas peruanas de composición de alimentos*. Elaborado por María Reyes García; Iván Gómez-Sánchez Prieto; Cecilia Espinoza Barrientos; Fernando Bravo Rebatta y Lizette Ganoza Morón. Ed. 8. Lima. 64 p
- Iwashina, T. 2000. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research* 113:287-299.
- Jacobo-Velázquez, DA., Cisneros-Zevallos, L. 2009. Correlations of Antioxidant Activity against Phenolic Content Revisited: A New Approach in Data Analysis for Food and Medicinal Plants. *Journal of Food Science* 74(9):107-113.
- Jing, P. 2006. *Purple Corn Anthocyanins: Chemical Structure, Chemoprotective Activity and Structure/Function Relationships*. Dissertation for the Degree Doctor of Philosophy the Graduate School of the Ohio State University. 287p.
- Kabera, JN., Semana, E., Mussa, AR., He, X. 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2:377-392.
- Königshofer, H., Tromballa, HW., Löppert, HG. 2008. Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant, Cell and Environment* 31:1771-1780.
- Kulen, O., Stushnoff, C., Holm, DG. 2013. Effect of cold storage on total phenolics content, antioxidant activity and vitamin C level of selected potato clones. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93:2437–2444.

- Kumar, R. 2017. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis* 7:349-364.
- Larkindale, J., Mishkind, M., Vierling, E. 2005. Plant responses to high temperatura. En: *Plant Abiotic Stress*. M.A. Jenks y P.M. Hasegawa (eds). p:100-144.
- Lee, J., Rennaker, C., Wrolstad, RE. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 110:782-786.
- Lewis, CE., Walker, JRL., Lancaster, JE. Changes in anthocyanin, flavonoid and phenolic acid concentrations during development and storage of coloured potato (*Solanum tuberosum* L) tubers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:311-316.
- Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, RE., Marcelis, LFM., Visser, RGF., Bovy, A. 2018. Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Frontiers in Chemistry* 6(52):1-17.
- Lurie, S., Pedreschi, R. 2014. Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research* 30:1-7
- Manrique, I., Arbizu, C., Vivanco, F., Gonzales, R., Ramírez, C., Chávez, O., Tay, D., Ellis, D. 2014. *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav. Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 122 p. [CD Rom].
- Martínez, MJ., Vilella-Antón, MT., Pedreño, MA., Valero, ML., Bru-Martínez, R. 2013. iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening. *BMC Plant Biology* 13(167):1-20.



- Martinez, VA., Mestre, TC., Rubio, F., Girones-Vilaplana, A., Moreno, DA., Mittler, R., Rivero, R. 2016. Accumulation of Flavonols over Hydroxycinnamic Acids Favors Oxidative Damage Protection under Abiotic Stress. *Frontiers in plant Science* 7(838):1-17
  
- Moscol, RE. 2013. Influencia de la cocción en el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas, flavanoles y glucosinolatos en la capacidad antioxidante de la mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón). Tesis para optar el grado de Ingeniero en Industrias alimentarias. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
  
- Movahed, N., Pastore, C., Cellini, A., Allegro, G., Valentini, G., Zenoni, S., Cavallini, E., D’Inca, E., Tornielli, GB., Filipetti, I. 2016. The grapevine VviPrx31 peroxidase as a candidate gene involved in anthocyanin degradation in ripening berries under high temperature. *Journal of Plant Research* 129:513–526.
  
- Niu, J., Zhang, G., Zhang, W., Goltsev, V., Sun, S., Wang, J., Li, P., Ma, F. 2017. Anthocyanin concentration depends on the counterbalance between its synthesis and degradation in plum fruit at high temperature. *Scientific Reports* 7:7684.
  
- Pichersky, E., Gang, DR. 2000. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science* 5(10): 439-445.
  
- Prakash, D., Gupta, C. 2012. Glucosinolates: The Phytochemicals of Nutraceutical Importance. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 9(1):1-15
  
- Prior, RL., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. 2003. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3273-3279.

- Prior, RL., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(10):4290-4302.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.Rproject.org/>.
- Ramallo, R., Wathelet, JP., Le Boulengé, E., Torres, E., Marlier, M., Ledent, JF., Guidi, A., Larondelle, Y. 2004. Glucosinolates in isaño (*Tropaeolum tuberosum*) tubers: qualitative and quantitative content and changes after maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(7): 701-706.
- Ramakrishna, A., Aswathanarayana, G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6:1720–1731.
- Ramón, FC. 2017. Efecto del estrés abiótico post-cosecha en las características físico-químicas y de algunos metabolitos primarios de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón). Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Lima, Perú, Universidad Nacional Agraria La Molina. 149 pp.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231-1237.
- Reilly, K., Gómez-Vásquez, R., Buschmann, H., Tohme, J., Beeching, JR. 2003. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 53:669-685.
- Rentzsch, M., Wilkens, A., Winterhalter, P. 2009. Non-flavonoid Phenolic Compounds. En: *Wine Chemistry and Biochemistry*, pp:509-527.

- Rivero, RM., Ruiz, JM., García, PC., López-Lefebvre, LR., Sánchez, E., Romero, L. 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* 160:315-321.
- Sabba, RP., Lulai, EC. 2005. Immunocytological analysis potato tuber periderm and changes in pectin and extension epitopes associated with periderm maturation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130(6):936-942.
- Sadilova, E., Stintzing, FC., Carle, R. 2006. Anthocyanins, Colour and Antioxidant Properties of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Violet Pepper (*Capsicum annuum* L.) Peel Extracts. *Zeitschrift für Naturforschung C* 61:527-535.
- Singleton, VL., Rossi, JA. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16(3):144-158
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis* 19:669-675.
- Thakur, BR., Rakesh, KS, Avtar, KH. 1997. Chemistry and uses of pectin – A review. *Critical reviews in food science and nutrition* 37:47-73.
- Tholl, D. 2015. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* 148:63-106.
- Wang, H., Fan, W., Li, H., Yang, J., Huang, J., Zhang, P. 2013. Functional Characterization of Dihydroflavonol-4- Reductase in Anthocyanin Biosynthesis of Purple Sweet Potato Underlies the Direct Evidence of Anthocyanins Function against Abiotic Stresses. *PLOS one* 8(11):1-14.
- Wang SY., Lin, HS. 2000. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:140-146.

- Yang, WL., Bernards, MA. 2007. Metabolite profiling of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers during wound-induced suberization. *Metabolomics* 3(2):147-158.

## VIII. ANEXOS

**ANEXO 1.** Compuestos fenólicos totales (CFT) para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241. Se muestran las medias de tres valores y desviación estándar. Distintas letras dentro de una columna indican diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

| Días | Soleado<br>(mg AGE•g ms <sup>-1</sup> ) | Refrigerado<br>(mg AGE•g ms <sup>-1</sup> ) | Sombra<br>(mg AGE•g ms <sup>-1</sup> ) |
|------|---|---|--|
| 0    | 10,63 ± 0,67 <sup>a</sup>               | 10,63 ± 0,67 <sup>a</sup>                   | 10,63 ± 0,67 <sup>a</sup>              |
| 3    | 12,54 ± 0,33 <sup>a</sup>               | 12,93 ± 1,16 <sup>b</sup>                   | 14,57 ± 0,18 <sup>b</sup>              |
| 6    | 7,94 ± 0,14 <sup>b</sup>                | 11,70 ± 0,53 <sup>b</sup>                   | 10,90 ± 0,44 <sup>a</sup>              |
| 9    | 5,43 ± 0,00 <sup>c</sup>                | 11,42 ± 0,79 <sup>b</sup>                   | 14,12 ± 0,53 <sup>b</sup>              |
| 12   | 3,53 ± 0,04 <sup>c</sup>                | 11,81 ± 0,23 <sup>b</sup>                   | 14,92 ± 0,16 <sup>b</sup>              |
| 15   | 3,48 ± 0,22 <sup>c</sup>                | 11,75 ± 0,86 <sup>b</sup>                   | 14,17 ± 0,47 <sup>b</sup>              |

**ANEXO 2.** Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de CFT con los factores tratamiento post-cosecha, día y la interacción de ambos como fuentes de variación.

|                 | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F)       |     |      |     |     |     |   |
|-----------------|----|--------|---------|---------|--------------|-----|------|-----|-----|-----|---|
| Tratamiento     | 3  | 273.55 | 91.18   | 322.49  | < 2e-16 ***  |     |      |     |     |     |   |
| Día             | 5  | 60.80  | 12.16   | 43.01   | 3.29e-11 *** |     |      |     |     |     |   |
| Tratamiento:Día | 15 | 159.76 | 10.65   | 37.67   | 5.05e-13 *** |     |      |     |     |     |   |
| Residuals       | 24 | 6.79   | 0.28    |         |              |     |      |     |     |     |   |
| ---             |    |        |         |         |              |     |      |     |     |     |   |
| signif. codes:  | 0  | '***'  | 0.001   | '**'    | 0.01         | '*' | 0.05 | '.' | 0.1 | ' ' | 1 |

**ANEXO 3.** Contenido de antocianinas totales (ACYT) para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241. Se muestran las medias de tres valores y desviación estándar. Distintas letras dentro de una columna indican diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

| Días | Soleado<br>(mg DGE·g ms <sup>-1</sup> ) | Refrigerado<br>(mg DGE·g ms <sup>-1</sup> ) | Sombra<br>(mg DGE·g ms <sup>-1</sup> ) |
|------|---|---|--|
| 0    | 2,90 ± 0,16 <sup>a</sup>                | 2,90 ± 0,16 <sup>a</sup>                    | 2,90 ± 0,16 <sup>a</sup>               |
| 3    | 2,11 ± 0,13 <sup>b</sup>                | 3,43 ± 0,00 <sup>b</sup>                    | 3,38 ± 0,17 <sup>b</sup>               |
| 6    | 2,04 ± 0,07 <sup>b</sup>                | 2,73 ± 0,06 <sup>a</sup>                    | 2,50 ± 0,00 <sup>a</sup>               |
| 9    | 0,74 ± 0,05 <sup>c</sup>                | 2,88 ± 0,20 <sup>a</sup>                    | 3,84 ± 0,15 <sup>c</sup>               |
| 12   | 0,37 ± 0,04 <sup>cd</sup>               | 2,76 ± 0,03 <sup>a</sup>                    | 3,97 ± 0,07 <sup>c</sup>               |
| 15   | 0,29 ± 0,01 <sup>d</sup>                | 2,73 ± 0,01 <sup>a</sup>                    | 3,44 ± 0,02 <sup>bc</sup>              |

**ANEXO 4.** Análisis de varianza (ANOVA) para el contenido de ACYT con los factores tratamiento post-cosecha, día y la interacción de ambos como fuentes de variación.

|                 | Df | Sum Sq | Mean Sq | F value | Pr(>F)       |
|-----------------|----|--------|---------|---------|--------------|
| Tratamiento     | 3  | 27.193 | 9.064   | 736.23  | < 2e-16 ***  |
| Día             | 5  | 5.003  | 1.001   | 81.28   | 3.03e-14 *** |
| Tratamiento:Día | 15 | 16.812 | 1.121   | 91.03   | < 2e-16 ***  |
| Residuals       | 24 | 0.295  | 0.012   |         |              |

---  
 Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

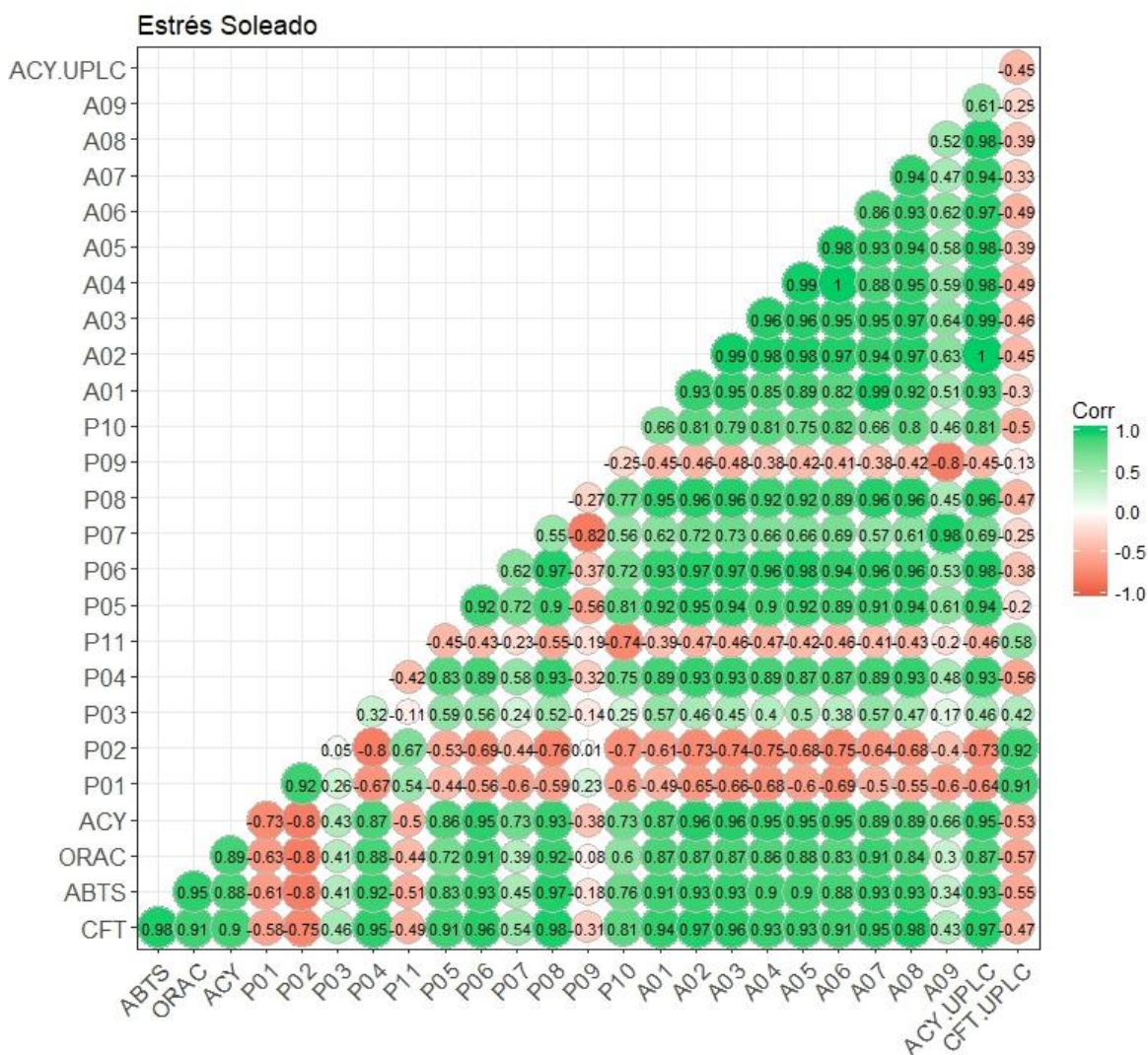
**ANEXO 5:** Capacidad antioxidante ABTS para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241. Se muestran las medias de tres valores y desviación estándar. Distintas letras dentro de una columna indican diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

| <b>Días</b> | <b>Soleado</b><br>( $\mu\text{mol TE g ms}^{-1}$ ) | <b>Refrigerado</b><br>( $\mu\text{mol TE g ms}^{-1}$ ) | <b>Sombra</b><br>( $\mu\text{mol TE g ms}^{-1}$ ) |
|-------------|--|--|---|
| 0           | 166,1 $\pm$ 4,52 <sup>a</sup>                      | 166,1 $\pm$ 4,52 <sup>a</sup>                          | 166,1 $\pm$ 4,52 <sup>a</sup>                     |
| 3           | 195,3 $\pm$ 7,63 <sup>b</sup>                      | 256,4 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>                          | 210,7 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>                     |
| 6           | 152,7 $\pm$ 9,39 <sup>a</sup>                      | 209,6 $\pm$ 9,19 <sup>c</sup>                          | 170,0 $\pm$ 2,33 <sup>a</sup>                     |
| 9           | 117,7 $\pm$ 14,8 <sup>c</sup>                      | 203,2 $\pm$ 8,12 <sup>c</sup>                          | 207,3 $\pm$ 10,91 <sup>b</sup>                    |
| 12          | 80,3 $\pm$ 0,88 <sup>d</sup>                       | 220,6 $\pm$ 6,58 <sup>c</sup>                          | 192,0 $\pm$ 5,20 <sup>ab</sup>                    |
| 15          | 82,8 $\pm$ 4,98 <sup>d</sup>                       | 216,4 $\pm$ 1,12 <sup>c</sup>                          | 184,4 $\pm$ 2,60 <sup>ab</sup>                    |

**ANEXO 6:** Capacidad antioxidante ORAC para cada tratamiento post-cosecha evaluado en el genotipo ARB5241. Se muestran las medias de tres valores y desviación estándar. Distintas letras dentro de una columna indican diferencias significativas con  $p < 0.05$ .

| <b>Días</b> | <b>Soleado</b><br>( $\mu\text{mol TE g ms}^{-1}$ ) | <b>Refrigerado</b><br>( $\mu\text{mol TE g ms}^{-1}$ ) | <b>Sombra</b><br>( $\mu\text{mol TE g ms}^{-1}$ ) |
|-------------|--|--|---|
| 0           | 161,2 $\pm$ 6,12 <sup>ab</sup>                     | 161,2 $\pm$ 6,12 <sup>ab</sup>                         | 161,2 $\pm$ 6,12 <sup>b</sup>                     |
| 3           | 171,5 $\pm$ 7,26 <sup>a</sup>                      | 188,3 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>                          | 210,4 $\pm$ 1,81 <sup>a</sup>                     |
| 6           | 168,7 $\pm$ 10,01 <sup>a</sup>                     | 146,8 $\pm$ 10,66 <sup>b</sup>                         | 161,0 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>                     |
| 9           | 133,8 $\pm$ 1,55 <sup>bc</sup>                     | 146,0 $\pm$ 3,44 <sup>b</sup>                          | 202,7 $\pm$ 15,32 <sup>a</sup>                    |
| 12          | 114,6 $\pm$ 2,52 <sup>c</sup>                      | 149,3 $\pm$ 6,48 <sup>b</sup>                          | 215,1 $\pm$ 2,67 <sup>a</sup>                     |
| 15          | 122,2 $\pm$ 2,15 <sup>c</sup>                      | 145,4 $\pm$ 11,06 <sup>b</sup>                         | 190,1 $\pm$ 7,22 <sup>a</sup>                     |

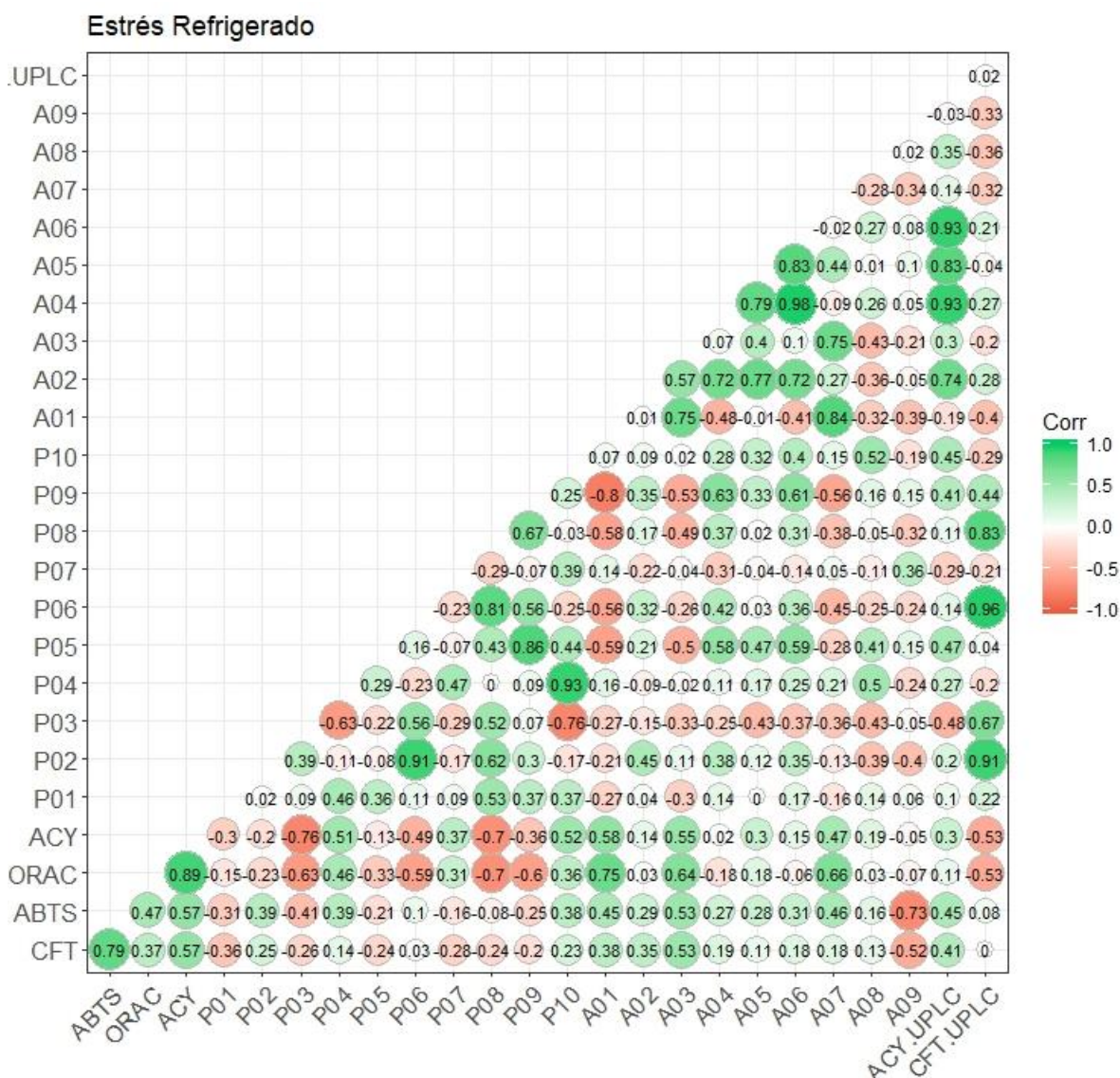
**ANEXO 7.** Correlaciones entre el perfil de compuestos fenólicos y antocianinas determinados por UPLC® con el contenido de CFT, ACYT y CAH bajo el tratamiento soleado.



P1: Ácido gálico; P2 – P3: derivados de flavanol; P4 y P11: derivado de flavonol; P5: derivado de ácido cinámico; P6 – P10: derivado de ácido hidroxibenzoico. A1-A3: delfinidina 3-glucósido; A4: derivado de Cianidina 3-rutinósido; A7-A9: derivados de delfinidina 3-glucósido. CFT: compuestos fenólicos totales; CFT.UPLC: compuestos fenólicos no antocianos determinados por UPLC®, ACY: antocianinas, ACY.U: antocianinas determinadas por UPLC®.

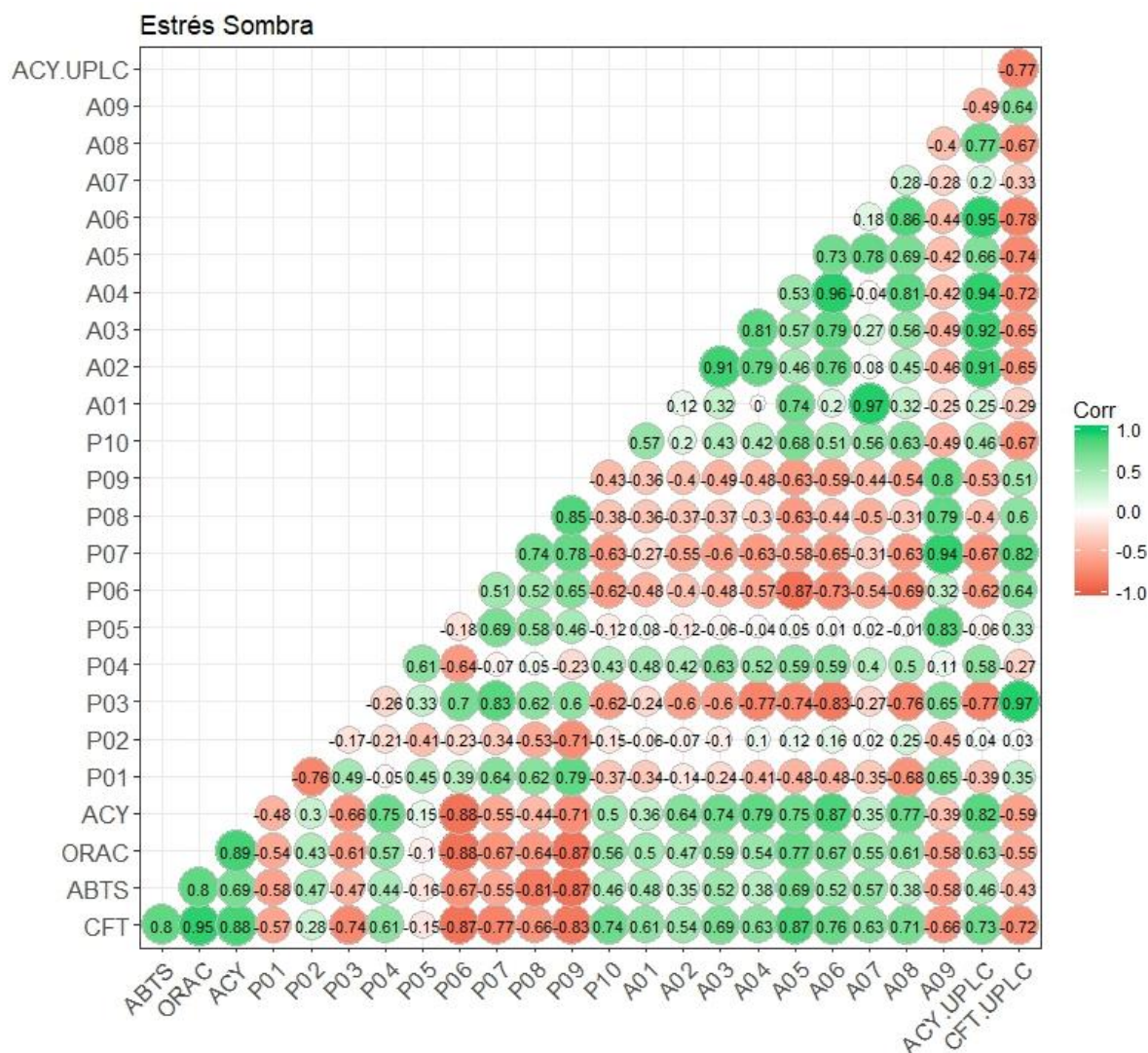


**ANEXO 8.** Correlaciones entre el perfil de compuestos fenólicos y antocianinas determinados por UPLC® con el contenido de CFT, ACYT y CAH bajo el tratamiento refrigerado.



P1: Ácido gálico; P2 – P3: derivados de flavanol; P4 y P11: derivado de flavonol; P5: derivado de ácido cinámico; P6 – P10: derivado de ácido hidroxibenzoico. A1-A3: delfinidina 3-glucósido; A4: derivado de Cianidina 3-rutinósido; A7-A9: derivados de delfinidina 3-glucósido. CFT: compuestos fenólicos totales; CFT.UPLC: compuestos fenólicos no antocianos determinados por UPLC®, ACY: antocianinas, ACY.U: antocianinas determinadas por UPLC®.

**ANEXO 9.** Correlaciones entre el perfil de compuestos fenólicos y antocianinas determinados por UPLC® con el contenido de CFT, ACYT y CAH bajo el tratamiento sombra.



P1: Ácido gálico; P2 – P3: derivados de flavanol; P4 y P11: derivado de flavonol; P5: derivado de ácido cinámico; P6 – P10: derivado de ácido hidroxibenzoico. A1-A3: delfinidina 3-glucósido; A4: derivado de Cianidina 3-rutinósido; A7-A9: derivados de delfinidina 3-glucósido. CFT: compuestos fenólicos totales; CFT.UPLC: compuestos fenólicos no antocianos determinados por UPLC®, ACY: antocianinas, ACY.U: antocianinas determinadas por UPLC®.