

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

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



**“IDENTIFICACIÓN DE ISOTIOCIANATOS Y DERIVADOS DE
GLUCOSINOLATOS DE MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)
PRODUCIDOS EN EL METABOLISMO DE ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN”**

Presentada por:

DANIEL CARLOS RAMÍREZ GUZMÁN

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

Lima - Perú

2022

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

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

**“IDENTIFICACIÓN DE ISOTIOCIANATOS Y DERIVADOS
DE GLUCOSINOLATOS DE MASHUA (*Tropaeolum tuberosum*)
PRODUCIDOS EN EL METABOLISMO DE ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

DANIEL CARLOS RAMÍREZ GUZMÁN

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Beatriz Hatta Sakoda
PRESIDENTE

Dra. Ana Aguilar Galvez
ASESOR

Dr. David Campos Gutiérrez
CO-ASESOR

Dra. Rosana Chirinos Gallardo
MIEMBRO

M.Sc. Wálfer Salas Valerio
MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A mis padres, Rosa y Carlos, por ser mi pilar fundamental, por haberme apoyado incondicionalmente y por llenar mi vida con sus valiosos consejos.

A mi esposa Aracely y mi hijo Ian, por brindarme su amor y apoyo incondicional que me ayudaron a lograr mis metas.

A mi hermano Raúl, por brindarme su compañía y apoyarme en todo momento.

A mi sobrina Gia, porque siempre consigues poner una sonrisa en mi cara cuando tengo poco ánimo.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora de tesis, Dra. Ana Aguilar Galvez, por su amplia experiencia, por sus consejos, enseñanzas, apoyo y sobre todo por su valiosa amistad, lo que me permitió desarrollar y culminar con éxito la tesis.

A mi co-asesor de tesis, Dr. David Campos Gutiérrez, por su importante apoyo y participación activa en el desarrollo de la tesis. Debo destacar que su participación ha enriquecido la tesis realizada.

A Diego García, por brindarme su apoyo y consejos durante el desarrollo de la tesis. Gracias amigo por tu paciencia y amistad hacia mi persona.

A Adelaida, Johana, Marianella y Paola, por sus consejos, apoyo y amistad. Gracias a ustedes porque contribuyeron con un granito de arena para culminar con éxito mi meta propuesta.

A los señores miembros del jurado de tesis, por la generosidad de corregir los borradores de tesis.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica-FONDECYT, por el financiamiento para el desarrollo de la presente investigación como parte del proyecto: “Síntesis de tiocianatos, nitrilos, epitionitrilos y otros con potencial anticancerígeno a partir de los glucosinolatos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*), usando bacterias lácticas” (Contrato N° 111-2018-FONDECYT).

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	LA MASHUA.....	3
2.1.1.	Generalidades.....	3
2.1.2.	Clasificación taxonómica.....	4
2.1.3.	Composición nutricional y fitoquímica	4
2.1.4.	Usos tradicionales de la mashua	6
2.1.5.	Situación actual de la mashua en el mercado nacional.....	6
2.2.	GLUCOSINOLATOS	7
2.2.1.	Isotiocianatos	9
2.2.2.	Metabolismo de los glucosinolatos e isotiocianatos	14
2.3.	CARCINOGENESIS	17
2.4.	EFFECTOS QUIMIOPREVENTIVOS DE LOS ISOTIOCIANATOS SOBRE EL CÁNCER.....	18
2.5.	EFFECTOS TÓXICOS DE LOS DERIVADOS DE GLUCOSINOLATOS	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	22
3.2.	MATERIA PRIMA.....	22
3.3.	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	22
3.3.1.	Materiales.....	22
3.3.2.	Equipos	23
3.3.3.	Reactivos.....	24
3.4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	25
3.4.1.	Determinación del contenido de humedad en harina de mashua.....	25
3.4.2.	Identificación y cuantificación de glucosinolatos en harina de mashua	25
3.4.3.	Recuento total de bacterias de <i>Lactobacillus</i> anaeróbicos y bacterias lácticas anaeróbicas en heces de animales de experimentación	26
3.4.4.	Identificación y cuantificación de isotiocianatos y otros derivados de la hidrólisis de glucosinolatos en muestras de sangre, orina y heces de animales de experimentación	27

3.4.5. Identificación y cuantificación de glucosinolatos en muestras de sangre, orina y heces de animales de experimentación.....	30
3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	31
3.5.1. Obtención de harina de mashua	31
3.5.2. Obtención de glucosinolatos de mashua.....	32
3.5.3. Cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG para administración oral a los animales de experimentación.....	33
3.5.4. Evaluación del metabolismo <i>in vivo</i> de los glucosinolatos de mashua en animales de experimentación.....	34
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	36
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSINOLATOS EN HARINA DE MASHUA	39
4.2. PURIFICACIÓN DE LOS GLUCOSINOLATOS PRESENTES EN HARINAS DE TUBÉRCULOS DE MASHUA	42
4.3. EVALUACIÓN DEL METABOLISMO <i>IN VIVO</i> DE LOS GLUCOSINOLATOS DE MASHUA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	43
4.3.1. Recuento total de bacterias de <i>Lactobacillus</i> anaeróbicos y bacterias lácticas anaeróbicas en heces de animales de experimentación	43
4.3.2. Identificación y cuantificación de glucosinolatos, isotiocianatos y otros derivados de la hidrólisis de glucosinolatos en muestras de sangre, orina y heces del metabolismo <i>in vivo</i> de animales de experimentación.....	46
4.4. POSIBLES EFECTOS BENÉFICOS DEL METABOLISMO DE LOS GLUCOSINOLATOS DE MASHUA.....	51
V. CONCLUSIONES	54
VI. RECOMENDACIONES	55
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
VIII. ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición nutricional de tubérculos andinos del Perú (por 100 gramos de parte comestible).....	5
Cuadro 2: Glucosinolatos de mashua y sus productos derivados.....	12
Cuadro 3: Contenido de humedad y glucosinolatos en harina de tubérculos de mashua almacenados a diferentes tiempos	39
Cuadro 4: Características físico-químicas del extracto concentrado de glucosinolatos de mashua	43
Cuadro 5: Recuento total promedio de bacterias de <i>Lactobacillus</i> y bacterias lácticas anaeróbicas en heces provenientes de animales de experimentación	44
Cuadro 6: Contenido promedio de 4-metoxibencil isotiocianato (4-MBITC) y 4-metoxibenzaldehído (4-MBCHO) en muestras orina recolectadas a diferentes horas	47
Cuadro 7: Contenido promedio de glucoalbúmina en muestras de plasma, heces y orina recolectadas a diferentes horas	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estructura química de los glucosinolatos	8
Figura 2:	Estructura de glucosinolatos: a) Glucosinalbina, b) Glucoaubrietina y c) Glucotropaeolina	9
Figura 3:	Hidrólisis de los glucosinolatos mediante la acción de la enzima mirosinasa y formación de isotiocianatos	10
Figura 4:	Metabolismo de los isotiocianatos por la ruta del ácido mercaptúrico	16
Figura 5:	Flujo de operaciones para la obtención de harina de mashua	32
Figura 6:	Flujo de operaciones para la obtención del extracto de glucosinolatos	34
Figura 7:	Diseño experimental para la evaluación del metabolismo <i>in vivo</i> de los glucosinolatos de mashua	38
Figura 8:	Contenido de glucosinalbina, glucotropaeolina, glucoaubrietina y glucosinolatos totales ($\mu\text{mol/g}$ bs) en harina de tubérculos de mashua almacenados a diferentes tiempos.....	40
Figura 9:	Contenido de 4-metoxibencil isotiocianato (nmol/mL) en muestras de orina de animales de experimentación recolectados a diferentes horas	50
Figura 10:	Ruta metabólica propuesta para los glucosinolatos de mashua.....	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Cromatograma de los glucosinolatos obtenido por UPLC®-PDA (229nm) de harina de mashua almacenada a diferentes tiempos	71
Anexo 2: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucosinolatos totales en harina de mashua	72
Anexo 3: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucosinalbina en harina de mashua	72
Anexo 4: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucotropaeolina en harina de mashua	73
Anexo 5: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucoaubrietina en harina de mashua	74
Anexo 6: Análisis estadístico para el recuento total de bacterias de <i>Lactobacillus</i> anaeróbicos y bacterias lácticas anaeróbicas en heces provenientes de animales de experimentación.....	74
Anexo 7: Registro de los pesos vivos de los animales experimentales (día 31).....	76
Anexo 8: Cantidad de heces y orina obtenidos por cada tratamiento y los tiempos evaluados	77
Anexo 9: Cromatogramas obtenidos por CG-MS de los derivados de la hidrólisis del 4-metoxibencil glucosinolato (glucoaubrietina) de muestras de sangre, orina y heces de animales experimentales.....	78
Anexo 10: Cromatograma obtenido por UPLC-qTOF-MS-MS del 4-metoxibencil glucosinolato (glucoaubrietina) extraído de las muestras de orina de los animales de experimentación.....	78
Anexo 11: Análisis estadístico para contenido de Glucoaubrietina a 1 hora de recolección en muestras de heces.....	79
Anexo 12: Análisis estadístico para contenido de Glucoaubrietina a 1 hora de recolección en muestras de orina	79
Anexo 13: Análisis estadístico para contenido de Glucoaubrietina a las 3 horas de recolección en muestras de orina.....	80
Anexo 14: Análisis estadístico para contenido de Glucoaubrietina a las 5 horas de recolección en muestras de orina.....	80
Anexo 15: Análisis estadístico para contenido de Glucoaubrietina a las 9 horas de recolección en muestras de orina.....	81

Anexo 16: Análisis estadístico para contenido de Glucoabrietina a las 30 horas de recolección en muestras de orina.....	82
Anexo 17: Análisis estadístico para contenido de Glucoabrietina a las 24 horas de recolección en muestras de orina.....	82
Anexo 18: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibencil isotiocianato a las 3 horas de recolección en muestras de orina	83
Anexo 19: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibencil isotiocianato a las 5 horas de recolección en muestras de orina	83
Anexo 20: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibencil isotiocianato a las 9 horas de recolección en muestras de orina	84
Anexo 21: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibenzaldehido a las 5 horas de recolección en muestras de orina.....	84
Anexo 22: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibenzaldehido a las 9 horas de recolección en muestras de orina.....	85
Anexo 23: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibenzaldehido a las 24 horas de recolección en muestras de orina.....	85

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue identificar y cuantificar los isotiocianatos y derivados de los glucosinolatos (GLS) de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) producidos en el metabolismo de animales de experimentación (ratas). Una etapa previa del trabajo consistió en obtener los GLS de mashua, los resultados obtenidos mostraron que el contenido de GLS totales de las harinas de los tubérculos de mashua disminuyeron durante el tiempo de almacenamiento poscosecha. La purificación de los GLS de la harina de mashua mostró que la Polivinilpirrolidona eliminó los compuestos fenólicos totales en el rango de 50-55 por ciento, mientras que el porcentaje de recuperación de GLS totales fue de 61 por ciento. Para el ensayo *in vivo* se utilizó 54 ratas albinas machos de la raza Holtzman agrupadas al azar en tres grupos (tratamientos): T1 (control, tracto gastrointestinal no colonizado (BAL-) y no dosificadas con glucosinolatos (GLS-)), T2 (control colonización negativa, BAL- y dosificadas con glucosinolatos (GLS+)) y T3 (tratamiento en estudio, tracto gastrointestinal colonizado (BAL+) y GLS+). La colonización se realizó mediante dosificación oral de 1.4×10^9 UFC de bacteria ácido láctica (BAL), *Lactobacillus rhamnosus* GG, durante 30 días consecutivos. Los animales GLS+, fueron dosificados oralmente con una única dosis de 65.2 mg (148.7 μ mol) de GLS totales/Kg de peso vivo el día 31 del ensayo. Se recolectaron muestras de heces, orina y plasma sanguíneo a las 1, 3, 5, 9, 24 y 30 horas de los tres tratamientos de dosificación de GLS(+) o GLS(-). Los resultados mostraron que el probiótico colonizó el tracto gastrointestinal a los 20 días. Respecto al metabolismo *in vivo* de los GLS, solo la glucoaubrietina (GAU) fue detectada en cantidades trazas hasta las 3 horas en muestras de plasma de los tratamientos T2 y T3, lo que evidenció que fue absorbida y pasó a la circulación enterohepática. La GAU fue eliminada en las heces (0.01 y 0.03 por ciento de la dosis oral, para los tratamientos T2 y T3, respectivamente) y en orina (0.60 y 0.62 por ciento de la dosis oral, para los tratamientos T2 y T3, respectivamente). Finalmente, se concluye que el consumo de GLS por animales de experimentación son absorbidos y metabolizados, dando origen a isotiocianatos, nitrilos, entre otros compuestos que han sido relacionados beneficios para la salud, estos compuestos se ven incrementados cuando el probiótico *L. rhamnosus* GG coloniza el tracto gastrointestinal.

Palabras claves: Mashua; *Tropaeolum tuberosum*; glucosinolatos; metabolismo; *Lactobacillus rhamnosus* GG; isotiocianato.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify and quantify the isothiocyanates and glucosinolate derivatives (GLS) of mashua tuber (*Tropaeolum tuberosum*) produced in the metabolism of experimental animals (rats). A previous stage of the present work consisted in obtaining the GLS of mashua, the results obtained showed that the content of total GLS of the flours of the mashua tubers decreased during the postharvest storage time. The purification of GLS from mashua tuber flours showed that the Polyvinylpyrrolidone eliminated the total phenolic compounds in the range of 50-55 percent, while the recovery percentage of total GLS was 61 percent. For the *in vivo* study, 54 Holtzman male albino rats were randomly distributed into three groups (treatments): T1 (control, non-colonized gastrointestinal tract (BAL-) and not dosed with glucosinolates (GLS-)), T2 (negative colonization control, BAL- and dosed with glucosinolates (GLS+)) and T3 (treatment under study, colonized gastrointestinal tract (BAL+) and GLS+). Colonization was carried out by oral dosing with 1.4×10^9 CFU of *Lactobacillus rhamnosus* GG (BAL) per day for 30 days. The animals (GLS+) were orally dosed with a single dose of 65.2 mg (148.7 μ mol) of total GLS/Kg of body weight on day 31 of study. Feces, urine and blood plasma samples were collected at 1, 3, 5, 9, 24 and 30 hours from the three dosing treatments GLS(+) or GLS(-). The results showed that the probiotic bacterium colonized the gastrointestinal tract at 20 days. In respect to the *in vivo* metabolism of GLS, only glucoaubrietin (GAU) was detected in trace amounts up to 3 hours in blood plasma samples from treatments T2 and T3, which showed that it was absorbed and subjected to the enterohepatic circulation. The GAU was excreted in the feces (0.01 and 0.03 percent of the oral dose, for treatments T2 and T3, respectively) and urine (0.60 and 0.62 percent of the oral dose, for treatments T2 and T3, respectively). It can be concluded that the consumption of GLS by experimental animals are absorbed and metabolized, which produced isothiocyanates, nitriles, among other compounds that have been related to health benefits, these compounds are increased when the *L. rhamnosus* GG probiotic bacterium colonizes the gastrointestinal tract.

Keywords: Mashua; *Tropaeolum tuberosum*; glucosinolate; metabolism; *Lactobacillus rhamnosus* GG; isothiocyanate.

I. INTRODUCCIÓN

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), conocida como “añu”, “isaño” o “cubio”, es una planta herbácea perenne de origen andino. Su área de distribución se extiende desde Colombia hasta el norte de Argentina, entre los 2,400 hasta 4,300 m.s.n.m y las mayores áreas de siembra se encuentran en Perú y Bolivia (Manrique *et al.* 2013). Posee propiedades bactericidas, nematocidas, fungicidas, insecticidas y repelente de insectos por lo que se siembra en asociación con otros tubérculos más susceptibles como la papa y la oca (Suquilanda s.f.).

La mashua es un tubérculo que aporta un bajo contenido de energía, mayor valor de fibra dietaria y mayores valores de vitaminas A y C, en relación a la papa, olluco y oca (Reyes *et al.* 2017). La mashua también es importante por su contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas (Chirinos *et al.* 2006); dentro de los compuestos fenólicos se destaca la presencia del ácido gálico y compuestos derivados de los flavanoles, flavonoles, ácido cinámico y ácidos hidroxibenzoicos; la delfinidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido constituyen las antocianinas más representativas (Santayana 2018). La mashua también es una fuente importante de glucosinolatos, donde se puede encontrar a la glucoaubrietina (4-metoxibencil glucosinolato), glucotropaeolina (bencil glucosinolato), *p*-hidroxibencil glucosinolato (glucosinalbina) (Campos *et al.* 2019); y también a la glucolimnantina (m-metoxibencil glucosinolato) (Ortega *et al.* 2006).

En humanos, los glucosinolatos ingeridos se convierten en diversos productos de degradación (isotiocianatos, tiocianatos, indoles, entre otros) cuando los vegetales que los contienen son masticados, porque durante este proceso entran en contacto con la enzima mirosinasa, que los hidroliza (Vig *et al.* 2009). El sistema digestivo humano no produce mirosinasa, se sostiene que la conversión de glucosinolatos a isotiocianatos es mediada por la acción de la microbiota del colon (Dinkova-Kostova y Kostov 2012). Los isotiocianatos son compuestos lipofílicos no nutrientes y siguen los mismos eventos biotransformativos que los compuestos xenobióticos y están sujetos a una respuesta metabólica en el hígado y el intestino delgado (Johnson *et al.* 2016).

Los glucosinolatos e isotiocianatos de la mashua tienen propiedades específicas, Natella *et al.* (2014), reportaron que la glucosinalbina puede actuar como un antioxidante ya que es muy activa en la eliminación de radicales ABTS; Tawfiq *et al.* (1995), reportaron que la glucosinalbina actúa como un agente bloqueador contra la carcinogénesis al inducir la actividad de la enzima marcadora de la fase II anticancerígena (quinona reductasa). Por otro lado, la glucoaubrietina tiene acción biológica en la inhibición del crecimiento fúngico del patógeno de la papa *Phytophthora infestans* (Martín e Higuera 2016). En relación a los isotiocianatos de la mashua, Li *et al.* (2011), reportaron que la identificación de especies de bacterias intestinales asociadas con la conversión de glucosinolatos en isotiocianatos podría servir de estrategias prebióticas y probióticas para alterar la producción *in vivo* de isotiocianatos, permitiendo a las personas obtener más beneficios para la salud a partir del consumo de vegetales crucíferos. En ese sentido, Johns *et al.* (1982), reportaron que el bencil isotiocianato (derivado de la hidrólisis de la glucotropaeolina) y el 4-metoxibencil isotiocianato (derivado de la hidrólisis de la glucoaubrietina) poseen capacidad antimicrobiana contra el hongo *Candida albicans*; y contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus albus*. En referencia al isotiocianato de la glucosinalbina (4-hidroxibencil isotiocianato), La Marca *et al.* (2012), reportaron que este isotiocianato es un inductor efectivo de genes antioxidantes/desintoxicantes regulados por ARE/Nrf2 y tienen el potencial de inhibir, al menos en el hígado de rata, la bioactivación de carcinógenos dependientes de la catálisis CYP3A2. El consumo de la mashua, permite incorporar al organismo propiedades no solo nutricionales, sino también propiedades quimiopreventivas que son capaces de reducir el riesgo de desarrollar diversas condiciones patológicas, entre ellas las enfermedades de base inflamatoria (Caballero-Gutiérrez y González 2016).

Por lo expuesto, el objetivo general del presente trabajo de investigación fue identificar y cuantificar los isotiocianatos y derivados de los glucosinolatos de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) producidos en el metabolismo de animales de experimentación (ratas). Los objetivos específicos fueron: 1) Evaluar el contenido y perfil de glucosinolatos en las harinas de tubérculos de mashua sometidas a estrés abiótico; 2) Evaluar el contenido y perfil de glucosinolatos durante la purificación de glucosinolatos con Polivinilpolipirrolidona (PVPP) de harina de los tubérculos de mashua; y 3) Evaluar el efecto de la dosificación con *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre la colonización en el tracto gastrointestinal de ratas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. LA MASHUA

2.1.1. Generalidades

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), conocida también como “añu”, “isaño” o “cubio”, es una planta herbácea perenne de origen andino. Su área de distribución se extiende desde Colombia hasta el norte de Argentina, entre los 2,400 hasta 4,300 m.s.n.m. También se cultiva en Nueva Zelanda y Canadá. Las mayores áreas de siembra se encuentran en Perú y Bolivia, donde se cultivan en asociación con otros tubérculos como la oca (*Oxalis tuberosa*), el ulluco (*Ullucus tuberosus*) y la papa (*Solanum tuberosum*) (Manrique *et al.* 2013).

Es un tubérculo que posee una gran facilidad para desarrollarse en suelos pobres, sin uso de fertilizantes y pesticidas. Además, tiene propiedades bactericidas, nematocidas, fungicidas, insecticidas y repelente de insectos, por las que se siembra juntamente con otros tubérculos más susceptibles como la papa y la oca (Suquilanda s.f.).

Desde el punto de vista botánico, es una planta herbácea anual de 20 a 90 centímetros de altura y tiene un periodo vegetativo que varía de 180 a 280 días. Durante su periodo de cosecha puede llegar a tener un rendimiento que varía entre los 18,000 a 48,000 kg/ha de tubérculos frescos (Velarde y Ríos 2009). Los tubérculos tienen yemas alargadas y profundas, son de forma cónica o elipsoidal y se pueden clasificar en: (a) tubérculos de color uniforme generalmente blanco, amarillo o anaranjado, (b) tubérculos con pigmentos de antocianina ubicados sólo en las yemas, (c) tubérculos muy coloreados en las yemas con antocianinas y (d) tubérculos con yemas pigmentadas y con franjas longitudinales rojas o moradas (Tapia y Fries 2007).

De acuerdo al color del tubérculo, los pobladores peruanos le asignan los siguientes nombres tradicionales: (a) “Yana añu” para los tubérculos negros, (b) “Kello añu” para los tubérculos

amarillos, (c) “Muru añu” para los tubérculos morados, (d) “Puka añu” para los tubérculos rojizos, entre otros (Velarde y Ríos 2009). Siguiendo el mismo criterio, se han reconocido muchas variedades como: blanca, amarilla, chaucha, morada y zapallo. La mashua blanca es una variedad rara, pequeña y precoz, mientras que la mashua amarilla es la más difundida y alcanza un mayor tamaño que la chaucha (Suquilanda s.f.).

2.1.2. Clasificación taxonómica

Según el Sistema de Información Taxonómica Integrada (ITIS 2017) la mashua está ubicada en la siguiente jerarquía taxonómica:

Reino : Plantae
División : Tracheophyta
Clase : Magnoliopsida
Orden : Brassicales
Familia : Tropaeolaceae
Género : Tropaeolum L.
Especie : *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav.

2.1.3. Composición nutricional y fitoquímica

La mashua es un tubérculo que posee atributos interesantes (Cuadro 1) ya que es un cultivo que aporta un bajo contenido de energía en comparación a la papa, olluco y oca. Asimismo, aporta un mayor valor de fibra dietaria y además contiene mayores valores de vitaminas A y C, en comparación con la papa, olluco y la oca (Reyes *et al.* 2017).

La mashua también es importante por su contenido de compuestos fenólicos totales y antocianinas. Chirinos *et al.* (2006), reportaron que tres genotipos de mashua morada tienen contenidos de compuestos fenólicos totales en el rango de 174.9 a 275.5 miligramos de ácido gálico equivalente por cada 100 gramos de materia fresca y poseen contenidos de antocianinas en el rango de 45.5 a 131.9 miligramos de cianidina-3-glucósido equivalente por cada 100 gramos de materia fresca. En ese sentido, Chirinos *et al.* (2007), han recomendado cosechar a la mashua después de 7 meses para lograr obtener un mayor contenido de carotenoides y antocianinas (mayor capacidad antioxidante) en cultivos de

mashua de genotipos amarillo y morado, respectivamente. Santayana (2018), reportó que dentro de los compuestos fenólicos de la mashua se puede destacar la presencia de ácido gálico y compuestos derivados de los flavanoles, flavonoles, ácido cinámico y ácidos hidroxibenzoicos. La delfinidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido constituyen las antocianinas más representativas de la mashua.

Cuadro 1: Composición nutricional de tubérculos andinos del Perú (por 100 gramos de parte comestible)

Componente	Mashua	Papa amarilla sin cáscara	Olluco sin cáscara	Oca sin cáscara
Energía (Kcal)	32.00	101.00	59.00	53.00
Agua (g)	88.00	73.20	83.70	83.00
Proteínas (g)	0.70	2.00	1.10	0.70
Grasa total (g)	0.10	0.40	0.10	n.d.
Carbohidratos totales (g)	10.60	23.30	14.30	15.60
Fibra dietaria (g)	2.90	0.40	*	2.40
Cenizas (g)	0.50	1.10	0.80	0.70
Vitamina A (µg)	12.00	n.d.	5.00	n.d.
Vitamina C (mg)	42.06	9.00	11.50	23.92

n.d. : El nutriente no se encuentra presente o está en cantidades traza

* : No reportado o desconocido

FUENTE: Reyes *et al.* (2017)

La mashua también es fuente de glucosinolatos. En ese sentido, Ortega *et al.* (2006), han identificado y cuantificado los glucosinolatos presentes en: 240 accesiones de mashua del Cuzco, 102 colecciones de mashua cultivadas por el Centro Internacional de la Papa (CIP-Perú) y en 39 accesiones silvestres de mashua del Cuzco y reportaron que el contenido total de glucosinolatos fluctuó entre 0.27 a 50.74 micromoles por gramo de materia seca, identificando principalmente los glucosinolatos aromáticos como la glucosinalbina (4-hidroxibencil glucosinolato), glucotropaeolina (bencil glucosinolato) y la glucolimnantina (m-metoxibencil glucosinolato). De la misma manera, Arias (2011) reportó que el contenido total de glucosinolatos de 65 accesiones de mashua de Colombia estuvieron en el rango de 1.20 a 30.40 micromoles por gramo de materia seca. Campos *et al.* (2019), reportaron que el contenido de glucosinolatos totales en diez cultivares de mashua se encontró en el rango de 4.9 a 54.2 micromoles por gramo de materia seca, de los cuales el 96 al 99 por ciento

correspondió al glucosinolato glucoaubrietina, mientras que otros glucosinolatos como la glucotropaeolina y dos isómeros del hidroxibencil glucosinolato fueron los menos abundantes.

2.1.4. Usos tradicionales de la mashua

A la mashua se le atribuye propiedades anafrodisiacas desde la época de los incas, que la incluían en la alimentación de sus soldados (Suquilanda s.f.). En ese sentido, Leiva-Revilla *et al.* (2012), reportaron que ratas alimentadas con mashua mostraron valores más bajos de producción diaria de esperma. Sin embargo, estos efectos adversos pueden ser reversibles después de 24 días de suspensión del tratamiento.

Debido al sabor picante que posee, la mashua debe ser expuesta a la luz solar durante unos días para mejorar su dulzor y palatabilidad. Esta práctica aumenta el contenido de azúcar, probablemente al inducir la degradación del almidón y la reducción de los isotiocianatos (Grau *et al.* 2003). Por otro lado, los tubérculos de mashua también son expuestos por una noche a los efectos de la helada y al día siguiente los consumen acompañados con miel de caña con la finalidad de eliminar cálculos renales y dolencias prostáticas (Beltrán y Mera 2013). Asimismo, la mashua al igual que la oca es previamente cocida para ser consumida, donde la mashua negra es considerada como antibiótico y calmante contra problemas renales, anemia e inflamación de la próstata (Aruquipa *et al.* 2017).

2.1.5. Situación actual de la mashua en el mercado nacional

La producción de mashua en el Perú en el año 2019 fue de 43,213 miles de toneladas, producción inferior a otros tubérculos andinos como la papa, el olluco y la oca. A pesar de su menor producción anual, comparado con la papa (53'310,063 miles de toneladas), el olluco (198,122 miles de toneladas) y la oca (97,247 miles de toneladas), la mashua es un cultivo que tiene importantes propiedades nutricionales (Santamaría *et al.* 2020).

Según la campaña agrícola 2017 - 2018, la superficie sembrada de mashua a nivel nacional fue de 6,485 hectáreas, siendo las regiones de Ayacucho, Cusco, Apurímac, Puno y Huancavelica las regiones con mayores áreas sembradas: 1,372; 1,214; 991; 982 y 924 hectáreas, respectivamente (SIEA 2018).

En base a la producción agropecuaria anual, se ha observado un crecimiento en la producción desde el año 2010 al 2019, reportándose un crecimiento desde 29.2 a 43.2 miles de toneladas de mashua, respectivamente, lo cual representa un incremento del 47.9 por ciento. De igual manera, se ha incrementado el valor de la producción desde el año 2010 al 2019, de 10.3 a 15.3 millones de soles, lo cual representa un incremento del 48.5 por ciento (Santamaría *et al.* 2020).

2.2. GLUCOSINOLATOS

Los glucosinolatos están presentes en dieciséis familias de angiospermas dicotiledóneas que incluyen un gran número de especies comestibles, especialmente en la familia Brassicaceae (crucíferas) que incluye a las hortalizas de consumo como la col, coliflor, brócoli, mostaza, rábano, entre otros (Fahey *et al.* 2001; Verkerk *et al.* 2009). Asimismo, son un grupo bien definido de metabolitos especializados que tienen su bioquímica y estructura característica, de tal manera que, se ha estimado que el número total de glucosinolatos documentados de la naturaleza es alrededor de 132; pero, también existen estructuras adicionales que no están suficientemente documentadas (Agerbirk y Olsen 2012). Se ha informado que al menos 500 especies de angiospermas dicotiledóneas no crucíferas contienen uno o más glucosinolatos. Los glucosinolatos se han agrupado en varias clases químicas en base a sus similitudes estructurales. Los glucosinolatos más estudiados son los glucosinolatos alifáticos, ω -metiltioalquilo, aromáticos y heterocíclicos (indólicos) (Fahey *et al.* 2001).

Estructuralmente, los glucosinolatos (Figura 1) están conformados por una parte por la β -D-glucopiranososa (glucósido), un azufre ligado a un β -tioglucósido-N-hidroxisulfato y una cadena variable lateral derivada de un aminoácido, denominada como radical "R" (aglicona) (Johnson *et al.* 2016). Los glucosinolatos se encuentran en el líquido intersticial celular y cuando se daña este tejido, se ponen en contacto con las tioglucosidasas glucohidrolasas, también llamadas mirosinasas que se encuentran en los idioblastos (Villatoro 2011). Los glucosinolatos son hidrolizados enzimáticamente (por acción de las enzimas mirosinasas) o no enzimáticamente para producir nitrilos o isotiocianatos dependiendo de condiciones como el pH y la temperatura (Kala *et al.* 2018). Además, pueden formar oxazolidina-2-tiona, nitrilos, epitionitrilos y tiocianatos. La naturaleza de los productos de hidrólisis depende principalmente de la estructura de la cadena lateral del glucosinolato, pero también de la especie vegetal y de las condiciones de reacción como el pH (Wittstock y Halkier 2002). Los

glucosinolatos se caracterizan por tener un grupo isotiocianato sulfatado en el centro (conjugado con la tioglucosa) y unida al grupo "R"; por ello, tanto la glucosa como el carbono central del isotiocianato sufren modificaciones. Esto da como resultado una amplia diversidad de glucosinolatos que se clasifican en términos generales como alquilo, aromático, benzoato, indol, múltiples cadenas laterales glicosiladas que contienen azufre (Clarke 2010).

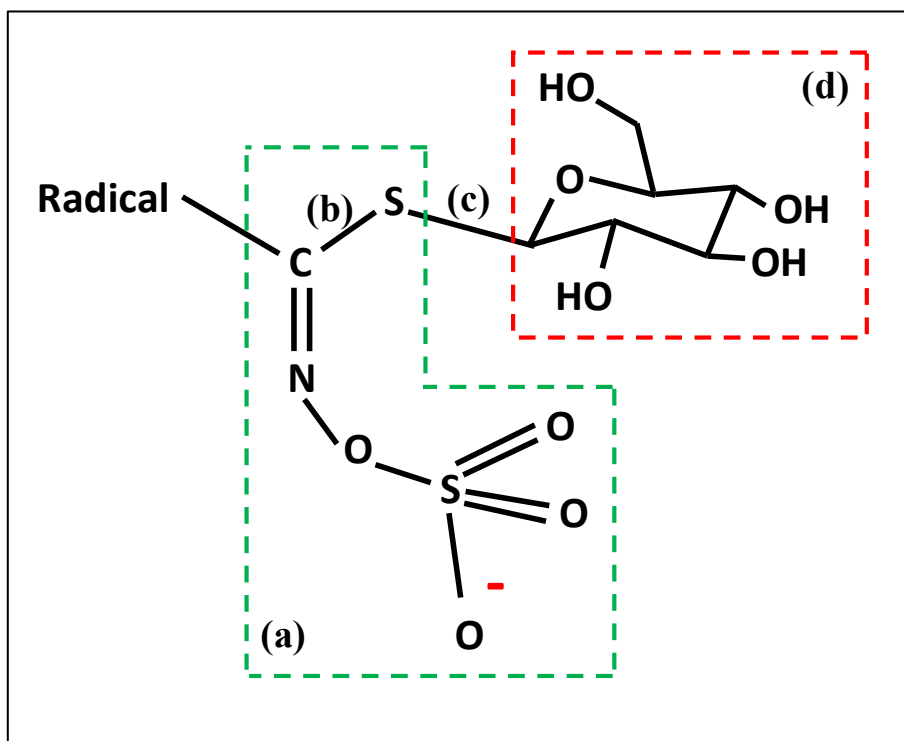


Figura 1: Estructura química de los glucosinolatos

a) grupo oxima sulfonada, b) enlace del azufre ligado al β -tioglucósido-N-hidroxisulfato, c) enlace tioglicosídico, d) β -D-glucopiranososa (glucósido). Radical y (a) forman la parte aglicona

FUENTE: Adaptado de Brekalo (2015), Avato y Argentieri (2015)

Los glucosinolatos y sus productos de degradación “isotiocianatos” otorgan un aroma pungente y un sabor amargo a las plantas comestibles como el rábano, además, sirven como bioplaguicidas que protegen a las plantas contra los ataques de insectos herbívoros y de patógenos microbianos (Johnson *et al.* 2016). Referente a los glucosinolatos de la mashua, Campos *et al.* (2019) han estudiado los glucosinolatos presentes en diez cultivares de mashua e identificaron tres tipos de glucosinolatos aromáticos como el 4-metoxibencil glucosinolato (glucoaubrietina), bencil glucosinolato (glucotropaeolina) y el *p*-hidroxibencil glucosinolato (glucosinalbina). De la misma manera, Ortega *et al.* (2006) han identificado en mashua

glucosinolatos aromáticos como la glucosinalbina, glucotropaeolina y la glucolimnantina. Según la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG 2020), los glucosinolatos presentes en la mashua tienen las estructuras que se muestran en la Figura 2.

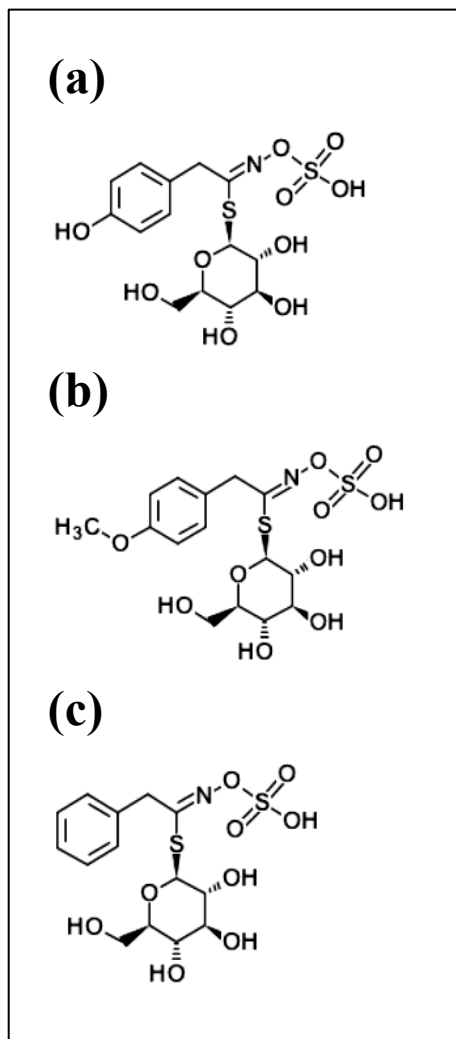


Figura 2: Estructura de glucosinolatos: a) Glucosinalbina, b) Glucoaubrietina y c) Glucotropaeolina

FUENTE: KEGG (2020)

2.2.1. Isotiocianatos

Los isotiocianatos son compuestos que tienen la estructura general de $R-N=C=S$, donde su molécula precursora conocida como glucosinolato puede ser hidrolizado enzimáticamente (bajo el efecto del complejo mirosinasa) o no enzimáticamente que depende de las condiciones del pH y la temperatura (Kala *et al.* 2018). El radical “R” del isotiocianato puede

ser un grupo alquilo o arilo (Sharma *et al.* 2016). El proceso de formación de los isotiocianatos (Figura 3) inicia cuando el enlace tioglicosídico de un glucosinolato es hidrolizado, donde la glucosa se libera y se forma una aglicona inestable. Los fragmentos de la aglicona eliminan el sulfato (SO_4^{2-}) y se forma el isotiocianato. Todos los glucosinolatos eliminan sulfato y sulfuro de hidrógeno (H_2S) y forman nitrilos $\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}$, en presencia de agentes reductores como los iones ferrosos y ascorbato. Algunos glucosinolatos dan origen a otros productos como el epitiónitrilo y los derivados de oxazolidina y dependen del tipo de glucosinolato, la temperatura, el pH y la presencia de agentes reductores (Wu *et al.* 2009).

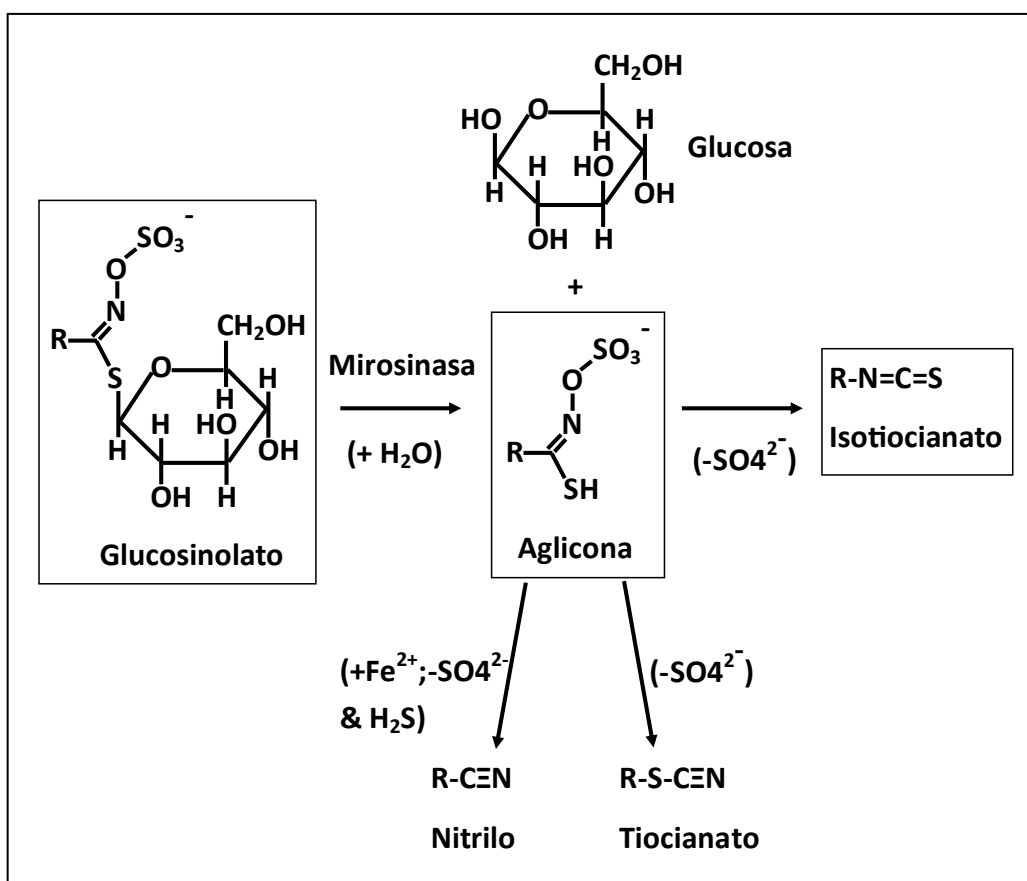


Figura 3: Hidrólisis de los glucosinolatos mediante la acción de la enzima mirosinasa y formación de isotiocianatos

FUENTE: Wu *et al.* (2009)

Los isotiocianatos son compuestos organosulfurados beneficiosos para la salud y como electrófilos tienen la capacidad de unirse y modificar directamente los compuestos que contienen tiol como el glutatión y la proteína celular, incluida la tubulina (Khamis y Heikkila 2018). En ese sentido, son compuestos bioactivos y altamente reactivos debido a que realizan un ataque nucleofílico en el átomo de carbono central deficiente de electrón. En esta

reacción, el ataque de diferentes grupos químicos forma diferentes compuestos inestables (Sharma *et al.* 2016). Los isotiocianatos atacan fácilmente a los tioles y las aminas, pero dicha actividad está ligada a su reactividad con los grupos sulfhidrilo. El átomo de carbono del grupo isotiocianato ($-N=C=S$) es altamente electrofílico y reacciona con las aminas, tioles e hidroxilos para generar tiourea, tiocarbamatos y carbamatos, respectivamente (Dufour *et al.* 2015). Asimismo, el ataque nucleofílico de los isotiocianatos mediante su grupo tiol forma los ditiocarbamatos $R-N(=S)-SR$ y la reacción se denomina tiocarbamoilación (Wu *et al.* 2009). Estas reacciones son espontáneas y bajo condiciones fisiológicas estos compuestos son inestables y se someten fácilmente a una reacción inversa que resulta en el establecimiento de un equilibrio: Isotiocianato + Tiol \rightleftharpoons Ditiocarbamatos (Sharma *et al.* 2016).

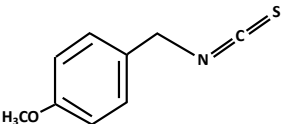
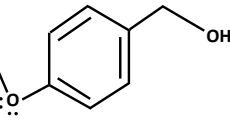
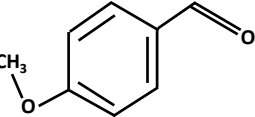
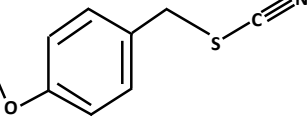
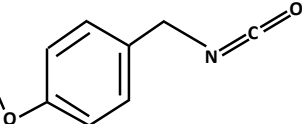
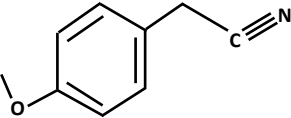
Se han reportado isotiocianatos del tipo aromáticos, como el bencil isotiocianato (Cuadro 2), que es producido después de la hidrólisis de la glucotropaeolina (Kjaer 1960 citado por Recio *et al.* 2017). Tras el daño en el tejido vegetal, la glucotropaeolina se hidroliza por acción de la enzima mirosinasa produciendo glucosa y una aglicona inestable. En presencia de un factor de proteína, se puede formar el fenil acetonitrilo. Pero, si no hay proteínas adicionales presentes, la aglicona intermediaria se somete espontáneamente al reordenamiento de Lossen para formar el bencil isotiocianato (Burow *et al.* 2007). Acerca de las proteínas que controlan la hidrólisis, solo se han identificado a nivel molecular las proteínas epitiospecificadoras que promueven la formación de nitrilos y epitionitrilos. Sin embargo, la proteína formadora de tiocianato no solo cataliza la formación de tiocianato y nitrilo simple a partir del bencil glucosinolato, sino también la formación de nitrilos y epitionitrilos a partir de glucosinolatos alifáticos (Burow *et al.* 2007). En ese sentido, el bencil isotiocianato ha demostrado inducir la apoptosis de células cancerosas de cerebro humano y la detención del ciclo celular en especial sobre un tipo especial de tumor cerebral (Tang *et al.* 2016).

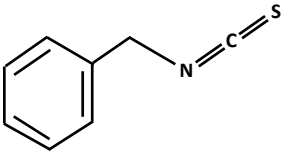
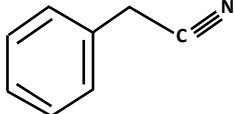
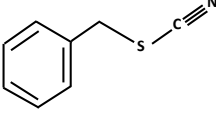
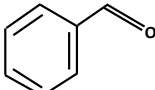
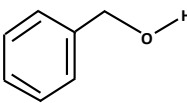
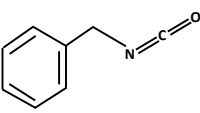
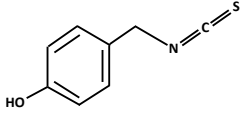
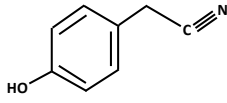
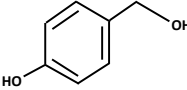
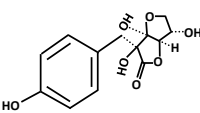
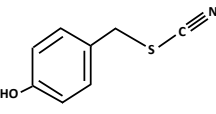
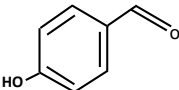
Por otro lado, el 4-metoxibencil isotiocianato (Cuadro 2) es un isotiocianato aromático producido después de la hidrólisis de la glucoaubrietina (Kjaer y Jensen 1956). De la misma manera, el *p*-hidroxibencil isotiocianato (HBITC) es un isotiocianato aromático de grupo hidroxilo producido después de la hidrólisis de la glucosinalbina. El HBITC tiene un poder conservante ya que es un agente antimicrobiano eficaz y puede ser empleado en niveles relativamente bajos. Una concentración de 25 miligramos por litro de HBITC es suficiente para estabilizar una bebida de frutas acidificada durante 28 días a temperatura ambiente,

contra el crecimiento de bacterias tolerantes al ácido (especies de *Gluconobacter*) y de levaduras resistentes a conservantes (*Zygosaccharomyces bailii*) (Ekanayake *et al.* 2006).

Los isotiocianatos generalmente no están asociados con la amargura de los alimentos, pero pueden contribuir en el sabor. Una excepción notable es la goitrina, el producto de degradación hidrolítica de la progoitrina (glucosinolato no amargo). La goitrina contribuye al amargor del colinabo, las coles de Bruselas, el repollo, el nabo y la coliflor y presenta una barrera importante para la aceptación del consumidor (Johnson *et al.* 2016).

Cuadro 2: Glucosinolatos de mashua y sus productos derivados

Glucosinolato	Derivados	Estructura	Fuente
Glucoaubrietina (4-metoxibencil glucosinolato)	4-metoxibencil isotiocianato		Kjaer y Jensen 1956
	4-metoxibencil alcohol		De Nicola <i>et al.</i> 2013
	4-metoxibenzaldehído (Similar al benzaldehído)		Basado en Esparza <i>et al.</i> 2020.
	4-metoxibencil tiocianato (Similar al bencil tiocianato)		Basado en Burow <i>et al.</i> 2007.
	4-metoxibencil isocianato (Similar al bencil isocianato)		Basado en Esparza <i>et al.</i> 2020.
	4-metoxibencil cianuro (Similar al bencil cianuro)		Basado en Burow <i>et al.</i> 2007.

Glucotropaeolina (Bencil glucosinolato)	bencil isotiocianato		Arumugam y Abdull Razis 2018.
	fenil acetoniitrilo (bencil cianuro)		Burow <i>et al.</i> 2007.
	bencil tiocianato		Burow <i>et al.</i> 2007.
	benzaldehído		Esparza <i>et al.</i> 2020.
	Bencil alcohol		Esparza <i>et al.</i> 2020.
	bencil isocianato		Esparza <i>et al.</i> 2020.
Glucosinalbina (<i>p</i> -hidroxibencil glucosinolato)	<i>p</i> -hidroxibencil isotiocianato		Buskov <i>et al.</i> 2000. Saladino <i>et al.</i> 2016.
	4-hidroxibencil cianuro		Buskov <i>et al.</i> 2000.
	4-hidroxibencil alcohol		Buskov <i>et al.</i> 2000.
	4-hidroxibencil ascorbigen		Buskov <i>et al.</i> 2000.
	4-hidroxibencil tiocianato (Similar al bencil tiocianato)		Basado en Burow <i>et al.</i> 2007.
	4-hidroxibenzaldehído (Similar al benzaldehído)		Basado en Esparza <i>et al.</i> 2020.

2.2.2. Metabolismo de los glucosinolatos e isotiocianatos

En los seres humanos, los glucosinolatos se convierten en diversos productos de degradación (isotiocianatos, tiocianatos, indoles, entre otros) cuando los vegetales que los contienen se mastican, porque durante este proceso entran en contacto con la enzima mirosinasa que los hidroliza (Vig *et al.* 2009). Después de la ingestión, los glucosinolatos intactos pueden ser parcialmente absorbidos en el estómago, mientras que los glucosinolatos restantes transitan a través del tracto gastrointestinal para llegar al intestino delgado, donde pueden ser hidrolizados por la mirosinasa vegetal (restante de vegetales crucíferos que no han sufrido algún procesamiento térmico) y los productos de descomposición como los isotiocianatos, nitrilos, oxazolidina-2-tiones e indol-3-carbinoles podrían ser absorbidos (Barba *et al.* 2016). Además, se puede producir glucosa, sulfuro de hidrógeno y agliconas inestables que se reorganizan para formar compuestos bioactivos que varían dependiendo de la estructura química, las condiciones ambientales (como el pH y la presencia de iones ferrosos) y la coexistencia de otros factores (Johnson *et al.* 2016). Por otro lado, los glucosinolatos no hidrolizados (restantes) transitarán hasta llegar al colon, debido a su naturaleza hidrofílica (grupo tioglucosa y sulfato) donde podrían hidrolizarse con la mirosinasa bacteriana y las moléculas generadas de su descomposición se pueden absorber o excretar (Barba *et al.* 2016).

El sistema digestivo humano no produce mirosinasa, se sostiene que la conversión de glucosinolatos a isotiocianatos es mediada por la acción de la microbiota del colon (Dinkova-Kostova y Kostov 2012). Sin embargo, este proceso puede ser bloqueado por los antibióticos entéricos y por la limpieza intestinal (Fahey *et al.* 2012). En ese sentido, Cheng *et al.* (2004) han reportado que tres cepas de *Bifidobacterium* sp. (*B. pseudocatenalum*, *B. adolescentis* y *B. longum*) fueron capaces de digerir y metabolizar glucosinolatos *in vitro* como la sinigrina y la glucotropaeolina, durante las 24 a 48 horas de cultivo. Identificaron el alil isotiocianato y el 3-butenonitrilo a partir de la sinigrina y, por otro lado, identificaron al bencil isotiocianato y al fenilacetónitrilo a partir de la glucotropaeolina. Estas reacciones sugieren que la actividad mirosinasa microbiana puede deberse a una enzima similar a la mirosinasa de origen vegetal.

Los isotiocianatos son compuestos lipofílicos no nutrientes y siguen los mismos eventos biotransformativos que los compuestos xenobióticos y están sujetos a una respuesta

metabólica en el hígado y el intestino delgado (Johnson *et al.* 2016). En ese sentido, una vez que son ingeridos o formados en el lumen del tracto gastrointestinal, atraviesan el epitelio y el endotelio capilar gastrointestinal mediante difusión pasiva. Estos isotiocianatos se enlazan rápida y reversiblemente a los tioles de la proteína del plasma y cruzan la membrana plasmática hacia el interior de las células de los tejidos. En el interior de las células, los isotiocianatos reaccionan con el glutatión para formar el glutatión conjugado, glutatión S-(N-alquil/ariltiocarbamoil) que es catalizado por la glutatión-S-transferasa (Wu *et al.* 2009). El glutatión conjugado es expulsado de las células por las proteínas transportadoras, también llamadas proteínas de resistencia a múltiples fármacos. En el medio extracelular, los residuos γ -glutamil y glicil del glutatión conjugado se segmentan sucesivamente por acción de la γ -glutamil transferasa (γ -GT) y la dipeptidasa, respectivamente. El producto resultante es el conjugado de cisteína (S-(N-Alquil/Ariltiocarbamoil)-cisteína) y se transporta al hígado, donde las N-acetil transferasas lo acetilan para formar el derivado de N $_{\alpha}$ -acetil-cisteína o ácido mercaptúrico. Estos se transportan al riñón y se excretan en la orina. Este mecanismo es la vía del ácido mercaptúrico del metabolismo del isotiocianato (Figura 4) (Wu *et al.* 2009).

En los humanos, la formación de los ácidos mercaptúricos es la vía metabólica predominante y la cantidad de ácido mercaptúrico excretado es un buen reflejo de la cantidad de isotiocianatos consumidos. En ese sentido, cuando se consumen verduras cocidas (acción de la microbiota intestinal) la excreción de los ácidos mercaptúricos no supera el 20 por ciento de la dosis ingerida de glucosinolatos y el pico de los ácidos mercaptúricos en la orina ocurre después de las 12 horas de la ingestión, mientras que el pico de ácidos mercaptúricos aparece dentro de las 8 horas luego de consumir verduras crudas. Por ello, se sugiere que el consumo de crucíferas crudas conduce a una mejor biodisponibilidad de los isotiocianatos (Getahun y Chun 1999; Rouzaud *et al.* 2004; Conaway *et al.* 1999 citados por Barba *et al.* 2016).

Por otro lado, algunos metabolitos de los glucosinolatos también pueden encontrarse en las heces, en ese sentido, Budnowski *et al.* (2013) reportaron que un 5.6 por ciento del glucosinolato glucorafanina fue excretada en las heces dentro de las 48 horas posteriores a la aplicación en su forma nativa, mientras que la excreción fecal de sus metabolitos glucoerucina y sulforafano fueron en general muy bajos 0.02 y 0.03 por ciento, respectivamente. En síntesis, cuando las verduras se ingieren crudas, siempre se observa una mayor excreción de ácido mercaptúrico (17 a 88 por ciento), ya que la mirosinasa es

responsable de hidrolizar los glucosinolatos, mientras que, si las verduras se cocinan previamente y la hidrólisis se lleva a cabo por la microbiota intestinal, esta cantidad no supera el 20 por ciento (Barba *et al.* 2016).

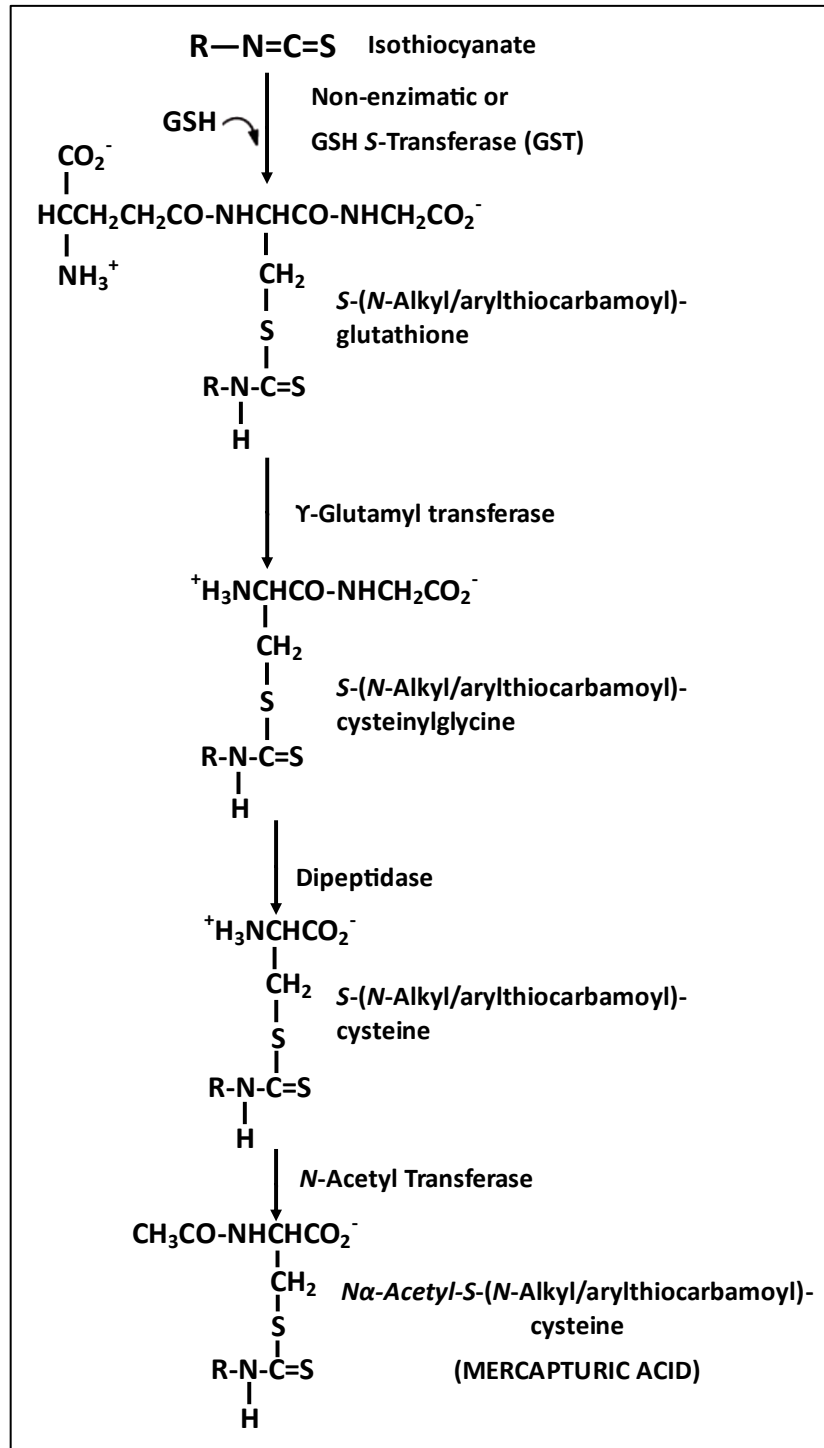


Figura 4: Metabolismo de los isotiocianatos por la ruta del ácido mercaptúrico

R: es el sustituyente aromático o alifático del isotiocianato

FUENTE: Wu *et al.* (2009)

2.3. CARCINOGENESIS

La carcinogénesis es un proceso molecular que involucra varios pasos y que es inducido por cambios genéticos y epigenéticos que interrumpen las vías que controlan la proliferación, la apoptosis, la diferenciación y la senescencia celular (Fimognari y Hrelia *et al.* 2007). En ese sentido, existen sistemas que tienen efectos estimulantes o inhibitorios que controlan la división celular. Las mutaciones genéticas que ocurren en las células normales provocan un cambio en su fenotipo y se convierten en células neoplásicas. Dichas mutaciones genéticas ocasionan la modificación de los productos que en condiciones normales codificaría el gen y, finalmente, a un cáncer (Martín de Civetta y Civetta 2011).

Las células tienen mecanismos de reparación, pero pueden ocurrir errores introduciendo mutaciones permanentes. De tal manera que, a consecuencia de las mutaciones ocurre el daño del genoma. Este daño puede ser el resultado de un proceso endógeno, por ejemplo, errores en la replicación del ADN, ataque de radicales libres o por ataque exógeno, como las radiaciones ionizantes o exposición a agentes químicos cancerígenos (Valle-Mendiola y Weiss 2003). Debido a los daños ocasionados por las mutaciones, la carcinogénesis se desarrollará en tres etapas: (1) Iniciación, (2) Promoción y (3) Progresión. La iniciación, se origina a partir de los daños genéticos irreversibles inducidos por carcinógenos químicos, físicos y biológicos que conducen a la activación de los oncogenes y/o inactivación de los genes supresores de tumores. La promoción, es un proceso reversible que involucra cambios en la expresión del genoma mediado por las interacciones sostenidas entre los carcinógenos y los receptores. Finalmente, la progresión, es una etapa irreversible caracterizada por el crecimiento maligno con invasión y/o metástasis (Fuentes *et al.* 2015, Kaufman-Szymczyk *et al.* 2015 citados por Novío *et al.* 2019).

Dicho lo anterior, se ha sugerido que el proceso carcinogénico ocurre lentamente y durante un intervalo de tiempo prolongado. Esto podría brindar la oportunidad de intervenir en algunos cambios en el estilo de vida u optar por medidas quimiopreventivas. La quimiopreención es efectiva y requiere el uso de agentes no tóxicos que pueden inhibir pasos específicos moleculares en la vía cancerígena y, además, podría retrasar la aparición del cáncer y disminuir su incidencia (Fimognari y Hrelia *et al.* 2007).

2.4. EFECTOS QUIMIOPREVENTIVOS DE LOS ISOTIOCIANATOS SOBRE EL CÁNCER

Existe evidencia de que el alto consumo de frutas y verduras está asociado con una disminución del riesgo de muchos tipos de cáncer. Existen efectos protectores de los vegetales, particularmente de los vegetales crucíferos, sobre el riesgo de cáncer de próstata (Cohen *et al.* 2000). En ese sentido, numerosas investigaciones han enfatizado las propiedades quimiopreventivas de los isotiocianatos sobre el cáncer de mama, pulmón, colorectal y próstata. Recientemente, se ha puesto atención sobre las habilidades de los isotiocianatos para influir en los procesos epigenéticos que conducen a la corrección de los cambios epigenéticos aberrantes en células cancerígenas (Novío *et al.* 2019).

La capacidad de los isotiocianatos para inhibir la formación de un tumor depende de factores como: la estructura química del isotiocianato empleado, la especie animal, el tejido diana y el carcinógeno involucrado. Además, exhiben su actividad antitumoral debido a que tienen múltiples vías como objetivo: la apoptosis, la vía MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), el estrés oxidativo y el mecanismo del ciclo celular (Wu *et al.* 2009). Por un lado, Gründemann y Huber (2018), demostraron que la acción quimiopreventiva de los isotiocianatos se puede caracterizar en las siguientes etapas: (1) Detoxificación (inducción de las enzimas de la fase II), (2) Propiedades antiinflamatorias por la regulación negativa de la actividad del factor NFkappaB (factor de transcripción nuclear Kappa B), (3) Detención del ciclo celular mediada por la ciclina y (4) Modulación epigenética por inhibición de la actividad de la histona desacetilasa. Además, los isotiocianatos pueden actuar mediante la inhibición de la proliferación celular e inducir la apoptosis (Brown y Hampton 2011).

En algunos casos, dependiendo de la dosis de isotiocianatos, éstos pueden inducir la reducción de la expresión de: interleucina 1 beta (IL1 β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina 6 (IL6), óxido nítrico a través del óxido nitroso sintasa (sON) y enzimas de la ciclooxigenasa 2 (COX2), asociadas a la producción de citoquinas proinflamatorias (Caballero-Gutiérrez y González 2016).

Isotiocianatos como el sulforafano, producto de la hidrólisis de la glucorafanina (glucosinolato) que tiene una concentración particularmente alta en el brócoli, tiene la capacidad de modular simultáneamente múltiples objetivos celulares involucrados en el

desarrollo del cáncer, incluyendo: (1) Protección del ADN mediante la modulación de las enzimas metabolizadoras de los carcinógenos y del bloqueo de la acción de los mutágenos, (2) Inhibición de la proliferación celular e inducción de la apoptosis, (3) Inhibición de la neoangiogénesis, progresión de tumores benignos a tumores malignos y formación de metástasis (Fimognari y Hrelia *et al.* 2007).

Atwell *et al.* (2015), reportaron que el sulforafano tiene áreas específicas de acción como la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la inflamación, la defensa antioxidante y la señalización de las células cancerosas y sus relaciones con los mecanismos epigenéticos. Asimismo, informaron que la capacidad de alterar los eventos epigenéticos en las glándulas mamarias y la próstata puede ser la base de muchos de los efectos quimiopreventivos del sulforafano en estos tejidos. De la misma manera, Lewinska *et al.* (2017) investigaron los destinos de las células cancerígenas, tras la estimulación de células de cáncer de mama con dosis bajas de sulforafano y reportaron que las dosis de 5 a 10 micro molar promovieron la detención del ciclo celular y la senescencia celular, mientras que dosis de 20 micro molar indujeron la apoptosis.

Por otro lado, Hahm y Singh (2010), reportaron que el sulforafano causa la supresión de la activación inducida por interleucinas-6 (IL-6) del transductor STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3) en las células de cáncer de próstata humano. Además, demostraron que la activación del STAT3 mediada por la IL-6 confiere una protección parcial pero estadísticamente significativa contra la apoptosis inducida por el sulforafano. Además, Gamet-Payraastre *et al.* (2000), reportaron que el sulforafano inhibe la reiniciación del crecimiento y disminuye la viabilidad de las células de carcinoma de colon humano inactivo (HT29). Además, observaron que indujo la detención del ciclo celular de una manera dependiente de la dosis. Esta detención del ciclo celular fue correlacionada con una mayor expresión de las enzimas ciclinas A y B1. En ese sentido, el sulforafano induce la muerte celular a través de la apoptosis. De hecho, una gran proporción de células tratadas muestran lo siguiente: (a) translocación de la fosfatidilserina desde la capa interna a la capa externa de la membrana plasmática; (b) condensación típica de cromatina; y (c) modificaciones ultraestructurales relacionadas con la muerte celular apoptótica. De manera complementaria sobre el efecto quimiopreventivo de algunos isotiocianatos sobre el cáncer de colon, Liu y Dey (2017), reportaron que el feniletil isotiocianato (FEITC) derivado de la hidrólisis del glucosinolato gluconasturtiina, redujo la inflamación de la mucosa y la

submucosa en ratones con carcinoma de colon inducido, donde el FEITC inhibió las proteínas del factor nuclear kappa B1 (NFkB1). Estos resultados indican que el FEITC puede ralentizar el desarrollo de la carcinogénesis de colon en un entorno intestinal inflamatorio que está potencialmente asociado con la modulación epigenética de la señalización del factor nuclear NFkB1.

Un estudio empleó el liofilizado de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) frente a la Hiperplasia Prostática Benigna en ratas y se concluyó que la mashua es eficaz para disminuir la Hiperplasia Prostática Benigna (Aire *et al.* 2013). Estos resultados posiblemente se han podido evidenciar debido a los efectos de los isotiocianatos derivados de la hidrólisis de los glucosinolatos de la mashua, según la información antes mencionada. En este sentido, también se ha reportado que los extractos de mashua pueden inducir la supresión (dependiente de la concentración) de la proliferación de células de carcinoma de próstata humano DU145, células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 y de las células del melanoma murino B16F10 (Noratto *et al.* 2004 citados por Chirinos *et al.* 2007).

La glucotropaeolina, glucosinolato presente en la mashua, tiene como producto de hidrólisis al bencil isotiocianato (Bencil-ITC) y este isotiocianato ha demostrado ser un potencial antimutagénico. Rampal *et al.* (2017), han realizado un estudio para evaluar el potencial antimutagénico de tres tipos de isotiocianatos (Alil-ITC, Bencil-ITC y 3-Butenil-ITC) en contra del desarrollo de tres tipos de mutágenos y encontraron que los isotiocianatos actuaron como fuertes antimutágenos, por mecanismos de inactivación, inhibición de la activación metabólica de los promutágenos, modulación del proceso de mutación manipulando el proceso de replicación y reparación del ADN.

2.5. EFECTOS TÓXICOS DE LOS DERIVADOS DE GLUCOSINOLATOS

Durante años, la alimentación excesiva con vegetales de la familia Brassicaceae se ha asociado a efectos tóxicos. Altos niveles de glucosinolatos causan efectos tóxicos tales como agrandamiento de tiroides, reducción de los niveles de la hormona tiroidea en plasma, anormalidades en el hígado y el riñón, disminución del crecimiento, disminución del rendimiento reproductivo e incluso mortalidad (Prieto *et al.* 2019). Por un lado, Burel *et al.* (2000) reportaron que la disminución del crecimiento en truchas alimentadas con dietas que incluyeron harina de colza podría atribuirse a la presencia de los glucosinolatos, los cuales

deprimen la función tiroidea y se comportan como factores antinutricionales que afectan la digestibilidad y la utilización metabólica de los nutrientes y la energía de la dieta.

Otro efecto principal de los productos de descomposición de los glucosinolatos es la interferencia con la función tiroidea. El bocio puede ocurrir tanto en humanos como en animales, pero aparece principalmente en animales cuando consumen alimentos que tienen una cantidad considerable de proteínas. Asimismo, se ha reportado una disminución de los niveles séricos de tiroxina (Hill 2003). Además, se han encontrado lesiones en el conducto biliar en el ganado que ha pastoreado en cultivos de forraje de nabo o colza. Se ha demostrado que el nitrilo y epitionitrilo de los glucosinolatos son toxinas hepáticas, renales, pancreáticas y/o gástricas en ratas. Debido a esto, se plantea la hipótesis que uno o más de estos derivados de los glucosinolatos, en particular aquellos con el resto episulfuro de tirano (los epitionitritos), podrían ser tóxicos para el hígado del ganado (Collett *et al.* 2014).

El contenido excesivo de glucosinolatos desmejoran la palatabilidad del alimento, provocan disminución en el crecimiento y la producción en algunos animales. Glucosinolatos como la progoitrina y la epiprogoitrina (presentes en la harina de colza) deterioran la palatabilidad cuando se encuentran en un rango de 2.3 y 4.65 micro moles por gramo de dieta, mientras que a niveles más altos disminuyen la ingesta del alimento. Además, se sabe que los nitrilos afectan las funciones hepáticas y renales, asimismo, los tiocianatos interfieren en la disponibilidad del yodo (Tripathi y Mishra 2007). La hidrólisis de los β -hidroxialquenoil glucosinolatos (por ejemplo, progoitrina y epi-progoitrina) que dan lugar a los β -hidroxialquenoil isotiocianatos, que se ciclan aún más a oxazolidina-2-tiones. Estos compuestos pueden provocar efectos bociogénicos en mamíferos, un fenómeno observado por primera vez en conejos y descrito como bocio (Johnson *et al.* 2016).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Industrial & Bioprocesos del Instituto de Biotecnología (IBT) perteneciente a la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. MATERIA PRIMA

Se trabajó con tubérculos de mashua morada procedente de Chuñomasas, anexo Quero, distrito de Molinos, provincia de Jauja, región de Junín; denominado por el agricultor como mashua yana ojo de pulpa morada.

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1. Materiales

- Materiales de vidrio: vasos de precipitado, fioles, matraces Erlenmeyer, probetas, frascos tapa azul de 100 y 500 mL (Schott Duran[®], Alemania), tubos de cultivo con rosca y teflón y todo el material requerido para los diferentes ensayos.
- Materiales de plástico: puntas para micropipetas, tubos de reacción de 2 mL y 5 mL, tubos Falcon de 15 y 50 mL, jeringas de 1 y 3 mL, placas Petri estériles, soportes de filtro de membranas de 25 mm, tubos de 3 mL al vacío recubiertos con K₂EDTA (ácido etilendiaminotetraacético dipotásico) (VACUTEST[®], Italia) y todo material requerido para los diferentes ensayos:
- Micropipetas de 0.5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL (Brand Transferpette[™] S, Alemania).
- Otros materiales como: Dispensador analógico de 10 mL (Brand Dispensette[®], Alemania), embudo Büchner, filtros hidrofílicos PTFE 0.20 µm, 4 mm de diámetro (Millex[®]-LG,

Japón), filtros hidrofóbicos PTFE 0.20 μm , 13 mm de diámetro (Millipore Millex[®]-LG, USA), filtros hidrofílicos PVDF 0.22 μm , 13 mm de diámetro (Millipore Millex[®]-GV, USA), filtros hidrofílicos de membrana PES 0.22 μm , 25 mm de diámetro (Millipore Express[®] PLUS, USA) y cánula orogástrica de metal de 1.5 mm de diámetro de punta de salida y 80 mm de longitud.

3.3.2. Equipos

- Agitador magnético (Thermo Scientific[™], Cimarec+, Modelo N° SP88850105, USA).
- Agitador orbital y vaivén (Marca VWR[®] Standard Analog Shaker, Modelo 3500, USA).
- Agitador de tubos (Marca Heidolph, Reax Top, Alemania).
- Agitador de microtubos (Marca Biometra, Thermo Shaker TS1, Alemania).
- Autoclave vertical (Marca Beltec Scientific, Modelo YX-280D, Perú).
- Balanza analítica (Marca Adventurer[™] OHAUS[®], Modelo AR2140, USA).
- Bomba de vacío (Marca Laboport[®], Knf Lab, Alemania).
- Cabina extractora de gases y humos (EXTRACTOR[®], Modelo CEX-150, Colombia).
- Cabina de seguridad biológica (Marca LABCONCO[®] Logict, Cat. N° 302481110, USA).
- Cámara climatizada (MMM, modelo CLIMACELL 404, Alemania).
- Centrífuga (Marca Hettich[®] Zentrifugen, Modelo ROTOFIX 32, Alemania).
- Centrífuga (Marca Eppendorf[®], Modelo 5430R, Alemania).
- Congelador (Marca Electrolux[®], Modelo H300, Brasil).
- Cocina eléctrica (Marca Magefesa[®], Modelo MGF811, España).
- Concentrador en vacío centrífugo (Marca LABCONCO[®], CentriVap Concentrator, USA).
- Contador de colonias (Marca Stuart[®], Cat. N° SC6, Reino Unido).
- Cromatógrafo líquido de ultra alta presión (UPLC[®]) (Waters, Acquity H-Class, Singapur) acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) (Waters, Singapur).
- Cromatógrafo de gases (Thermo Scientific, Trace 1310, China) acoplado a detector de espectrometría de masas triple cuadrupolo (Thermo Scientific, TSQ 8000 Evo, CA, Estados Unidos) y un automuestreador (Thermo Scientific, TriPlus RSH, Suiza).
- Cromatógrafo líquido de ultra alta presión (UPLC) (Waters, Acquity I-Class, Singapur) acoplado a detector de espectrometría de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-ToF) (Waters, Xevo G2-XS, Reino Unido).
- Espectrofotómetro (Marca Thermo[®] Spectronic, Modelo Genesys 10 UV, USA).
- Estufa de vacío (Marca VWR[®], Modelo 1400E-2, USA).

- Equipo de baño maría con agitación de vaivén (Marca GFL[®], Modelo 1083, Alemania).
- Equipo de baño maría con agitación orbital (Marca GFL[®], Modelo 1092, Alemania).
- Equipo digital de baño seco (Marca Benchmark, Modelo BSH 1004, USA).
- Equipo de baño de ultrasonido (Marca BRANSONIC[®], Modelo 3510R-DTH, USA).
- Equipo medidor de pH (Marca Thermo Orion, Modelo 410 A+, USA).
- Estufa eléctrica (Marca Memmert[™], Typ BE 500, Alemania).
- Evaporador por rotación (Marca Buchi[®], Rotavapor RII, Suiza).
- Liofilizador (Marca LABCONCO[®], Freeze dry System, Freezone[®] 4.5, USA).
- Molino de rotor pulverizador (FRITSCH[®], Modelo PULVERISETTE 14, Alemania).
- Molino para molienda fina (IKA[®]-Werke, Modelo MF 10 Basic, Alemania).
- Sistema de purificación de agua (Simplicity[®] UV, Ultrapure (Type 1) water, Alemania).
- Ultracongeladora (Marca Panasonic[®], Pro[™] Series, Modelo MDF_U5586SC-PA, Japón).

3.3.3. Reactivos

- Alil isotiocianato (Sigma-Aldrich[®], USA).
- Acetato de sodio (Merck, Alemania).
- Acetonitrilo grado HPLC (Fisher Chemical, USA).
- Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich[®], USA).
- Ácido fórmico grado HPLC (Merck, Alemania).
- Agar bacteriológico (OXOID[™], Inglaterra).
- Alcohol metílico (Fermont, México).
- Bencil isotiocianato (Sigma-Aldrich[®], USA).
- Carbonato de sodio anhidro (J.T. Baker, USA).
- Cloruro de sodio (EMSURE[®], Merck, Alemania).
- Cloruro de potasio (Merck, Alemania).
- D (+)-Glucosa anhidro (EMSURE[®], Merck, Alemania).
- Di-amonio hidrógeno citrato (Scharlau[®], Reino Unido).
- Di-cloro metano para cromatografía líquida (LiChrosolv[®], Merck, Alemania).
- Di-potasio hidrógeno fosfato anhidro (EMSURE[®], Merck, Alemania).
- Enzima sulfatasa (Sigma-Aldrich[®], USA).
- Etanol absoluto 96% (Sigma-Aldrich[®], USA).
- Extracto de levadura (OXOID[™], Inglaterra).
- Extracto de carne en polvo (HIMEDIA[®], India).

- Folin-Ciocalteu 2N (Merck, Alemania).
- Fosfato de potasio monobásico (Fermont, México).
- Glicerol (J.T. Baker, USA).
- Gel DEAE Sephadex™ A-25 (GE Healthcare, Suecia).
- Glucotropaeolina (Sigma-Aldrich®, USA).
- Hidrógeno fosfato disódico anhidro (EMSURE®, Merck, Alemania).
- L-cisteína hidrocloreuro monohidratado (HIMEDIA®, India).
- 4-Metoxibencil isotiocianato (Acros Organics™, Bélgica).
- Peptona de caseína (CRITERION™ Dehydrated Culture Media, USA).
- Polivinilpirrolidona (Merck, Alemania).
- Sinigrina (Sigma, USA).
- Sulfato de magnesio anhidro (Sigma-Aldrich®, USA).
- Sulfato de manganeso monohidratado (J.T. Baker, USA).
- Sulfato de sodio anhidro granular (J.T. Baker, USA).
- Tween® 80 (Merck, Alemania).
- Vancomicina (Vitalis, Colombia).
- Verde de bromocresol (Merck, Alemania).

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.4.1. Determinación del contenido de humedad en harina de mashua

Se determinó por el método gravimétrico porcentual por secado en estufa a presión de vacío hasta obtener peso constante, método 920.151 (AOAC 1995). Los análisis fueron realizados por triplicado.

3.4.2. Identificación y cuantificación de glucosinolatos en harina de mashua

Se empleó el método propuesto por Verkerk *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de harina de mashua en un tubo falcon de 50 mL y luego se añadieron 25 mL de metanol al 70 por ciento (75 °C). La muestra se dejó en baño maría con agitación moderada a 75 °C durante 30 minutos (proceso de extracción). Luego, la muestra fue centrifugada a 4000 RPM (1520 g) durante 10 minutos. El precipitado fue nuevamente extraído, con 15 mL de metanol siguiendo el mismo procedimiento, este nuevo sobrenadante se mezcló con el

primer sobrenadante, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Posteriormente, con una micropipeta se tomó 2 mL del extracto y fue cargado en una columna de cromatografía de intercambio iónico con DEAE Sephadex™ A-25. Se agregó 100 µL de enzima sulfatasa a la columna cargada con el extracto, se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo de incubación, la columna fue eluída con agua milli-Q hasta obtener un volumen final de 4 mL. El eluido fue concentrado a 60 °C hasta obtener un volumen final aproximado de 2 mL, luego fue depositado en un tubo eppendorf (muestra desulfatada) y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

Antes de inyectar la muestra al cromatógrafo, la muestra desulfatada y las fases móviles fueron filtradas empleando filtros tipo PVDF de 0.22 µm, 13mm de diámetro (Millipore-Millex®). La muestra desulfatada fue analizada mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (ACQUITY UPLC® H Class) acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA), y con una columna Acquity BEH (1.7 µm, 50 x 2.1 mm de DI) (Waters, Singapur). La fase móvil estuvo compuesta de Agua con ácido fórmico al 0.1 por ciento (Solvente A) y Acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 por ciento (Solvente B). El gradiente de corrida fue el siguiente: 98 % de A durante dos minutos, luego disminuido gradualmente a 83 % al minuto 12, 0 % al minuto 13 y mantenido hasta el minuto 16, 98 % al minuto 17 y mantenido hasta el minuto 20, con un flujo de 0.2 mL/min. La columna se mantuvo a 30 °C. El volumen de la muestra inyectada fue 1 µL, los glucosinolatos fueron detectados a una longitud de onda de 229 nm. Finalmente, para la cuantificación se empleó sinigrina desulfatada para la elaboración de una curva estándar; los glucosinolatos fueron cuantificados como micromoles por gramo de muestra en base seca (µmol/g bs). Para la cuantificación individual de los glucosinolatos individuales se utilizó la masa molecular de cada glucosinolato: Glucoaubrietina, 439.5g/mol; Glucotropaeolina, 409.4g/mol y Glucosinalbina, 425.4g/mol.

3.4.3. Recuento total de bacterias de *Lactobacillus* anaeróbicos y bacterias lácticas anaeróbicas en heces de animales de experimentación

Las muestras fueron recolectadas según la metodología descrita por Bheemreddy y Jeffery (2007) con algunas modificaciones. Las heces fueron recolectadas en bolsas de polietileno de alta densidad y analizadas. Los recuentos totales fueron realizados según la metodología descrita por Yang *et al.* (2005) con algunas modificaciones. En una cabina de seguridad biológica las heces (1 gramo) fueron añadidas en tubos de cultivo con tapa rosca conteniendo

9 mL de solución salina esterilizados, luego fueron homogenizados durante 30 segundos. Se extrajeron alícuotas de 1 mL para realizar diluciones seriadas en base 10.

Para la inoculación, se usaron dos medios anaerobios un medio no selectivo Man, Rogosa y Sharp con cisteína (MRS-C) y un medio selectivo para especies de *Lactobacillus* MRS-C con Verde de Bromocresol y Vancomicina (2mg/mL) (MRS-C-VB-V), de acuerdo a las metodologías descritas por De Man *et al.* (1960) y Hartemink *et al.* (1997) con algunas modificaciones.

En las Placas Petri estériles conteniendo 15-20 mL de los medios solidificados, se procedió a la siembra por extensión superficial de 0.1 mL de cada una de las diluciones seriadas. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas. Finalizado el periodo de incubación, las placas fueron colocadas en un contador de colonias y se realizó los recuentos totales de acuerdo a la metodología descrita por Roberts y Greenwood (2003). Se seleccionaron las placas que contenían entre 30 a 300 unidades formadoras de colonias (UFC) y las placas que contenían más de 300 UFC fueron descartadas. Los resultados fueron expresados como UFC por gramo de base seca (UFC/g bs).

3.4.4. Identificación y cuantificación de isotiocianatos y otros derivados de la hidrólisis de glucosinolatos en muestras de sangre, orina y heces de animales de experimentación

Para el análisis de los isotiocianatos y otros derivados de los glucosinolatos de muestras de sangre, orina y heces de animales de experimentación, se siguió diferentes metodologías según la muestra y la etapa, recolección y tratamiento de la muestra, obtención de los analitos; e identificación y cuantificación de los analitos.

En la etapa de recolección y tratamiento de las muestras de sangre y orina, se siguió la metodología descrita por Sun *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La sangre (1 mL) fue extraída mediante punción cardiaca con ayuda de una jeringa de 3 mL e inmediatamente fue trasvasada a un tubo al vacío VACUTEST® de 3 mL para evitar la coagulación. Luego, la sangre fue centrifugada a 2,000 g durante 10 minutos. El precipitado fue descartado y el sobrenadante (plasma) de un volumen aproximado de 0.5 mL fue depositado en un tubo plástico y luego almacenado a -80 °C hasta su posterior análisis. En un tubo de reacción de 2 mL fueron añadidos 300 µL de plasma y 700 µL de metanol puro; fueron homogenizados

en vortex durante 1 minuto. El homogenizado fue sometido a un proceso de calentamiento a 75 °C durante 10 minutos, luego centrifugado a 12,000 RPM durante 5 minutos, donde la fase inferior fue descartada y la fase superior del homogenizado de plasma fue depositado en un tubo de reacción de 2 mL.

Para el caso de la muestra de orina, fue recolectada en tubos de ensayo de vidrio con la ayuda de las jaulas metabólicas individuales, luego depositadas en tubos falcon donde se agregó 0.25 mL de ácido ascórbico al 0.7 por ciento por cada 1.5 mL de orina. Luego, las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta su posterior análisis. Para el análisis de orina, en un tubo de reacción de 2 mL fueron añadidos 300 µL de orina y 700 µL de metanol puro, se homogenizó en vortex durante 1 minuto y luego el homogenizado fue sometido a un proceso de calentamiento a 75 °C durante 10 minutos. Luego, fue centrifugado a 12,000 RPM durante 5 minutos, donde la fase inferior fue descartada y la fase superior fue depositada en un tubo de reacción de 2 mL.

Para el caso de las heces, éstas fueron recolectadas y procesadas según la metodología descrita por Bheemreddy y Jeffery (2007) con algunas modificaciones. Las heces fueron recolectadas en bolsas de polietileno de alta densidad y luego fueron liofilizadas a 292×10^{-3} mBar a -51 °C y luego almacenadas a -80 °C hasta su análisis. Para el análisis, en un tubo de reacción de 2 mL se pesó 0.210 ± 0.05 g de heces liofilizadas y se añadió 600 µL de agua destilada y se homogenizó en vortex durante 1 minuto. El homogenizado fue sometido a un proceso de calentamiento a 75 °C durante 10 minutos y luego centrifugado a 12,000 RPM durante 10 minutos y 300 µL del sobrenadante fueron trasvasados a un nuevo tubo de reacción de 2 mL, donde se añadió 700 µL de metanol puro, se homogenizó en vortex durante 1 minuto y luego sometido a un proceso de calentamiento a 75 °C durante 10 minutos. Luego, fue centrifugado a 12,000 RPM durante 5 minutos, donde la fase inferior fue descartada y la fase superior del homogenizado de heces fue trasvasado a un tubo de reacción de 2 mL.

Los extractos obtenidos de las muestras (sangre, orina y heces) fueron tratados para la extracción de los isotiocianatos y otros derivados siguiendo la metodología descrita por Hanschen y Schreiner (2017) con algunas modificaciones. A cada uno de los extractos obtenidos en la etapa previa se les añadió 25 µL de estándar interno de Alil isotiocianato

(concentración: 50 nmol/mL) y 475 μ L de diclorometano, luego se homogenizó en vortex durante 2 segundos y se dejó reposar durante 1 minuto hasta obtener una óptima separación de fases (proceso de extracción). La fase inferior fue retirada y depositada en nuevo tubo de reacción de 2 mL. La fase superior fue re-extraída dos veces más con 500 μ L de diclorometano siguiendo el mismo procedimiento; todas las fases inferiores obtenidas fueron mezcladas. Posteriormente, a la mezcla se le añadió 0.12 gramos de sulfato de sodio y se homogenizó en vortex durante 1 minuto. El homogenizado fue centrifugado a 12,000 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de un filtro tipo PTFE de 0.20 μ m, 13mm de diámetro (Millipore-Millex[®]-LG) antes de ser analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).

El análisis por CG-MS se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Han *et al.* (2019) con algunas modificaciones. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna TR-5MS (0.50 μ m, 30 m x 0.25 mm DI). La temperatura del inyector fue de 190 °C. Se empleó helio como gas transportador a un flujo de 1 mL/min. El horno tuvo el siguiente programa de temperatura: 35 °C inicial, mantenida durante 3 min, se incrementó hasta 90 °C a razón de 9 °C/min y se mantuvo durante 2 min, se incrementó hasta 110 °C a razón de 3 °C/min, se incrementó hasta 210 °C a razón de 9 °C/min, se incrementó hasta 223 °C a razón de 3 °C/min, se incrementó hasta 230 °C a razón de 9 °C/min, se incrementó hasta 310 °C a razón de 35 °C/min y se mantuvo durante 6 min. El tiempo total de corrida fue de 42.3 min. El volumen de inyección fue de 1 μ L en modo splitless. La detección se llevó a cabo por ionización de impacto electrónico con una energía de 70 eV y escaneo de masas en el rango de 50-650 Da. Las temperaturas de la línea de transferencia y fuente de iones fueron de 310 °C y 230 °C, respectivamente. El escaneo se realizó a una velocidad de 2.8 ciclos scan/s. Los isotiocianatos y otros derivados de la hidrólisis de glucosinolatos fueron identificados por comparación de tiempos de retención y espectros de masa con estándares previamente inyectados de bencil isotiocianato y 4-metoxibencil isotiocianato. La cuantificación se realizó construyendo curvas de calibración con estos estándares.

El contenido de 4-metoxibencil isotiocianato (4-MBITC) y 4-metoxibenzaldehído (4-MBCHO), derivados de la hidrólisis de glucosinolatos, fueron expresados como nanomoles por mililitro de muestra o nanomoles por gramo en base seca (nmol/mL o nmol/g bs).

3.4.5. Identificación y cuantificación de glucosinolatos en muestras de sangre, orina y heces de animales de experimentación

La identificación y cuantificación de glucosinolatos en muestras de sangre, orina y heces se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Las muestras de sangre y orina fueron recolectadas y procesadas según la metodología descrita por Sun *et al.* (2019) con algunas modificaciones.

Se utilizaron los extractos obtenidos de las muestras (sangre y orina) obtenidos para el análisis de isotiocianatos y otros derivados de glucosinolatos (acápite 3.4.4.). En el caso de las heces, se siguió la metodología descrita para la obtención de glucosinolatos a partir de harina de mashua (acápite 3.4.2.).

El análisis e identificación de glucosinolatos fue realizado en un espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF) equipado con una fuente de ionización de electrospray (ESI) siguiendo lo propuesto por Campos *et al.* (2019). La columna usada para la separación fue Acquity BEH C18 (1.7 μm , 50 x 2.1 mm de DI) equipada con una pre-columna Acquity BEH C18. La temperatura de las muestras y la columna fueron mantenidas a 5 °C y 30 °C, respectivamente. La fase móvil estuvo compuesta de Agua con ácido fórmico al 0.1 por ciento (Solvente A) y Acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1 por ciento (Solvente B). El gradiente de corrida fue el siguiente: 98 % de A durante dos minutos, luego disminuido gradualmente a 83 % al minuto 12, 0 % al minuto 13 y mantenido hasta el minuto 16, 98 % al minuto 17 y mantenido hasta el minuto 20, con un flujo de 0.2 mL/min. El volumen de la muestra inyectada fue 2 μL previa filtración usando un filtro tipo PTFE de 0.20 μm , 4mm de diámetro (Millex®). La ionización se realizó en modo negativo cuyos parámetros se establecieron como sigue: voltaje del capilar 3 kV, voltaje del cono 40 V, temperatura de la fuente 120 °C, temperatura de desolvatación 550 °C, flujo de gas de desolvatación 1000 L/h, y flujo de gas del cono 50 L/h. La información fue adquirida en polaridad negativa, en modo sensibilidad y rango dinámico extendido. Se empleó leucina-encefalina a concentración de 200 pg/mL como LockMass ($m/z = 554.2615$) que se infundió paralelamente con la muestra a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para la cuantificación de la glucoaubrietina en plasma, orina y heces se empleó glucotropaeolina y sinigrina para la elaboración de una curva estándar; la glucoaubrietina fue cuantificada como microgramos por gramo de muestra en base seca o mililitro ($\mu\text{g}/\text{g}$ bs o $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.5.1. Obtención de harina de mashua

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se empleó aproximadamente 10 kg de mashua, cosechada y transportada inmediatamente a los laboratorios del Instituto de Biotecnología. A continuación, se detallan las operaciones (Figura 5) que fueron adaptadas según lo propuesto por Córdova (2012):

- **Selección.** Se revisaron y eliminaron los tubérculos que se observaron en estado de deterioro (quebrados o magullados), las muestras en buen estado se usaron en el presente trabajo de investigación.
- **Limpieza.** Se retiró la tierra y polvo que se encontraron en la superficie de los tubérculos.
- **Almacenamiento en cámara climatizada.** Los tubérculos fueron almacenados a 12 °C con 80 por ciento de humedad relativa, durante 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días.
- **Lavado/Desinfección.** Los tubérculos fueron lavados con agua potable para retirar las impurezas de la superficie. La desinfección se realizó con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm de cloro libre residual.
- **Blanqueado.** Los tubérculos de mashua fueron blanqueados durante 3 min a 98 ± 2 °C en microondas con la finalidad de inactivar las actividades enzimáticas, especialmente, las del complejo mirosinasa, en una relación de agua destilada: materia prima de 1:4, v:p.
- **Rodajado.** Después del blanqueado, las mashuas fueron inmediatamente rodajadas, con un espesor aproximado de 5 mm.
- **Secado.** El secado se realizó en un secador de cabina con control de temperatura y velocidad de aire caliente, 60 °C y 1.8 m/s, respectivamente, hasta aproximadamente 8 a 10 por ciento de humedad.
- **Molienda y tamizado.** Las muestras obtenidas después del secado fueron molidas y se tamizaron con una malla de paso de luz de 0.5 mm.
- **Envasado/almacenamiento.** La harina obtenida fue envasada en bolsas de polietileno de alta densidad de 88.88 g/m², protegidos de la luz y fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

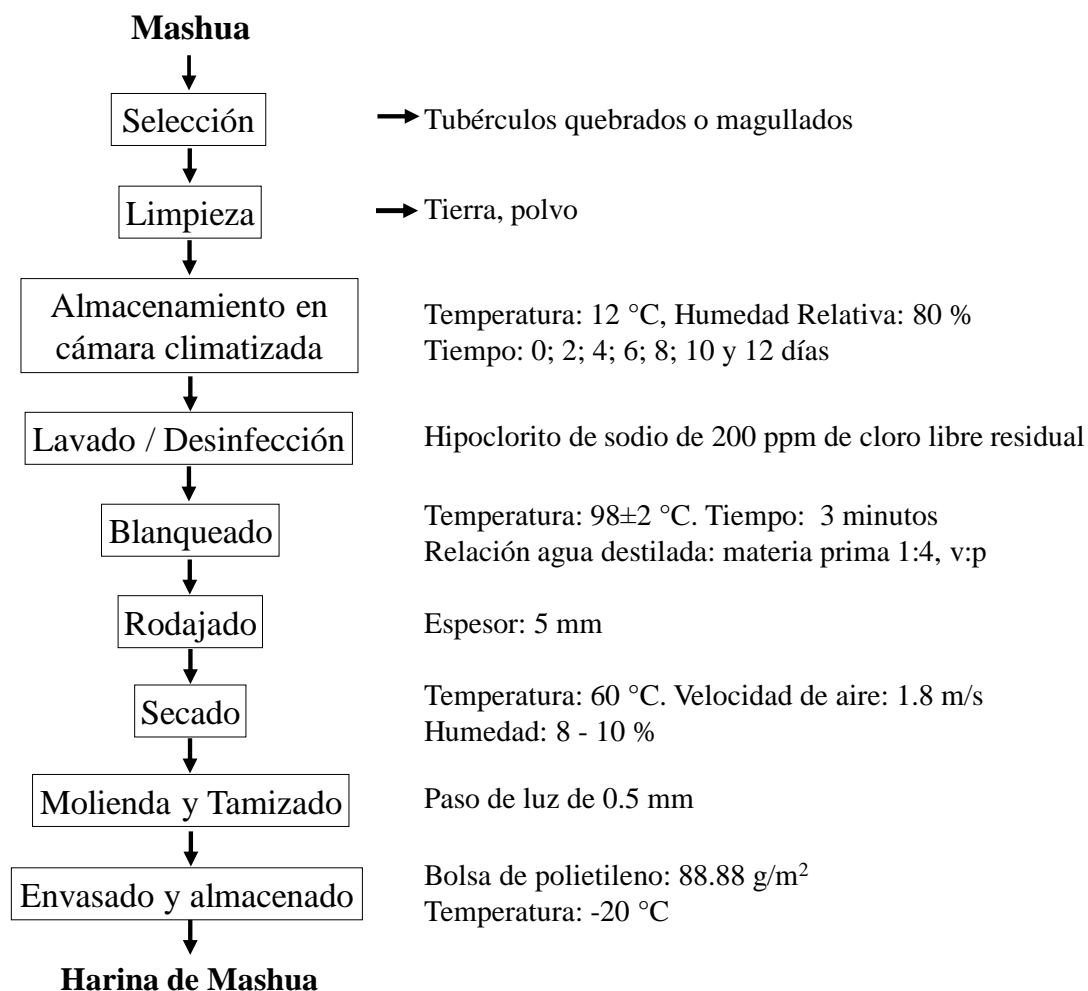


Figura 5: Flujo de operaciones para la obtención de harina de mashua

3.5.2. Obtención de glucosinolatos de mashua

Para la obtención del extracto concentrado de glucosinolatos de mashua se siguió la metodología propuesta por Campos (2011) y con el fin de eliminar compuestos fenólicos se utilizó la polivinilpirrolidona (PVPP); se siguió lo propuesto por Jezek *et al.* (1999) con algunas modificaciones. El procedimiento seguido (Figura 6) se describe a continuación.

- **Extracción.** La extracción fue realizada con etanol al 62.2 por ciento en una relación de harina: etanol de 1:20 p:v, temperatura de 80 °C durante 30 minutos con agitación constante.
- **Centrifugación.** El extracto fue centrifugado a 4000 RPM (1520 g) durante 10 minutos. El pellet obtenido fue eliminado y el sobrenadante fue tratado con polivinilpirrolidona (PVPP).

- **Adición de PVPP.** Al sobrenadante se le agregó PVPP en una relación de PVPP: harina de mashua, 0.17:1 p:p.
- **Agitación.** El sobrenadante tratado con PVPP estuvo en agitación orbital constante durante 45 minutos.
- **Centrifugación.** Finalizada la agitación, el sobrenadante con PVPP, fue centrifugado a 4000 RPM (1520 g) durante 10 minutos. El pellet obtenido fue descartado y el sobrenadante pasó a la siguiente etapa.
- **Filtración.** El sobrenadante fue filtrado en un embudo Büchner con papel Whatman N° 1 mediante el uso de una bomba de succión.
- **Concentración.** La concentración se realizó en dos etapas. El sobrenadante filtrado fue concentrado en vacío con el uso de un evaporador por rotación a una temperatura de 60 °C hasta un volumen final equivalente a la décima parte del volumen inicial. El extracto concentrado fue sometido a liofilización, hasta alcanzar un volumen final equivalente a la quinta parte del volumen inicial, las condiciones de la liofilización fueron -51 °C (condensador) y 292×10^{-3} mBar de presión.
- **Almacenamiento.** El extracto concentrado de glucosinolatos de mashua fue colocado en tubos falcon de 15 mL y almacenados a -20 °C, hasta su uso, previa caracterización, en lo referente al contenido de glucosinolatos, azúcares reductores y compuestos fenólicos totales.

3.5.3. Cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* GG para administración oral a los animales de experimentación

Para el cultivo de la bacteria ácido láctica (*L. rhamnosus* GG) para administración oral en animales de experimentación se siguió la metodología propuesta por Wang *et al.* (2009) con algunas modificaciones. El cultivo se realizó en un frasco de un volumen de 118 ml conteniendo 110 ml de medio MRS-C a 37 °C durante 24 horas, en baño María con agitación orbital, el medio de cultivo contenido en los frascos se encontraba a 95 por ciento de su capacidad. Cumplido el tiempo, la biomasa fue separada por centrifugación y resuspendida en buffer fosfato salino con glicerol previamente esterilizado (Rinaldi *et al.* 2019), para alcanzar una concentración aproximada de 0.7×10^9 UFC/mL, la cual fue posteriormente corroborada con el recuento microbiano. La suspensión bacteriana fue fraccionada según los requerimientos por día para el ensayo *in vivo*, y almacenada a -20 °C.

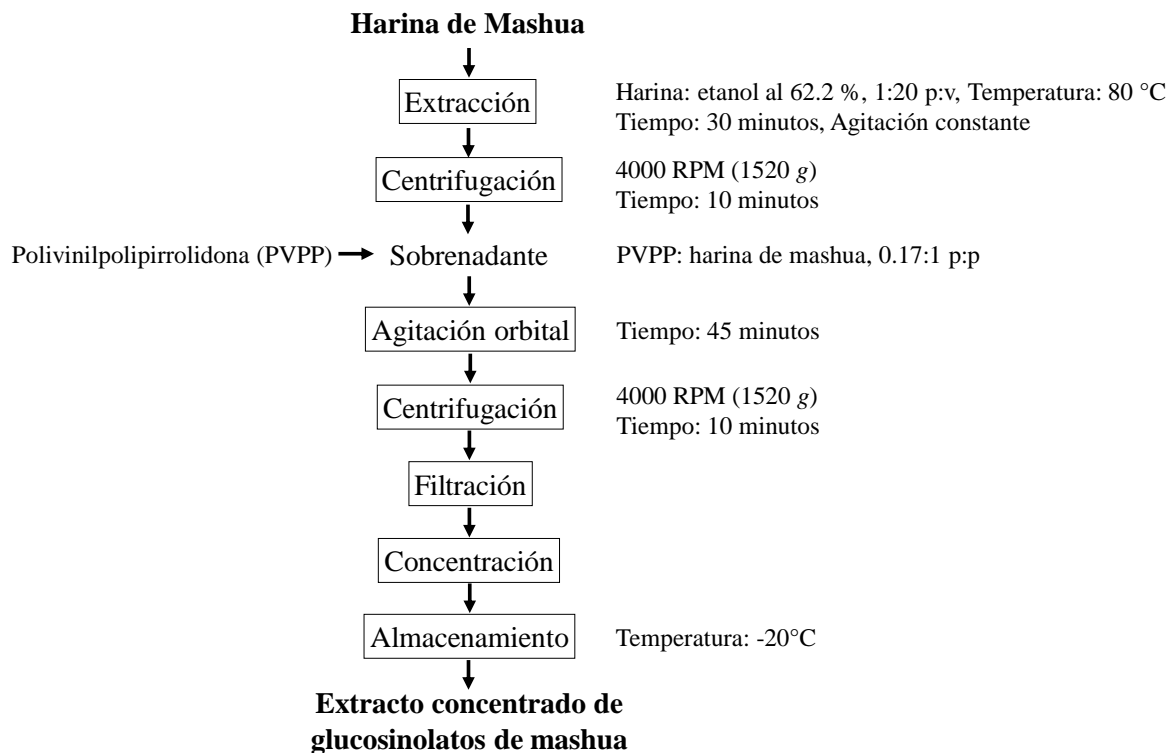


Figura 6: Flujo de operaciones para la obtención del extracto de glucosinatos

3.5.4. Evaluación del metabolismo *in vivo* de los glucosinatos de mashua en animales de experimentación

Se utilizó un total de 54 ratas albinas machos de la raza Holtzman de 2.5 meses de edad con pesos de 294.2 ± 14.2 gramos, obtenidas del Laboratorio de Evaluación Biológica de Alimentos Bioterio del Laboratorio de Evaluación Nutricional de Alimentos perteneciente a la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina. El alimento y el agua potable fueron suministrados *ad libitum*. El valor nutricional del alimento fue similar a las recomendaciones propuestas por Fuentes *et al.* (2008), con algunas modificaciones. La composición nutricional del alimento en presentación de polvo contenía los siguientes valores: 17 por ciento de proteína, 6 por ciento de grasa, 4 por ciento de fibra, 0.92 por ciento de lisina, 0.98 por ciento de metionina-cisteína, 0.63 por ciento de calcio, 0.37 por ciento de fósforo disponible, 12 por ciento de humedad y 2.9 Mcal/Kg de energía metabolizable (Programa de Investigación y Proyección Social en Alimentos de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina).

El manejo de los animales siguió las recomendaciones propuestas por Fuentes *et al.* (2008). El manejo fue llevado de acuerdo con las prácticas normales empleadas en el sistema de jaulas individuales. Se han llevado a cabo medidas preventivas para la conducción normal de los animales como: área ventilada con óptimos recambios de aire, ambiente adecuado para reducir los ruidos externos e internos, las bandejas de recolección de heces y orina fueron recambiadas diariamente, así como el agua de los bebederos de vidrio; los comederos y bebederos fueron lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio, la temperatura ambiental promedio fue de 22 °C, la humedad relativa ambiental promedio de 80 por ciento, iluminación de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

El ensayo *in vivo* tuvo una duración total de 32 días, los animales experimentales fueron agrupados al azar en tres grupos T1, T2 y T3 de dieciocho (18) animales cada uno; tratamiento T1 (control, tracto gastrointestinal no colonizado (BAL-) y no dosificadas con glucosinolatos (GLS-)), tratamiento T2 (control colonización negativa, (BAL-) y dosificadas con glucosinolatos (GLS+)) y tratamiento T3 (tratamiento en estudio, tracto gastrointestinal colonizado (BAL+) y GLS+).

Los animales recibieron durante 30 días dosificaciones orales (previo ayuno) de 1.4×10^9 UFC de *L. rhamnosus* GG (BAL) contenidas en 2 mL de buffer fosfato salino (BAL+, T3) ó 2 mL de buffer fosfato salino (BAL-, T1 y T2) mediante el uso de una cánula orogástrica de metal de 1.5 mm de diámetro de punta de salida y 80 mm de longitud, directamente al estómago, según lo propuesto por Aire *et al.* (2013). Para evaluar la colonización se realizó el recuento de bacterias lácticas anaeróbicas y *Lactobacillus* anaeróbicos, para lo cual se tomaron muestras de heces a los días 0, 10, 20 y 30.

Los animales de los tratamientos T2 (GLS+) y T3 (GLS+), el día 31 del ensayo fueron administrados oralmente con una única dosis de 65.2 mg de GLS totales/Kg de peso vivo (148.7 μ mol de GLS totales/Kg de peso vivo), según la metodología propuesta por Bheemreddy y Jeffery (2007); los animales del tratamiento T1 (control, GLS-) fueron administrados oralmente con una sola dosis de 2.5 mL de buffer fosfato salino, los animales de experimentación fueron ubicados en jaulas metabólicas individuales. Para el análisis de las muestras se recolectaron muestras de heces, orina y plasma sanguíneo a las 1, 3, 5, 9, 24 y 30 horas de los tres tratamientos (T1, T2 y T3). Las muestras fueron analizadas para la

identificación y cuantificación de glucosinolatos, isotiocianatos y otros derivados de glucosinolatos; y el recuento de bacterias lácticas anaeróbicas y *Lactobacillus* anaeróbicos.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

En la Figura 7 se presenta el diseño experimental que se empleó para la evaluación del metabolismo *in vivo* de los glucosinolatos y el cual se describe a continuación.

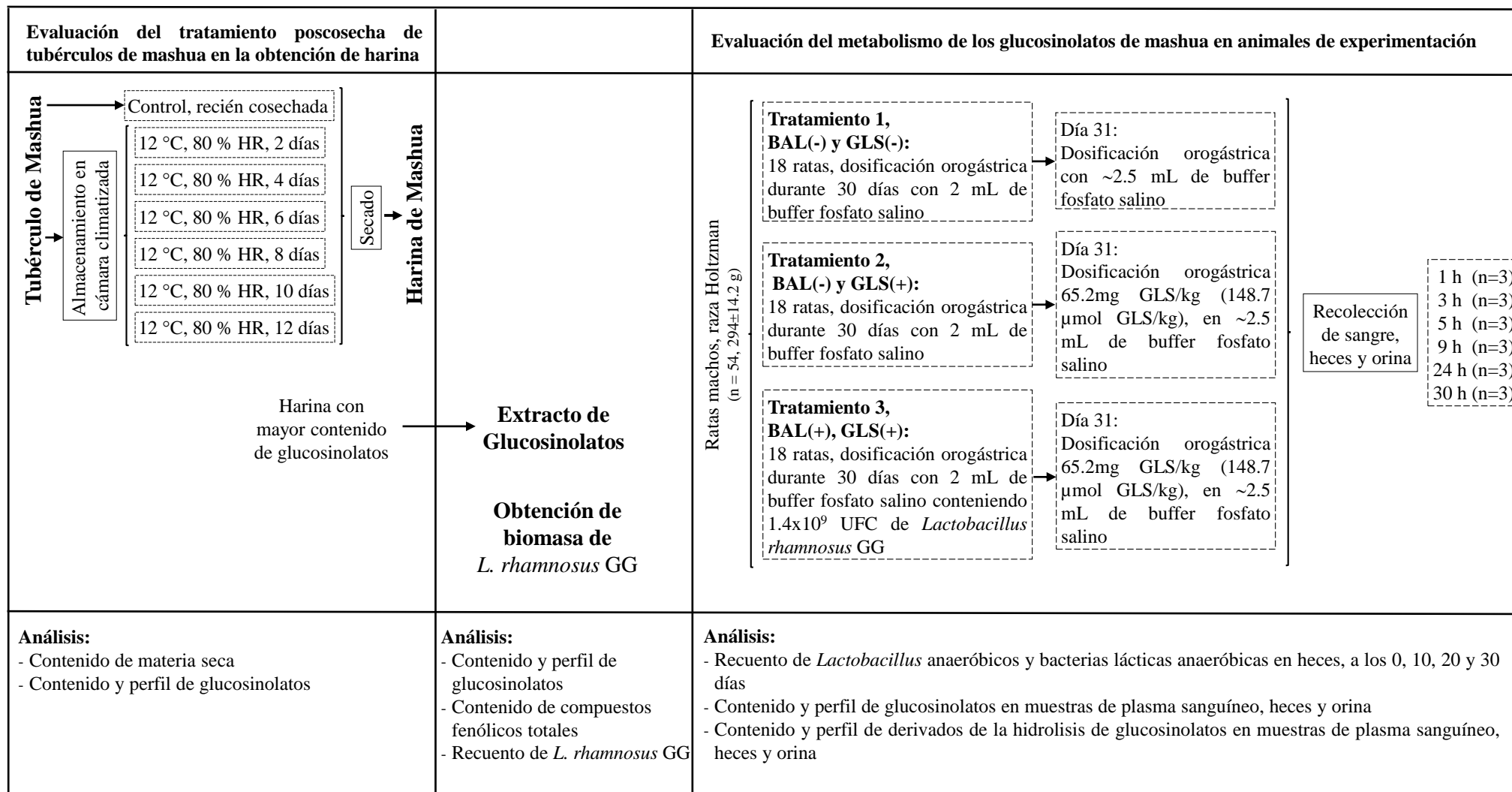
Se realizó la evaluación del estrés abiótico poscosecha a condiciones controladas en cámara climatizada (12 °C y 80 por ciento de humedad relativa) durante 0; 2; 4; 6; 8; 10; 12 días de almacenamiento en el contenido total de glucosinolatos y los glucosinolatos individuales (glucosinalbina, glucotropaeolina y glucoaubrietina) de las harinas obtenidas después del secado. La harina con mayor contenido de glucosinolatos totales fue empleada para la extracción de los glucosinolatos.

Asimismo, se evaluó el metabolismo *in vivo* de los glucosinolatos de mashua, donde se evaluó el efecto de la dosificación de Glucosinolatos (GLS+) en animales de experimentación a los que se les dio un probiótico (*L. rhamnosus* GG) durante 30 días previo a la dosificación de glucosinolatos (tratamiento T3), se consideró un control sin probiótico (BAL-, tratamiento T2) y un control de todo el ensayo (BAL- y GLS-, tratamiento T1). Los animales experimentales fueron distribuidos al azar, 18 por cada tratamiento (T1, T2 y T3) y fueron ubicados en jaulas metabólicas individuales. Los tiempos de recolección de las muestras (sangre, orina y heces) fueron a las 1, 3, 5, 9, 24 y 30 horas.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la evaluación del estrés abiótico poscosecha a condiciones controladas en el contenido de glucosinolatos de las harinas obtenidas después del secado, fue utilizado un diseño completamente al azar (D.C.A.) considerando el tiempo de almacenamiento como variable independiente y como variables respuesta el contenido de glucosinolatos y porcentaje de humedad. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. Los efectos principales fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANVA) seguido de la prueba Tukey para la comparación de medias ($p < 0.05$), empleando para ello el software estadístico MINITAB v.18 (Minitab® Statistical Software).

Para la evaluación del recuento de bacterias lácticas anaeróbicas y *Lactobacillus* anaeróbicos para determinar la colonización del probiótico, fue utilizado un diseño de bloques completos al azar (D.B.C.A.) con un arreglo factorial de 2 x 3 (medios x tratamientos) y los efectos principales fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANVA) seguido de la prueba Tukey para la comparación de medias ($p < 0.05$). Para cada tratamiento se utilizaron 18 animales de experimentación. Para la identificación y cuantificación de glucosinolatos, isotiocianatos y otros derivados de hidrólisis de glucosinolatos en muestras de heces, orina y plasma, las medias fueron evaluadas mediante un análisis de varianza (ANVA) seguido de la prueba *t*-Student para la comparación de medias ($p < 0.05$), para cada tiempo evaluado se consideró tres animales de experimentación. El software estadístico empleado para las evaluaciones fue MINITAB v.18 (Minitab® Statistical Software).



Recolección de sangre, heces y orina

- 1 h (n=3)
- 3 h (n=3)
- 5 h (n=3)
- 9 h (n=3)
- 24 h (n=3)
- 30 h (n=3)

Figura 7: Diseño experimental para la evaluación del metabolismo *in vivo* de los glucosinolatos de mashua

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSINOLATOS EN HARINA DE MASHUA

El análisis de las harinas de tubérculos de mashua cosechadas y sometidas a estrés abiótico en cámara climatizada muestran la presencia de tres glucosinolatos (Anexo 1) los cuales fueron: p-hidroxibencil glucosinolato (glucosinalbina, GSN), bencil glucosinolato (glucotropaeolina, GTR) y 4-metoxibencil glucosinolato (glucoaubrietina, GAU). El Cuadro 3 muestra el contenido de humedad de las harinas obtenidas y el contenido de los glucosinolatos individuales y totales de las muestras de mashua sometidas a estrés abiótico.

Cuadro 3: Contenido de humedad y glucosinolatos en harina de tubérculos de mashua almacenados a diferentes tiempos

Almacenamiento (días)	Humedad (%)	Glucosinalbina ($\mu\text{mol/g bs}$)	Glucotropaeolina ($\mu\text{mol/g bs}$)	Glucoaubrietina ($\mu\text{mol/g bs}$)	Glucosinolatos totales ($\mu\text{mol/g bs}$)
0	5.5 ± 0.1	0.12 ± 0.01^a	7.0 ± 0.6^a	19.5 ± 1.3^a	26.6 ± 0.7^a
2	4.1 ± 0.3	0.08 ± 0.01^b	6.0 ± 0.4^{ab}	17.2 ± 1.1^{ab}	23.3 ± 0.4^b
4	7.0 ± 0.2	0.03 ± 0.00^c	5.0 ± 0.4^b	16.6 ± 0.5^{bc}	21.6 ± 0.6^c
6	5.3 ± 0.1	Traza	6.1 ± 0.3^{ab}	8.7 ± 1.0^d	14.9 ± 0.3^d
8	5.8 ± 0.2	0.01 ± 0.00^d	5.8 ± 0.7^{ab}	14.6 ± 0.6^c	20.4 ± 0.2^c
10	6.4 ± 0.2	Traza	5.3 ± 0.6^b	10.6 ± 0.9^d	15.9 ± 0.4^d
12	3.2 ± 0.3	No detectado	2.1 ± 0.2^c	1.6 ± 0.1^e	3.6 ± 0.1^e

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las medias según la Prueba de Tukey ($p < 0.05$). Promedio \pm Desviación estándar ($n=3$)

El porcentaje de representación de los glucosinolatos identificados, GSN, GTR y GAU estuvieron presentes en 0.45; 26.3 y 73.3 por ciento, respectivamente, para un tiempo de

almacenamiento de cero días (control). Este porcentaje de representación de la GAU no se asemeja a lo reportado por Campos *et al.* (2019), quienes reportaron un porcentaje de 96 a 99 por ciento para GAU en diez cultivares de mashua. Así mismo, Martín e Higuera (2016), reportaron que la GAU fue el glucosinolato más representativo en 65 acciones de tubérculos de mashua y que la GSN se encontraba en muy poca cantidad, similar a nuestros resultados. La GSN ha sido reportada en hipocótilos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotipo rojo, representando el 1.6 por ciento del contenido de glucosinolatos totales (Yábar *et al.* 2011), porcentaje superior a lo reportado para la mashua control.

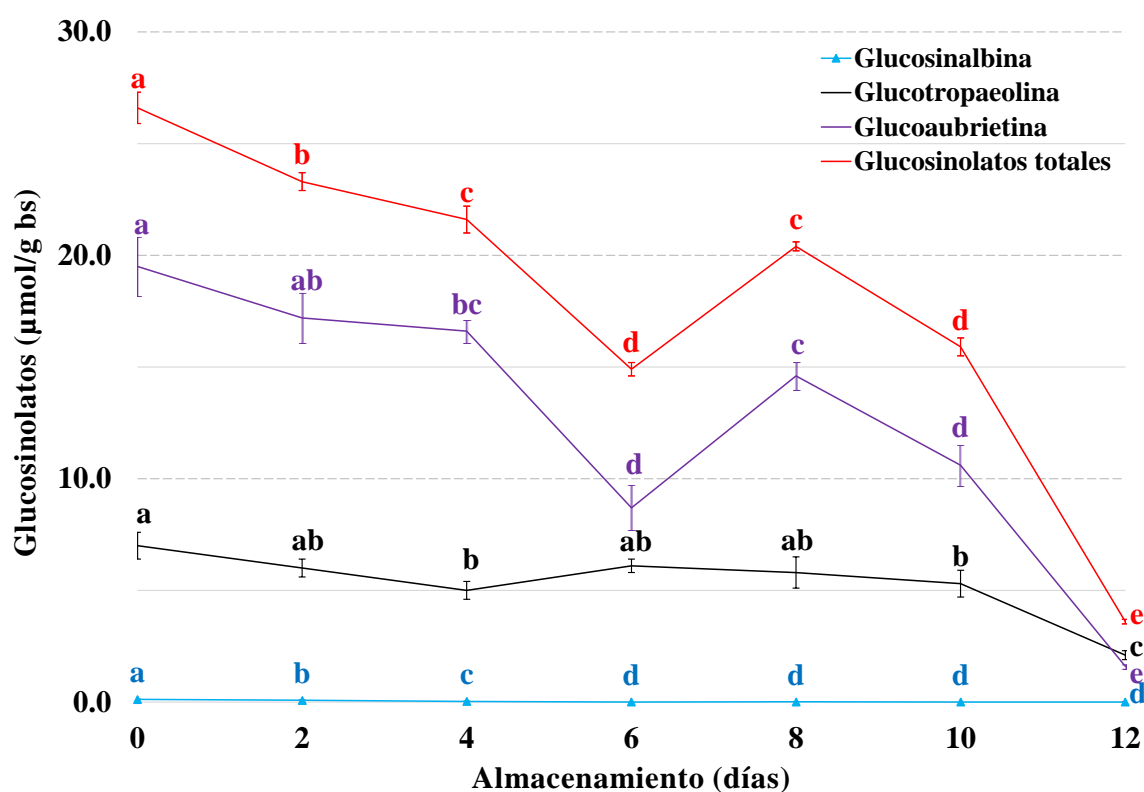


Figura 8: Contenido de glucosinalbina, glucotropaeolina, glucoaubrietina y glucosinolatos totales ($\mu\text{mol/g bs}$) en harina de tubérculos de mashua almacenados a diferentes tiempos

Letras diferentes en cada curva de tendencia indican diferencias significativas entre las medias según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)

En la Figura 8 se observa que el contenido de glucosinolatos totales (Anexo 2) para un tiempo de almacenamiento de cero días ($26.6 \mu\text{mol/g bs}$), se encuentra en el rango reportado por Arias (2011), en 65 acciones de mashua colombiana, 1.20 a $30.40 \mu\text{mol/g bs}$ de glucosinolatos totales; por Ortega *et al.* (2006), con 0.27 a $50.74 \mu\text{mol/g bs}$ de glucosinolatos

totales de tubérculos de mashua; por Campos *et al.* (2019), con 4.9 y 54.2 $\mu\text{mol/g}$ bs de glucosinolatos totales en diez cultivares de mashua; por Martín e Higuera (2016), con 0.3 a 25.8 $\mu\text{mol/g}$ bs de glucosinolatos totales en 65 acciones de mashua. Por otro lado, se ha podido observar que el contenido de glucosinolatos totales reportado es similar a lo reportado en flores de brócoli (21.1 $\mu\text{mol/g}$ bs) (Rybarczyk-Plonska *et al.* 2016).

El contenido de GSN muestra una disminución significativa ($p < 0.05$) (Figura 8, Anexo 3), desde el día 0 al día 12 de almacenamiento, cuyo contenido pasó de 0.12 $\mu\text{mol/g}$ bs a no detectarse. La tendencia del decrecimiento de GSN es opuesto a lo reportado por Yábar *et al.* (2011), quienes observaron un incremento de GSN en tres cultivares de maca secadas a condiciones ambientales (entre 10 a 15 °C), atribuyendo el incremento al estrés provocado por el acondicionamiento de la maca antes del secado y que podría haber acelerado el metabolismo durante los primeros cuatro días; así también, se podría esperar una pérdida de glucosinolatos debido a la actividad mirosinasa.

Sobre el contenido de GTR (Figura 8), se pudo observar que durante los tiempos de almacenamiento de 2 a 10 días no se presentan diferencias significativas ($p > 0.05$, Anexo 4), y los valores están comprendidos entre 6.0 a 5.3 $\mu\text{mol/g}$ bs. Se observa que el contenido de GTR disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en el día 12 (2.1 $\mu\text{mol/g}$ bs) respecto al día 0 (7.0 $\mu\text{mol/g}$ bs). Este comportamiento es similar a lo reportado por Campos *et al.* (2019), quienes observaron que durante los primeros 12 días de almacenamiento de mashua en sombra, la GTR se mantuvo constante y luego observaron una disminución en el día 15; y por Martínez *et al.* (2013) quienes al almacenar brócoli a 4 °C durante 14 días provocó pérdidas significativas (71.8 por ciento) del 4-metoxi-3-indolilmetil glucosinolato (4-metoxiglucobrassicina), similar a la pérdida observada de GTR al finalizar los 12 días de almacenamiento (70.0 por ciento) en la presente investigación. El comportamiento observado del contenido de GTR durante los 12 días de almacenamiento podría ser explicado como pérdida de glucosinolatos debido a la actividad mirosinasa, debido al estrés prolongado en las condiciones de evaluación poscosecha, similar a lo señalado por Yábar *et al.* (2011) para hipocótilos de maca expuestos a temperaturas extremas de 5 °C a 10 °C durante la noche y a 15 °C durante el día.

Referente al contenido de GAU (Figura 8, Anexo 5) y glucosinolatos totales (GLSt), se pudo observar que ambos decrecieron con el tiempo de almacenamiento. En ese sentido, para los

tiempos de almacenamiento de 0 y 6 días mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), lo que se evidencia en la disminución del contenido de GAU y GLSt de 19.5 a 8.7 $\mu\text{mol/g}$ bs y 26.6 a 14.9 $\mu\text{mol/g}$ bs, respectivamente. Sin embargo, en el día 8 de almacenamiento se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de GAU y GLSt a valores de 14.6 y 20.4 $\mu\text{mol/g}$ bs, respectivamente. Pero, a partir del décimo día de almacenamiento, los contenidos de GAU y GLSt disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) a valores finales de 1.6 y 3.6 $\mu\text{mol/g}$ bs, respectivamente. La tendencia de disminución de GLSt observada desde el día 0 al día 6 de almacenamiento es similar a los datos reportados por Paulsen *et al.* (2018), quienes reportaron pérdidas significativas de GLSt de muestras de brócoli almacenadas a 15 °C durante los primeros 7 días de evaluación; y posterior incremento hasta el día 14 de almacenamiento; tendencia similar a lo observado entre el día 6 y 8 de almacenamiento de mashua. Por otro lado, Rybarczyk-Plonska *et al.* (2016), reportaron que brotes de brócoli almacenados durante 3 días con incremento de temperatura de 10 a 18 °C, mostraron disminución significativa en el contenido de casi todos los glucosinolatos evaluados, como la glucoiberina, glucorafanina, glucobrassicina, neoglucobrassicina y glucosinolatos totales. La tendencia de la disminución de GAU y GLSt al finalizar los 12 días de almacenamiento a 12 °C son similares a los reportados por Campos *et al.* (2019), quienes a pesar de haber almacenado los tubérculos de mashua en refrigeración a 4 °C observaron pérdidas de GAU y GLSt al finalizar los 15 días de almacenamiento.

4.2. PURIFICACIÓN DE LOS GLUCOSINOLATOS PRESENTES EN HARINAS DE TUBÉRCULOS DE MASHUA

La purificación con polivinilpolipirrolidona (PVPP) del extracto de glucosinolatos de mashua mostró la eliminación en el rango de 50 y 55 por ciento de compuestos fenólicos totales, mientras que el porcentaje de recuperación de glucosinolatos fue 61 por ciento. El extracto concentrado de glucosinolatos obtenido fue caracterizado, los resultados son mostrados en el Cuadro 4. Acerca de la eliminación de los compuestos fenólicos, resultados similares han sido reportados en diversas investigaciones; Durán *et al.* (2015) eliminaron entre 43 y 55 por ciento de compuestos fenólicos como el ácido cafeico y el ácido gálico, respectivamente. Magalhães *et al.* (2010), reportaron pérdidas del 30 por ciento de compuestos fenólicos a partir de un extracto de planta de lúpulo. La PVPP es un agente clarificante, cuya capacidad de adsorción de compuestos fenólicos se relaciona directamente con el número de grupos hidroxilo y anillos aromáticos presentes en dichos compuestos

(ácidos fenólicos, flavonoles y flavanoles, etc.) (Durán *et al.* 2015; Magalhães *et al.* 2010). Así, Castro *et al.* (2016) indicaron que la PVPP es un agente polimérico que carece de selectividad y tiene un rango de pH limitado, por lo que muestra diferencias en la capacidad de adsorción de compuestos fenólicos en base al peso molecular. En ese sentido, Gil *et al.* (2019), al añadir PVPP durante la fermentación del vino rosado observaron la disminución del color, traduciéndose en la adsorción de antocianinas y otros pigmentos, concluyendo que la PVPP tiene una adsorción específica por los flavonoles, flavanoles y antocianinas.

Cuadro 4: Características físico-químicas del extracto concentrado de glucosinolatos de mashua

Análisis	Contenido
Materia Seca (%)	19.94
Compuestos fenólicos totales (mg AGE/mL)	15.94
Antocianinas (mg Cy-3-Glu/mL)	7.48
Azúcares reductores expresado como glucosa (mg/mL)	573.79
Glucosinolatos totales (mg/mL)	13.36
Glucosinalbina (mg/mL)	0.09
Glucotropaeolina (mg/mL)	0.39
Glucoaubrietina (mg/mL)	12.88
Rendimiento (g mashua/ml de extracto concentrado)	18.32

4.3. EVALUACIÓN DEL METABOLISMO *IN VIVO* DE LOS GLUCOSINOLATOS DE MASHUA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

4.3.1. Recuento total de bacterias de *Lactobacillus* anaeróbicos y bacterias lácticas anaeróbicas en heces de animales de experimentación

Los resultados de los recuentos en placa de las muestras de heces realizadas en un medio selectivo para especies de *Lactobacillus* MRS-C con Verde de Bromocresol y Vancomicina (MRS-C-VB-V) y un medio no selectivo Man, Rogosa y Sharp con cisteína (MRS-C), son

mostrados en el Cuadro 5. El análisis estadístico de los recuentos expresados en UFC/g bs mostraron una distribución asimétrica con varianzas heterogéneas (datos no mostrados), por lo que fue necesario normalizar los recuentos para un adecuado tratamiento estadístico, por ello se siguió lo propuesto por Menéndez 2013 y Espino 2006, donde los datos obtenidos en UFC/g bs fueron transformados a Log UFC/ g bs.

Cuadro 5: Recuento total promedio de bacterias de *Lactobacillus* y bacterias lácticas anaeróbicas en heces provenientes de animales de experimentación

Día	Medio selectivo MRS-C-VB-V UFC/g bs (Log UFC/g bs)			Medio no selectivo MRS-C UFC/g bs (Log UFC/g bs)		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
0	8.39±0.46 (4.15x10 ⁸)	8.56±0.41 (5.56x10 ⁸)	8.07±0.35 (1.63x10 ⁸)	9.27±0.54 (4.06x10 ⁹)	9.23±0.34 (2.42x10 ⁹)	8.99±0.27 (1.17x10 ⁹)
10	8.30±0.50 (3.56x10 ⁸)	8.49±0.45 (5.06x10 ⁸)	8.19±0.39 (2.26x10 ⁸)	9.25±0.55 (3.60x10 ⁹)	9.24±0.50 (3.16x10 ⁹)	9.08±0.45 (2.10x10 ⁹)
20	8.22±0.29 (1.96x10 ⁸)	8.38±0.33 (3.09x10 ⁸)	8.17±0.33 (1.97x10 ⁸)	9.15±0.47 (2.67x10 ⁹)	9.12±0.47 (2.33x10 ⁹)	9.06±0.22 (1.28x10 ⁹)
30	8.15±0.26 (1.67x10 ⁸)	8.27±0.45 (3.35x10 ⁸)	8.14±0.32 (1.75x10 ⁸)	9.05±0.32 (1.48x10 ⁹)	9.02±0.27 (1.30x10 ⁹)	9.01±0.21 (1.13x10 ⁹)

Promedio ± Desviación estándar (n=18). T1: BAL(-) y GLS(-); T2: BAL(-) y GLS(+); T3: BAL(+) y GLS(+).

En el Cuadro 5, se puede observar que los promedios de los recuentos totales de los tratamientos T1 y T2 disminuyeron en el tiempo, tanto en el medio selectivo como en el medio no selectivo; sin embargo, los recuentos totales promedios del tratamiento T3 tuvo una tendencia de aumento en el tiempo en el medio selectivo, pero un decrecimiento en el medio no selectivo. Asimismo, se pudo observar que los recuentos totales de los medios no selectivos fueron superiores a los del medio selectivo.

El efecto de los medios empleados sobre la cinética de crecimiento de *Lactobacillus* muestra una diferencia significativa ($p < 0.05$, Anexo 6) entre los dos medios MRS-C y MRS-C-VB-V, obteniendo valores promedios de 9.12 y 8.28 Log UFC/g bs, respectivamente. El menor valor observado por el medio MRS-C-VB-V sobre el medio MRS-C podría ser explicado

porque el medio MRS-C-VB-V permite el crecimiento de Lactobacilos fecales pero la flora fecal como las enterobacterias, bacteroides y otros anaerobios gram-negativos como los clostridios son inhibidos por el bajo pH del medio y la vancomicina, y el indicador verde de bromocresol permite diferenciar las colonias que utilizan los azúcares del medio al virar a amarillo (Hartemink *et al.* 1997; Fuentes 2005). Hartemink y Rombouts (1999) también observaron que la selectividad del medio MRS-C-VB-V es muy alta en comparación al medio MRS, y es evidenciado por el bajo porcentaje de colonias no típicas de *Lactobacillus*, la cual puede oscilar entre 0 y 5 por ciento para recuentos en heces de cerdos y gatos, respectivamente. Del mismo modo, Vera *et al.* (2009) y Quartieri *et al.* (2016) mostraron la selectividad que tiene el medio MRS-C-VB-V comparado con el medio MRS, confirmando la selectividad observada en la presente investigación.

A partir del análisis estadístico de los efectos de los tratamientos y los días (Anexo 6), no se observaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos T1 y T2, cuyos promedios fueron 8.72 y 8.79 Log UFC/g bs, respectivamente; sin embargo, el tratamiento T3 evidenció una diferencia significativa ($p < 0.05$) en referencia a los tratamientos T1 y T2 con un valor promedio de 8.59 Log UFC/g bs. En referencia al efecto de los días de dosificación (Anexo 6) no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para los 0, 10 y 20 días cuyos valores fueron 8.75, 8.76 y 8.68 Log UFC/g bs, respectivamente; sin embargo, para el día 30 se pudo observar una diferencia significativa ($p < 0.05$) en relación a los 0 y 10 días con un valor de 8.61 Log UFC/g bs, pero para los días 20 y 30 de dosificación no se observó diferencia significativa, evidenciando un valor constante en los recuentos totales, resultados similares fueron reportados por Wang *et al.* (2009), quienes indujeron una colonización del tracto gastrointestinal de ratas durante 28 días de dosificación diaria con *L. plantarum* L2, con un valor entre 8 a 9 Log UFC/g bs similar a lo observado a los 30 días de dosificación con el T3. Asimismo, reportaron que la cepa *L. rhamnosus* GG muestra una alta adhesión a las células Caco-2 (célula intestinal de humanos) e IEC-6 (célula intestinal de ratas) lo que evidenciaría su capacidad para sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal y colonizar, esto indicaría la probabilidad de adhesión en la presente investigación. Un estudio realizado en humanos por Alander *et al.* (1997), reportaron que las personas que consumieron 1.2×10^{11} UFC de *L. rhamnosus* GG (dosis diarias durante 12 días) presentaron a esta bacteria como predominante en las heces.

Sobre el efecto de los tratamientos, se observó un menor valor obtenido con el tratamiento T3 respecto a los tratamientos T1 y T2 (Anexo 6), que podría ser explicado por Plaza (2014), quien realizó un estudio en humanos que recibieron diariamente *L. rhamnosus* (durante 30 días) y observaron que esta cepa modificó ligeramente las poblaciones bacterianas de las heces. Este hecho pudo deberse al desplazamiento de las cepas de *Clostridium difficile* y bifidobacterias lo que evidencia una persistencia de la cepa *L. rhamnosus* en el intestino. El comportamiento de colonización también pudo ser observado en porcinos, con dosificación oral con *L. acidophilus* quienes colonizaron el tracto digestivo hasta 14 días post dosificación, siendo capaces de reducir la presencia de otros microorganismos potencialmente patógenos (Pérez *et al.* 2014). Chen *et al.* (2020), observaron el desplazamiento de bacterias no benéficas en ratones con infección séptica que fueron dosificados con *L. rhamnosus* GG (concentración 2×10^9 UFC/mL). A partir de los resultados obtenidos se verifica que la dosificación con *L. rhamnosus* GG (T3) colonizó el tracto gastrointestinal a los 20 días debido a su capacidad para desplazar otras bacterias (evidenciado por un menor recuento comparado a los tratamientos T1 y T2).

4.3.2. Identificación y cuantificación de glucosinolatos, isotiocianatos y otros derivados de la hidrólisis de glucosinolatos en muestras de sangre, orina y heces del metabolismo *in vivo* de animales de experimentación

Los pesos promedio de los animales de experimentación fueron 294.6 ± 10.4 , 294.7 ± 15.6 y 293.3 ± 16.5 g, para los tratamientos T1, T2 y T3, respectivamente (Anexo 7). Los pesos y contenido de materia seca de las heces y volumen de orina para cada tratamiento y tiempo de evaluación son mostrados en el Anexo 8. El Cuadro 6 presenta el contenido promedio de los derivados de glucosinolatos, que son el resultado de la búsqueda de los isotiocianatos y sus posibles derivados conjugados esperados a partir de los glucosinolatos de mashua (GSN, GTR y GAU); y el Cuadro 7 muestra el contenido de glucosinolatos presentes en las muestras biológicas. El Cuadro 6 evidencia la presencia de dos derivados de la GAU (Anexo 9), el 4-metoxibencil isotiocianato (4-MBITC) y el 4-metoxibenzaldehído (4-MBCHO). Se debe señalar que el tratamiento T1, como era de esperar no evidenció la presencia de algún compuesto relacionado con los glucosinolatos. En referencia a la procedencia del 4-MBCHO se presume que es un compuesto derivado de la hidrólisis de la GAU debido a que es un glucosinolato aromático similar al bencil glucosinolato (GTR) y cuyo metabolismo fue estudiado por Esparza *et al.* (2020), quienes reportaron al benzaldehído como un producto

de la hidrólisis de la GTR. Por otro lado, Agnani *et al.* (2003) señalaron que podría existir una relación entre el contenido de 4-MBITC y 4-MBCHO formado en la destilación en aceites esenciales y que podrían ser derivados de glucosinolatos con grupos 4-metoxibencil como la GAU.

Cuadro 6: Contenido promedio de 4-metoxibencil isotiocianato (4-MBITC) y 4-metoxibenzaldehído (4-MBCHO) en muestras orina recolectadas a diferentes horas

Muestra	Lapso de recolección (horas)	Derivados de glucosinolatos			
		4-MBITC (nmol/mL)		4-MBCHO (nmol/mL)	
		T2	T3	T2	T3
Orina	0-1	nd	8.77 ± 0.23	nd	nd
	1-3	11.26 ± 0.14 ^b	13.13 ± 0.52 ^a	nd	7.98 ± 0.10
	3-5	11.13 ± 0.33 ^a	8.87 ± 0.23 ^b	8.09 ± 0.16 ^b	10.17 ± 0.11 ^a
	5-9	8.64 ± 0.17 ^b	10.63 ± 0.18 ^a	7.91 ± 0.07 ^b	12.10 ± 0.25 ^a
	9-24	nd	nd	7.73 ± 0.25 ^b	9.74 ± 0.36 ^a
	24-30	nd	nd	nd	nd

Letras diferentes entre tratamientos para la misma hora, analito y tipo de muestra indican diferencias significativas entre las medias según la prueba *t*-Student ($p < 0.05$). Promedio ± Desviación estándar (n=3). nd: No detectado. T1: BAL(-) y GLS(-); T2: BAL(-) y GLS(+); T3: BAL(+) y GLS(+).

Cuadro 7: Contenido promedio de glucoaubrietina en muestras de plasma, heces y orina recolectadas a diferentes horas

Muestra	Lapso de recolección (horas)	GAU (µg/mL o µg/g bs)	
		T2	T3
		Plasma	0-1
1-3	trz		trz
Heces	0-1	2.00 ± 0.04 ^b	8.24 ± 0.21 ^a
	1-3	nd	0.70 ± 0.02
Orina	0-1	11.20 ± 0.33 ^b	22.72 ± 0.65 ^a
	1-3	22.28 ± 0.66 ^a	15.36 ± 0.37 ^b
	3-5	9.79 ± 0.25 ^a	4.35 ± 0.12 ^b
	5-9	5.23 ± 0.15 ^b	6.51 ± 0.17 ^a
	9-24	1.22 ± 0.02 ^b	1.63 ± 0.05 ^a
	24-30	0.38 ± 0.01 ^a	0.24 ± 0.02 ^b

Letras diferentes entre tratamientos para la misma hora, analito y tipo de muestra indican diferencias significativas entre las medias según la prueba *t*-Student ($p < 0.05$). Promedio ± Desviación estándar (n=3). nd: No detectado. trz: trazas. T1: BAL(-) y GLS(-); T2: BAL(-) y GLS(+); T3: BAL(+) y GLS(+).

Sobre las muestras de plasma, no se observó la presencia de 4-MBITC ni 4-MBCHO en los tres tratamientos; sin embargo, a 1 y 3 horas de recolección de muestra se observaron trazas del glucosinolato precursor de estos derivados, en los tratamientos T2 y T3 (Cuadro 7). Las trazas de GAU y la ausencia de sus metabolitos en plasma podría ser explicado según lo reportado por Sørensen *et al.* (2016), quienes investigaron el metabolismo *in vivo* de GTR, gluconasturtiina (GN) y GSN en cerdos, observando presencia de GSN y sus derivados en el plasma, cuya concentración varió con el tiempo; esta diferencia en el metabolismo de los glucosinolatos fue justificada por una alta conversión de GSN en el estómago a sus correspondientes nitrilos a diferencia de GTR y GN. Sin embargo, Sun *et al.* (2019) identificaron el sulforafano en plasma humano, después de consumir flores de brócoli; manteniéndose en el plasma hasta las 24 horas de iniciada la dosis. En ese sentido, los contenidos trazas de GAU en plasma de los tratamientos T2 y T3 durante las 1 y 3 horas de recolección pueden servir como una evidencia de que la GAU de mashua ha sido absorbida y metabolizada.

En referencia a los derivados de glucosinolatos en las muestras de heces, no se observó la presencia de 4-MBITC ni 4-MBCHO en los tratamientos T2 y T3. Sin embargo, respecto a los glucosinolatos, se observó presencia de GAU, a 1 y 3 horas después de la aplicación de los glucosinolatos, presentando diferencias significativas ($p < 0.05$, Anexo 11) en los contenidos de GAU entre T2 y T3 con valores de 2.00 y 8.24 ($\mu\text{g/g bs}$), respectivamente, a una hora después de la aplicación. A la hora 3, solo se observó la presencia de GAU en el tratamiento T3 con un valor de 0.7 ($\mu\text{g/g bs}$). A partir de los datos mostrados en el Cuadro 7, se pudo calcular que los porcentajes de eliminación de GAU en heces para los tratamientos T2 y T3 fueron 0.01 y 0.03 %, respectivamente, esto podría indicar que han sido digeridos y absorbidos.

En las muestras de orina, sobre el contenido de GAU (Anexo 10), a la 1, 3, 5, 9, 24 y 30 horas de recolección se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$, Anexos 12-17) entre los tratamientos T2 y T3. A partir de los datos mostrados en el Cuadro 7, se pudo calcular los porcentajes de eliminación de GAU en orina para los tratamientos T2 y T3 y fueron 0.60 y 0.62 % respectivamente, lo que podría evidenciar que más del 99 % de la dosis suministrada de GAU pudo ser absorbida y metabolizada, indicando una alta capacidad de absorción. El alto porcentaje de absorción también fue observado en otros tipos de glucosinolatos, Bheemreddy y Jeffery (2007) estudiaron las rutas metabólicas de la

glucorafanina extraídas de semillas de brócoli, administrada oralmente en ratas, sólo el 5 por ciento de glucorafanina fue eliminada intacta en la orina, porcentaje mayor a lo observado en los tratamientos T2 y T3.

En el Cuadro 6 se observó que los contenidos de 4-MBITC y 4-MBCHO en las muestras de orina son superiores en los animales experimentales del tratamiento T3 comparados con los del tratamiento T2, a excepción del contenido de 4-MBITC en el tratamiento T2 que fue superior al tratamiento T3 a las 5 horas de recolección, ésta diferencia del tratamiento T3 sobre el tratamiento T2 podría haber sido favorecida por la colonización de *L. rhamnosus* GG en el tracto digestivo de los animales experimentales del tratamiento T3, pudiéndose haber mejorado la capacidad de fermentación de los glucosinolatos y en este caso específico de la GAU. La capacidad de fermentar los glucosinolatos por la microbiota del colon ha sido ampliamente reportada, Dinkova-Kostova y Kostov (2012) reportaron que la microbiota del colon convirtió los glucosinolatos a isotiocianatos; Cheng *et al.* (2004) han reportado que *Bifidobacterium* sp. fue capaz de digerir y metabolizar glucosinolatos y pudieron identificar alil isotiocianato y 3-butenonitrilo a partir de la sinigrina y al bencil isotiocianato y al fenilacetónitrilo a partir de la glucotropaeolina.

La Figura 9 muestra que el 4-MBITC se presenta hasta las 9 horas de recolección. Algunos glucosinolatos como la glucorafanina, tienen mayor tiempo de metabolismo, así el sulforafano (isotiocianato derivado de la glucorafanina) se detectó en muestras de orina hasta después de las 36 horas de la dosificación (Bheemreddy y Jeffery 2007). Asimismo, en la Figura 9, se puede observar que el pico de máxima concentración de 4-MBITC fue a las 3 horas de recolección para los tratamientos T2 y T3, de manera similar a lo reportado por Sun *et al.* (2019) para sulforafano de flores de brócoli. En cuanto al 4-MBCHO en las muestras de orina, se detectó a las 3 horas en el tratamiento T3, y a las 5, 9 y 24 horas, se observaron diferencias ($p < 0.05$, Anexos 21-23) entre los tratamientos T2 y T3, siendo superiores en todos los casos para el tratamiento con dosificación de bacterias (T3); a las 30 horas no se detectó este metabolito.

La presencia de los derivados de GLS en orina, como los isotiocianatos, se justifica en que éstos son formados como respuesta metabólica tanto en el hígado y como en el intestino delgado (Johnson *et al.* 2016), luego atraviesan el epitelio y el endotelio gastrointestinal y se enlazan a los tioles de la proteína del plasma (Wu *et al.* 2009), para luego ser transportados

al hígado para formar el derivado de N α -acetil o ácido mercaptúrico, posteriormente estos son transportados al riñón y se excretan en la orina (Wu *et al.* 2009), tal como se ha podido evidenciar en las muestras de orina de los tratamientos T2 y T3.

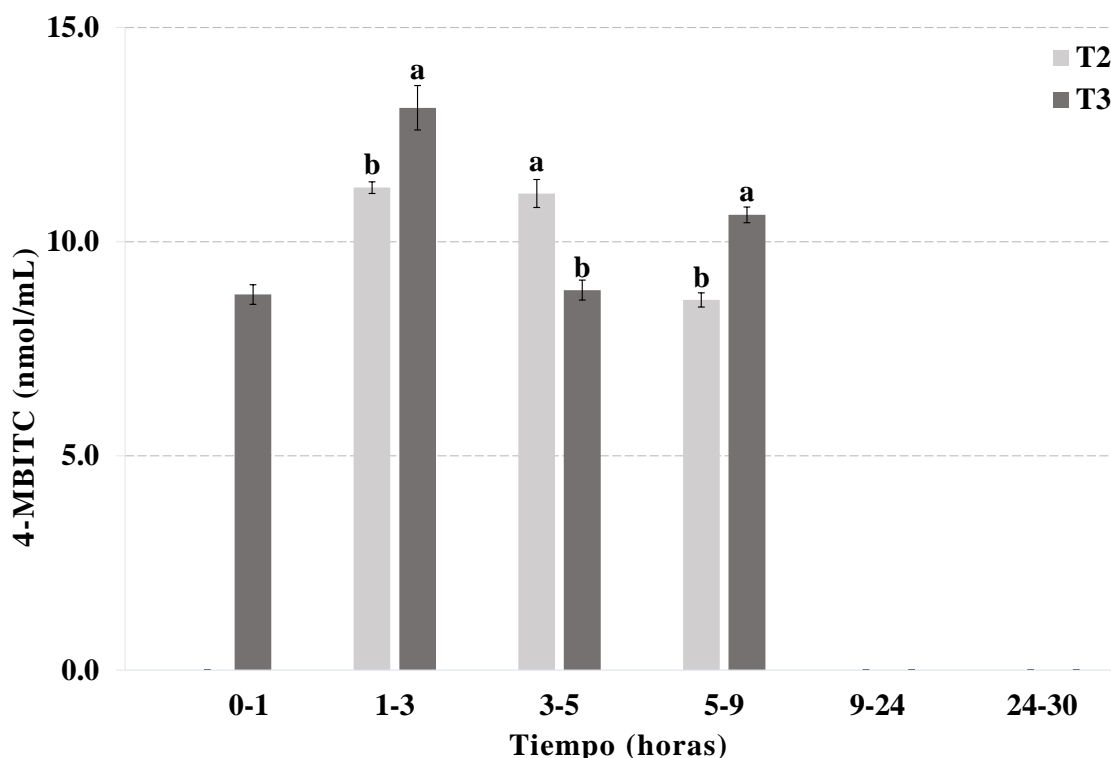


Figura 9: Contenido de 4-metoxibencil isotiocianato (nmol/mL) en muestras de orina de animales de experimentación recolectados a diferentes horas

Letras diferentes entre tratamientos para la misma hora indican diferencias significativas entre las medias según la prueba *t*-Student ($p < 0.05$).

El bajo contenido (nmoles) de 4-MBITC y 4-MBCHO en las muestras de orina podrían servir de evidencia que gran parte aún permanecen en el organismo para cumplir funciones como la actividad anticancerígena. Existen evidencias reportadas sobre la actividad anticancerígena en células de cáncer de próstata y mama del bencil isotiocianato (Xiao *et al.* 2008; Lin *et al.* 2013; Cho *et al.* 2016), isotiocianato similar al 4-MBITC. Por otro lado, el 4-hidroxibencil isotiocianato (HBITC), derivado de la glucosinalbina, glucosinolato presente en la mashua y que no fue detectado en las muestras biológicas, asumiendo que ha sido metabolizado por los animales de experimentación ha demostrado ser un donante de sulfuro de hidrógeno (H₂S) sobre la inhibición de la proliferación de células cancerígenas de neuroblastoma y glioblastoma humano (Jurkowska *et al.* 2018). Tanto el HBITC y el bencil isotiocianato han demostrado ser agentes donadores o liberadores de H₂S (Citi *et al.*, 2014),

los precursores de estos isotiocianatos son glucosinolatos que fueron consumidos por los animales de experimentación, y en el análisis de las muestras biológicas, tanto los precursores como los derivados no fueron detectados, asumiéndose que pasaron a cumplir una función biológica.

En resumen, acerca de los glucosinolatos y sus derivados se puede indicar que los glucosinolatos de la mashua como la GAU al no ser detectado en el plasma, ni en la orina podría haberse absorbido y transportado a la sangre dentro de la primera hora de dosificación o podría encontrarse en el hígado; sobre la GTR y GSN que no fueron detectados en ninguna de las muestras, podría explicarse por su alta conversión en el estómago en sus correspondientes nitrilos, o porque los glucosinolatos absorbidos están en una concentración demasiado bajas para ser detectadas.

4.4. POSIBLES EFECTOS BENÉFICOS DEL METABOLISMO DE LOS GLUCOSINOLATOS DE MASHUA

De los resultados obtenidos *in vivo* se observó que no hay presencia de GSN y sus derivados en las muestras biológicas analizadas indicando que la GSN es metabolizada. Por lo que el consumo de mashua, en base a la utilización de GSN tendría beneficios como agente bloqueador contra la carcinogénesis al inducir la actividad de la enzima marcadora de la fase II anticancerígena (quinona reductasa) (Tawfiq *et al.* 1995). El derivado de la GSN, el 4-hidroxbencil isotiocianato, ha evidenciado ser un inductor efectivo de genes antioxidantes/desintoxicantes y tienen el potencial de inhibir, al menos en el hígado de rata, la bioactivación de carcinógenos (La Marca *et al.* 2012). En cuanto al derivado de la GTR, bencil isotiocianato y el derivado de la GAU, el 4-metoxibencil isotiocianato han demostrado tener actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus albus* (Johns *et al.* 1982). Citi *et al.* (2014), reportaron que el HBITC y el BITC son agentes liberadores de H₂S, pero el HBITC mostró ser un agente más rápido de liberación de H₂S.

En la Figura 10 se ha propuesto un esquema sobre el metabolismo *in vivo* de los GLS de mashua, en base a los resultados obtenidos y lo señalado en la literatura para el metabolismo de GLS (Barba *et al.* 2016, Johnson *et al.* 2016, Wu *et al.* 2009, Angelino y Jeffery 2014). Después de la ingestión, los GLS pueden ser parcialmente absorbidos en el estómago. A diferencia de las crucíferas, en los tubérculos de mashua es poco probable que la mirosinasa

vegetal esté presente y actúe a nivel del intestino delgado para formar derivados de GLS (isotiocianatos (ITC), nitrilos, tiocianatos, glucosa, H₂S) y que pueden ser absorbidos o excretados en las heces u orina, pero han sido considerados en la Figura 10. Los GLS no hidrolizados transitarán hasta llegar al ciego y colon y pudieron ser hidrolizados por el *L. rhamnosus* GG que colonizó el sistema digestivo de los animales de experimentación o la flora intestinal nativa, con actividad enzimática tipo mirosinasa, los productos de descomposición podrían ser absorbidos o excretados, en este último caso confirmado en los resultados obtenidos en heces, con contenido de GAU hasta las 3 horas después de la dosificación de GLS. Una vez formados los ITC (derivados de los GLS) están sujetos a una respuesta metabólica en el hígado y en el enterocito (Johnson *et al.* 2016). Los ITC atraviesan por difusión pasiva el epitelio y el endotelio capilar gastrointestinal y se enlazan a los tioles para ser transportados al interior del enterocito y el hígado para formar el conjugado de ITC-cisteína y parte de los ITC (no conjugados) pueden regresar al lumen intestinal; por otro lado, los GLS que llegaron intactos al hígado regresarán mediante la bilis al lumen del tracto gastrointestinal para ser nuevamente hidrolizados (Angelino y Jeffery 2014). Los conjugados de ITC-cisteína formados se transportan al riñón y se forma el derivado de N α -acetil o ácido mercaptúrico (vía del ácido mercaptúrico) y luego serán excretado en la orina (Wu *et al.* 2009), en la presente investigación se encontró 4-metoxibencil isotiocianato, 4-metoxibenzaldehído y el glucosinolato, GAU en orina.

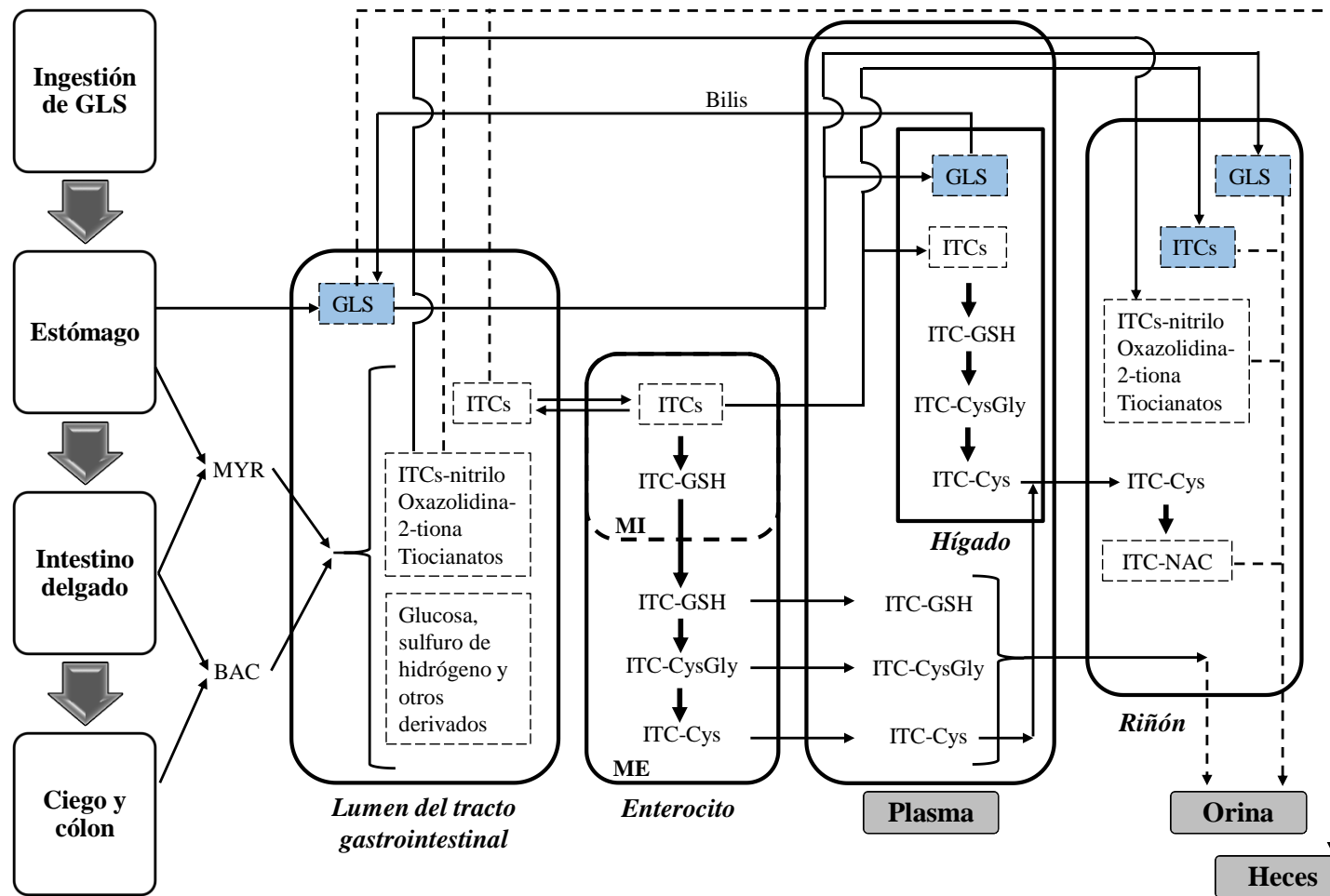


Figura 10: Ruta metabólica propuesta para los glucosinolatos de mashua

MYR, hidrólisis por enzima mirosinasa; BAC, hidrólisis bacteriana; GLS, glucosinolatos; ITCs, isotiocyanatos; ITC(-), conjugado; -GSH, glutatión; -CysGly, -cisteinil-glicina; -Cys, cisteína; -NAC, N-acetil cisteína (ácido mercaptúrico); MI, medio intracelular; ME, medio extracelular; (---), excreción.

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se pudo establecer las siguientes conclusiones:

- El contenido de glucosinolatos totales en las harinas de mashua sometidas a estrés abiótico fueron afectados significativamente, evidenciado por su disminución durante el tiempo de almacenamiento.
- La purificación de los glucosinolatos de las harinas de los tubérculos de mashua con polivinilpolipirrolidona (PVPP) permitió eliminar los compuestos fenólicos en el rango de 50-55 por ciento. El porcentaje de recuperación de glucosinolatos totales fue de 61 por ciento.
- La dosificación con *Lactobacillus rhamnosus* GG colonizó el tracto gastrointestinal a partir de los 20 días, evidenciado por un menor recuento en placa de medio no selectivo MRS-C respecto a los tratamientos sin dosificación de *Lactobacillus rhamnosus* GG.
- Los glucosinolatos de mashua son digeridos, absorbidos y metabolizados por los animales de experimentación, evidenciado por su bajo nivel de eliminación en heces (0.01-0.03 por ciento) y orina (0.60-0.62 por ciento).
- Con la adición de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG, se incrementó la producción de derivados de glucoabrietina, como son los isotiocianatos y aldehídos (4-metoxibencil isotiocianato y 4-metoxibenzaldehído, respectivamente) encontrados en muestras de orina.
- La adición de los glucosinolatos de mashua demuestra que el metabolismo animal puede producir metabolitos con potencial benéfico para los consumidores.

VI. RECOMENDACIONES

1. Emplear la prueba molecular PCR para identificar y cuantificar bacterias con capacidad de hidrolizar glucosinolatos y confirmar su colonización en el tracto gastrointestinal a través del análisis de heces.
2. Estudiar el metabolismo *in vivo* de los glucosinolatos de mashua hasta 72 horas, post dosis de glucosinolatos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agerbirk, N; Olsen, C. 2012. Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry* 77:16-45.
- Agnaniet, H; Mounzeo, H; Menut, C; Bessiere, JM; Criton, M. 2003. The essential oils of *Rinorea subintegrifolia* O. Ktze and *Drypetes gossweileri* S. Moore occurring in Gabon. *Flavour and Fragrance Journal* 18(3): 207-210.
- Aire, G; Charaja, R; De la Cruz, H; Guillermo, B; Gutarra, M; Huamaní, P; Jesús, G; Nicho, M; Ochoa, M; Pari, R. 2013. Efecto de *Tropaeolum tuberosum* frente a la hiperplasia prostática benigna inducida en ratas holtzman. *Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana* 18(1):1-13.
- Alander, M; Korpela, R; Saxelin, M; Vilpponen-Salmela, T; Mattila-Sandholm, T, von Wright, A. 1997. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Nutrition Today Supplement* 31(6):47S-48S.
- Angelino, D; Jeffery, E. 2014. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods* 7:67-76.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. *Official Methods of Analysis*. AOAC International. 16 Ed. Virginia. EE.UU.
- Arias Cortes, M. 2011. Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora subterranea*. Tesis Maestría. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 104p.

- Arumugam, A; Abdull Razis, A. 2018. Apoptosis as a mechanism of the cancer chemopreventive activity of glucosinolates: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 19(6):1439-1448.
- Aruquipa, R; Trigo, R; Bosque, H; Mercado, G; Condori, J. 2017. El isaño (*Tropaeolum tuberosum*) un cultivo de consumo y medicina tradicional en Huatacana para el beneficio de la población boliviana. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales* 3(2):146-151.
- Atwell, L; Beaver, L; Shannon, J; Williams, D; Dashwood, R; Ho, E. 2015. Epigenetic regulation by sulforaphane: opportunities for breast and Prostate Cancer Chemoprevention. *Current Pharmacology Reports* 1(2):102-111.
- Avato, P; Argentieri, MP. 2015. Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochemistry Reviews* 14(6):1019-1033.
- Barba, F; Nikmaram, N; Roohinejad, S; Khelifa, A; Zhu, Z; Koubaa, M. 2016. Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: impact of processing. *Frontiers in Nutrition* 3(art. 24):1-12.
- Beltrán, A; Mera, J. 2013. Elaboración del tubérculo mashua (*Tropaeolum tuberosum*) troceada en miel y determinación de la capacidad antioxidante. Tesis Ingeniería. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil. 149 p.
- Bheemreddy, RM; Jeffery, EH. 2007. The metabolic fate of purified glucoraphanin in F344 rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(8):2861-2866.
- Brekalo, J. 2015. Synthesis of glucosinolates: gluconasturtiin (2-phenylethyl glucosinolate) and glucomoringin analogue (4'-o-(α -D-Mannopyranosyl) Glucosinalbin). Tesis. Split, Croacia. Universidad de Split. 85 p.
- Brown, KK; Hampton, MB. 2011. Biological targets of isothiocyanates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810(9):888-894.

- Budnowski, J; Hanschen, F; Lehmann, C; Haack, M; Brigelius-Flohé, R; Kroh, L; Blaut, M; Rohn, S; Hanske, L. 2013. A derivatization method for the simultaneous detection of glucosinolates and isothiocyanates in biological samples. *Analytical Biochemistry* 441(2):199-207.
- Burel, C; Boujard, T; Escaffre, AM; Kaushik, SJ; Boeuf, G; Mol, KA; Van der Geyten, S; Kühn, ER. 2000. Dietary low-glucosinolate rapeseed meal affects thyroid status and nutrient utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *British Journal of Nutrition* 83:653-664.
- Burow, M; Bergner, A; Gershenzon, J; Wittstock, U. 2007. Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*—identification of the thiocyanate-forming protein. *Plant Molecular Biology* 63:49-61.
- Buskov, S; Hasselstrøm, J; Olsen, C; Sørensen, H; Sørensen, J; Sørensen, S. 2000. Supercritical fluid chromatography as a method of analysis for the determination of 4-hydroxybenzylglucosinolate degradation products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 43(1-3):157-174.
- Caballero-Gutiérrez, L; Gonzáles, GF. 2016. Alimentos con efecto antiinflamatorio. *Acta Médica Peruana* 33(1):50-64.
- Campos Cruz, C. 2011. Optimización de la extracción de glucosinolatos a partir de harina de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón). Tesis Químico Farmacéutico. Arequipa, Perú. Universidad Católica de Santa María. 107p.
- Campos, D; Aguilar, A; García, D; Chirinos, R; Limaymanta, E; Pedreschi, R. 2019. Postharvest storage and cooking techniques affect the stability of glucosinolates and myrosinase activity of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum*). *International Journal of Food Science and Technology* doi:10.1111/ijfs.14150
- Castro, R; Forero, O; Guzmán, L; Laurie, V; Valdés, O; Ávila, F; López, X; Santos, L. 2016. New polymer for removal of wine phenolics: Poly(N-(3-(N-isobutyrylisobutyramido)-3-oxopropyl) acrylamide) (P-NIOA). *Food Chemistry* 213:554-560.

- Chen, L; Li, H; Chen, Y; Yang, Y. 2020. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces mortality of septic mice by modulating gut microbiota composition and metabolic profiles. *Nutrition* 78:1-17.
- Cheng, D; Hashimoto, K; Uda, Y. 2004. *In vitro* digestion of sinigrin and glucotropaeolin by single strains of *Bifidobacterium* and identification of the digestive products. *Food and Chemical Toxicology* 42(3):351-357.
- Chirinos, R; Campos, D; Arbizu, C; Rogez, H; Rees, JF; Larondelle, Y; Noratto, G; Cisneros-Zevallos, L. 2007. Effect of genotype, maturity stage and post-harvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity, of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:437-446.
- Chirinos, R; Campos, D; Betalleluz, I; Giusti, M; Schwartz, S; 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(19):7089-7097.
- Cho, HJ; Lim, DY; Kwon, GT; Kim, JH; Huang, Z; Song, H; Oh, YS; Kang, YH; Lee, KW; Dong, Z; Park, J. 2016. Benzyl isothiocyanate inhibits prostate cancer development in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model, which is associated with the induction of cell cycle G1 arrest. *International Journal of Molecular Sciences* 17(2):1-13.
- Citi, V; Martelli, A; Testai, L; Marino, A; Breschi, M; Calderone, V. 2014. Hydrogen Sulfide Releasing Capacity of Natural Isothiocyanates: Is It a Reliable Explanation for the Multiple Biological Effects of Brassicaceae?. *Planta medica* 80(08/09):610-613.
- Clarke, D. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food. *Analytical Methods* 2:310-325.

- Cohen J; Kristal, A; Standford, J. 2000. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 92(1):61-68.
- Collett, M; Stegelmeier, B; Tapper, B. 2014. Could nitrile derivatives of turnip (*Brassica rapa*) glucosinolates be hepato- or cholangiotoxic in cattle?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(30):7370-7375.
- Córdova, C. 2012. Evaluación del efecto del secado a dos temperaturas en el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante de la mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón). Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 125 p.
- De Man, JC; Rogosa, M; Sharpe, ME. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23(1):130-135.
- De Nicola, G; Montaut, S; Rollin, P; Nyegue, M; Menut, C; Iori, R; Tatibouët, A. 2013. Stability of benzylic-type isothiocyanates in hydrodistillation-mimicking conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(1):137-142.
- Dinkova-Kostova, AT; Kostov, RV. 2012. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 18(6):337-347.
- Dufour, V; Stahl, M; Baysse, C. 2015. The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology* 161 pt. 2:229-243.
- Durán, E; López, X; Castro, R; Avila, F; González, F; Laurie, V; Santos, L. 2015. Experimental and theoretical binding affinity between polyvinylpyrrolidone and selected phenolic compounds from food matrices. *Food Chemistry* 168:464-470.
- Ekanayake, A; Kester, JJ; Li, JJ; Zehentbauer, G; Bunke, P; Zent, J. 2006. IsoGard™: A natural anti-microbial agent derived from white mustard seed. *Acta Horticulturae* 709:101-108.

- Esparza, E; Yi, W; Limonchi, F; Cosio, E. 2020. Glucosinolate catabolism during postharvest drying determines the ratio of bioactive macramides to deaminated benzenoids in *Lepidium meyenii* (maca) root flour. *Phytochemistry* 179:1-10.
- Espino Stuard, L. 2006. Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales en canales bovinas mediante el método de hisopado en un camal de Lima Metropolitana. Tesis Médico Veterinario. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 61p.
- Fahey, J; Wehage, S; Holtzclaw, W; Kensler, T; Egner, P; Shapiro, T; Talalay, P. 2012. Protection of humans by plant glucosinolates: efficiency of conversion of glucosinolates to isothiocyanates by the gastrointestinal microflora. *American Association for Cancer Research* 5(4):603-611.
- Fahey, J; Zalcmann, A; Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56(1):5-51.
- Fimognari, C; Hrelia, P. 2007. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research* 635(2-3):90-104.
- Fuentes Enríquez de Salamanca, S. 2005. Microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. Effects of probiotics in health and disease. Tesis Doctorado. España. Universidad de Granada. 199p.
- Fuentes, FM; Mendoza, RA; Rosales, AL; Cisneros, RA. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. 1 ed. Lima, Perú. Instituto Nacional de Salud (INS), Ministerio de Salud. 52p.
- Gamet-Payrastre, L; Li, P; Lumeau, S; Cassar, G; Dupont, M-A; Chevolleau, S; Gase, N; Tulliez, J; Tercé, F. 2000. Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research* 60:1426-1433.

- Gil, M; Louazil, P; Iturmendi, N; Moine, V; Cheynier, V; Saucier, C. 2019. Effect of polyvinylpolypyrrolidone treatment on rosés wines during fermentation: Impact on color, polyphenols and thiol aromas. *Food Chemistry* 295:493-498.
- 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.
- Gründemann, C; Huber, R. 2018. Chemoprevention with isothiocyanates - from bench to bedside. *Cancer Letters* 414:26-33.
- Hahm, ER; Singh, S. 2010. Sulforaphane inhibits constitutive and interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription 3 in prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research* 3(4):484-494.
- Han, N; Mo Ku, K; Kim, J. 2019. Postharvest variation of major glucosinolate and their hydrolytic products in *Brassicoraphanus* 'BB1'. *Postharvest Biology and Technology* 154:70-78.
- Hanschen, F; Schreiner, M. 2017. Isothiocyanates, nitriles, and epithionitriles from glucosinolates are affected by genotype and developmental stage in *Brassica oleracea* varieties. *Frontiers in Plant Science* 8(1095):17p.
- Hartemink, R; Domenech, VR; Rombouts, FM. 1997. LAMVAB - A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods* 29(2):77-84.
- Hartemink, R; Rombouts, FM. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 36(3):181-192.
- Hill, GD. 2003. Plant antinutritional factors: Characteristics. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition) 4578:4587.

- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2017. Reporte (en línea). Consultado 30 ene. 2020. Disponible en <http://www.itis.gov>
- Jezek, J; Haggett, B; Atkinson, A; Rawson, D. 1999. Determination of glucosinolates using their alkaline degradation and reaction with ferricyanide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(11):4669-4674.
- Johns, T; Kitts, W; Newsome, F; Towers, G. 1982. Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *Journal of Ethnopharmacology* 5(2):149-161.
- Johnson, TL; Dinkova-Kostova, AT; Fahey, JW. 2016. Glucosinolates from the Brassica Vegetables and their health effects. *Encyclopedia of Food and Health*. p. 248-255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00354-8>
- Jurkowska, H; Wróbel, M; Szlęzak, D, Jasek-Gajda, E. 2018. New aspects of antiproliferative activity of 4-hydroxybenzyl isothiocyanate, a natural H₂S-donor. *Amino Acids* 50(6):699-709.
- Kala, C; Ali, SS; Ahmad, N; Gilani, SJ; Ali Khan, N. 2018. Isothiocyanates: a review. *Research Journal of Pharmacognosy* 5(2):71-89.
- KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). 2020. Reporte (en línea). Consultado 9 abr. 2020. Disponible en <https://www.genome.jp/kegg/>
- Khamis, I; Heikkila, JJ. 2018. Effect of isothiocyanates, BITC and PEITC, on stress protein accumulation, protein aggregation and aggresome-like structure formation in *Xenopus* A6 kidney epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 204:1-13.
- Kjaer, A; Gmelin, R; Jensen RB. 1956. Isothiocyanates XV. p-methoxybenzyl isothiocyanate, a new natural mustard oil occurring as glucoside (Glucoaubrietin) in *Aubrietia* species. *Acta Chemica Scandinavica* 10(1):26-31.

- La Marca, M; Beffy, P; Della Croce, C; Gervasi, P; Iori, R; Puccinelli, E; Longo, V. 2012. Structural influence of isothiocyanates on expression of cytochrome P450, phase II enzymes, and activation of Nrf2 in primary rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 50(8):2822-2830.
- Leiva-Revilla, J; Cárdenas-Valencia, I; Rubio, J; Guerra-Castañón, F; Olcese-Mori, P; Gasco, M; Gonzales, GF. 2012. Evaluation of different doses of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) on the reduction of sperm production, motility and morphology in adult male rats. *Andrology* 44(s1):205-212.
- Lewinska, A; Adamczyk-Grochala, J; Deregowska, A; Wnuk, M. 2017. Sulforaphane-Induced cell cycle arrest and senescence are accompanied by DNA hypomethylation and changes in microRNA profile in breast cancer cells. *Theranostics* 7(14):3461-3477.
- Li, F; Hullar, M; Beresford, S; Lampe, J. 2011. Variation of glucoraphanin metabolism *in vivo* and *ex vivo* by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition* 106(3):408-416.
- Lin, JF; Tsai, TF; Liao, PC; Lin, YH; Lin, YC; Chen, HE; Chou, KY; Hwang, T. 2013. Benzyl isothiocyanate induces protective autophagy in human prostate cancer cells via inhibition of mTOR signaling. *Carcinogenesis* 34(2):406-414.
- Liu, Y; Dey, M. 2017. Dietary phenethyl isothiocyanate protects mice from colitis associated colon cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 18(9):1-11.
- Magalhães, P; Vieira, J; Gonçalves, L; Pacheco, J; Guido, L; Barros, A. 2010. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(19):3258-3268.
- Manrique I; Arbizu, C; Vivanco, F; Gonzales, R; Ramírez, C; Chávez, O; Tay, D; Ellis, D. 2013. *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav: Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). 1 ed. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa. 122p.

- Martín de Civetta, MT; Civetta, JD. 2011. Carcinogénesis. *Salud Pública de México* 53(5):405-414.
- Martín, JC; Higuera, BL. 2016. Glucosinolate composition of Colombian accessions of mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón), structural elucidation of the predominant glucosinolate and assessment of its antifungal activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(14):11p. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7689>
- Martínez, G; Artés, F; Gómez, P. 2013. Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *Journal of Functional Foods* 5(1):133-143.
- Menéndez López, A. 2013. Validación y cálculo de incertidumbre para la determinación de microorganismos indicadores, mediante microbiología clásica y NMP automatizado, en matrices cárnicas. Tesis Máster en Biotecnología del Medioambiente y la Salud. Oviedo, España. Universidad de Oviedo. 40p.
- Natella, F; Maldini, M; Leoni, G; Scaccini, C. 2014. Glucosinolates redox activities: Can they act as antioxidants?. *Food Chemistry* 149:226-232.
- Novío, S; Núñez-Iglesias, MJ; Freire-Garabal, M. 2019. Isothiocyanates, epigenetics, and cancer prevention. *Epigenetics of Cancer Prevention* 8:149-168.
- Ortega, O; Kliebensteis, D; Arbizu, C; Ortega, R; Quiros, C. 2006. Glucosinolate survey of cultivated and feral mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) in the cuzco región of Peru. *Economic Botany* 60(3):254-264.
- Paulsen, E; Barrios, S; Baenas, N; Moreno, D; Heinzen, H; Lema, P. 2018. Effect of temperature on glucosinolate content and shelf life of ready-to-eat broccoli florets packaged in passive modified atmosphere. *Postharvest Biology and Technology* 138:125-133.

- Pérez, M; Armenteros, M; Vega, E. 2014. Evaluación de la colonización del tracto digestivo de cerdos por cepas de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*, componentes de un producto probiótico. *Revista de Salud Animal* 36(3):141-146.
- Plaza Díaz, J. 2014. Colonización, seguridad y tolerancia de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 en adultos sanos y sus efectos sobre el metabolismo y sistema inmunitario en ratas Zucker. Tesis Doctoral. España. Universidad de Granada. 261p.
- Prieto, MA; Jiménez, C; Simal-Gandara, J. 2019. Chapter Six - Glucosinolates: molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Advances in Food and Nutrition Research* 90:305-350.
- Quartieri, A; Simone, M; Gozzoli, C; Popovic, M; D'Auria, G; Amaretti, A; Raimondi, S; Rossi, M. 2016. Comparison of culture-dependent and independent approaches to characterize fecal bifidobacteria and lactobacilli. *Anaerobe* 38:130-137.
- Rampal, G; Thind, TS; Arora, R; Vig, AP; Arora, S. 2017. Synergistic antimutagenic effect of isothiocyanates against varied mutagens. *Food and Chemical Toxicology* 109 pt. 2:879-887.
- Recio, R; Vengut-Climent, E; Borrego, LG; Khiar, N; Fernández, I. 2017. Chapter 6- Biologically active isothiocyanates: protecting plants and healing humans. 53 cap. 6:167-242.
- Reyes, M; Gómez-Sánchez, I; Espinoza, C. 2017. Tablas peruanas de composición de alimentos. 10ma ed. Lima, Perú. Instituto Nacional de Salud (INS), Ministerio de Salud. 142p.
- Rinaldi, E; Consonni, A; Cordiglieri, C; Sacco, G; Crasà, C; Fontana, A; Morelli, L; Elli, M; Mantegazza, R; Baggi, F. 2019. Therapeutic effect of bifidobacterium administration on experimental autoimmune myasthenia gravis in Lewis rats. *Frontiers in Immunology* 10 art. 2949:1-17.

- Roberts, D; Greenwood, M. 2003. Practical food microbiology. 3ra ed. Inglaterra. Cap. 5. p.105-129. <https://doi.org/10.1002/9780470757512.ch5>
- Rybarczyk-Plonska, A; Fiskaa, S; Borge, G; Bengtsson, G; Hansen, M; Wold, AB. 2016. Glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) as affected by postharvest temperature and radiation treatments. *Postharvest Biology and Technology* 116:16-25.
- Saladino, F; Bordin, K; Manyes, L; Luciano, F; Mañes, J; Fernández-Franzón, M; Meca, G. 2016. Reduction of the aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in Italian piadina by isothiocyanates. *LWT - Food Science and Technology* 70:302-308.
- Santamaría, J; Rodas, E; Casimiro, M; Paredes, J; Mendieta, J; Sihuas, A. 2020. Boletín estadístico mensual (mes diciembre de 2019): “El agro en cifras”. Lima, Perú. Dirección General de Seguimiento y Evaluación de Políticas (DGESEP), Dirección de Estadística Agraria (DEA), Ministerio de Agricultura y Riego. 166p.
- Santayana, M. 2018. Efecto del estrés abiótico post-cosecha en la síntesis de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum*). Tesis Maestría. Lima, Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. 71p.
- Sharma, A; Sharma, A; Yadav, P; Singh, D. 2016. Isothiocyanates in brassica: potential anti-cancer agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 17(9):4507-4510.
- SIEA (Sistema Integrado de Estadística Agraria). 2018. Superficie sembrada mensual de Mashua, según región. Campaña agrícola: 2017-18 (hectáreas) (en línea). Consultado 18 abr. 2020. Disponible en <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=noticias/anuario-de-produccion-agricola-2018>
- Sørensen, J; Frandsen, H; Jensen, S; Kristensen, N; Sørensen, S; Sørensen, H. 2016. Bioavailability and *in vivo* metabolism of intact glucosinolates. *Journal of Functional Foods* 24:450-460.

- Sun, J; Charron, CS; Novotny, JA; Peng, B; Yu, L; Chen, P. 2019. Glucosinolate metabolites in human urine and plasma after broccoli consumption using non-targeted and targeted metabolomic analyses. *Food Chemistry* 309:1-28.
- Suquilanda Valdivieso, Manuel B. s.f. Manual técnico: Producción orgánica de cultivos andinos (en línea). Consultado 09 feb. 2020. Disponible en http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/mountain_partnership/docs/1_produccion_organica_de_cultivos_andinos.pdf
- Tang, NY; Chueh, FS; Yu, CC; Liao, CL; Lin, JJ; Hsia, TC; Wu, KC; Liu, HC; Lu, KW; Chung, JG. 2016. Benzyl isothiocyanate alters the gene expression with cell cycle regulation and cell death in human brain glioblastoma GBM 8401 cells. *Oncology Reports* 35(4):2089-2096.
- Tapia, ME; Fries, AM. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. 1 ed. Lima, Perú. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú (ANPE-PERÚ). p. 51, 52.
- Tawfiq, N; Heaney, R; Plumb, J; Fenwick, G; Musk, S; Williamson, G. 1995. Dietary glucosinolates as blocking agents against carcinogenesis: glucosinolate breakdown products assessed by induction of quinone reductase activity in murine hepatic cells. *Carcinogenesis* 16(5):1191-1194.
- Tripathi, M; Mishra, A. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* 132(1-2):1-27.
- Valle-Mendiola, A; Weiss Steider, B. 2003. Origen molecular del cáncer. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud* 6(1):3-8.
- Velarde, D; Ríos, LI. 2009. Acciones promisorias: banco de germoplasma de la SUDIRGEB-INIA. 1 ed. Lima, Perú. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA). p. 45, 46.

- Vera, A; Rigobello, V; Demarigny, Y. 2009. Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli. *Food Microbiology* 26(7):728-733.
- Verkerk, R; Matthijs, D; Jongen, WMF. 2001. Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of *Brassica* vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91(9):953-958.
- Verkerk, R; Schreiner, M; Krumbein, A; Ciska, E; Holst, B; Rowland, I; de Schrijver, R; Hansen, M; Gerhäuser, C; Mithen, R; Dekker, M. 2009. Glucosinolates in *Brassica* vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Molecular Nutrition & Food Research* 53(2):S219.
- Vig, AP; Rampal, G; Thind, TS; Arora, S. 2009. Bio-protective effects of glucosinolates -A review 42(10):1561-1572.
- Villatoro Pulido, M. 2011. Caracterización nutricional y agronómica, análisis de la actividad biológica y selección de crucíferas para uso alimentario. Tesis Doctoral. Córdoba, España, Universidad de Córdoba. 235p.
- Wang, B; Li, J; Li, Q; Zhang, H; Li, N. 2009. Isolation of adhesive strains and evaluation of the colonization and immune response by *Lactobacillus plantarum* L2 in the rat gastrointestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* 132(1):59-66.
- Wittstock, U; Halkier, B. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *TRENDS in Plant Science* 7(6):263-270.
- Wu, X; Zhou, QH; Xu, K. 2009. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacologica Sinica* 30:501-512.
- Xiao, D; Powolny, A; Singh, S. 2008. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* 283(44):30151-30163.

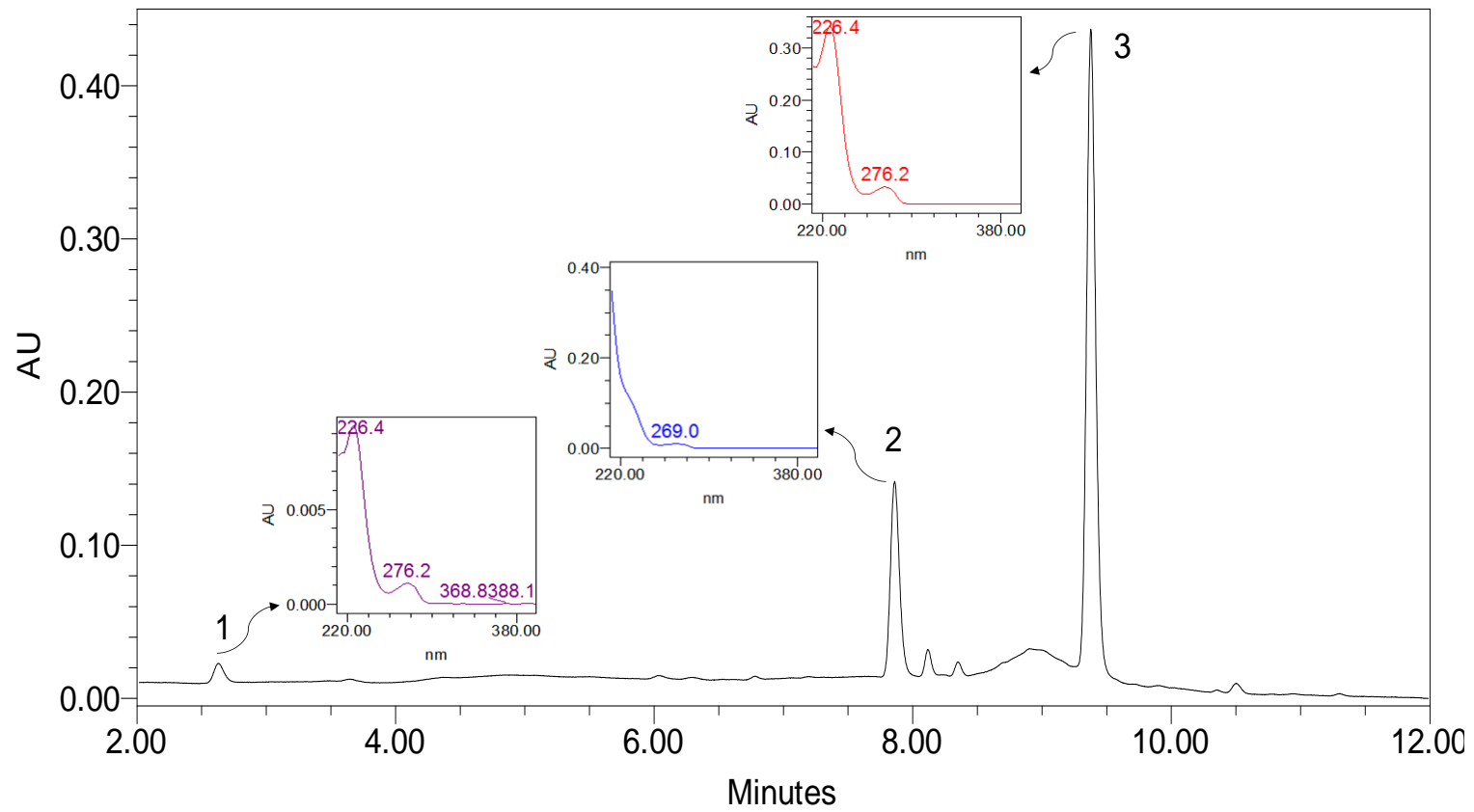
Yábar, E; Pedreschi, R; Chirinos, R; Campos, D. 2011. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. Food Chemistry 127(4):1576-1583.

Yang, SC; Chen, JY; Shang, HF; Cheng, TY; Tsou, SC; Chen, JR. 2005. Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats. World journal of gastroenterology, 11(47), 7413–7417.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Cromatograma de los glucosinolatos obtenido por UPLC®-PDA (229nm) de harina de mashua almacenada a diferentes tiempos

Pico 1: Glucosinalbina, Pico 2: Glucotropaeolina y Pico 3: Glucoaubrietina



Anexo 2: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucosinolatos totales en harina de mashua

Análisis de varianza (ANVA) por tiempo de almacenamiento (Días)

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Días	6	1024.61	170.769	651.63	0.000
Error	14	3.67	0.262		
Total	20	1028.28			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba de Tukey para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	3	26.6359	X
2	3	23.2860	X
4	3	21.6095	X
8	3	20.3940	X
10	3	15.9345	X
6	3	14.8685	X
12	3	3.6402	X

Anexo 3: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucosinalbina en harina de mashua

Análisis de varianza (ANVA) por tiempo de almacenamiento (Días)

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Días	6	0.038842	0.006474	325.38	0.000
Error	14	0.000279	0.000020		
Total	20	0.039121			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba de Tukey para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	3	0.116550	X
2	3	0.079252	X
4	3	0.025311	X
8	3	0.010610	X
12	3	0.000000	X
6	3	0.000000	X
10	3	0.000000	X

Anexo 4: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucotropaeolina en harina de mashua

Análisis de varianza (ANVA) por tiempo de almacenamiento (Días)

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Días	6	44.551	7.4251	32.71	0.000
Error	14	3.178	0.2270		
Total	20	47.729			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba de Tukey para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	3	7.00360	X
6	3	6.12193	XX
2	3	5.95870	XX
8	3	5.76208	XX
10	3	5.34989	X
4	3	4.97414	X
12	3	2.05675	X

Anexo 5: Análisis estadístico para el contenido promedio de Glucoaubrietina en harina de mashua

Análisis de varianza (ANVA) por tiempo de almacenamiento (Días)

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Días	6	689.403	114.901	173.59	0.000
Error	14	9.267	0.662		
Total	20	698.670			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba de Tukey para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
0	3	19.5157	X
2	3	17.2481	XX
4	3	16.6100	XX
8	3	14.6213	X
10	3	10.5846	X
6	3	8.7465	X
12	3	1.5835	X

Anexo 6: Análisis estadístico para el recuento total de bacterias de *Lactobacillus* anaeróbicos y bacterias lácticas anaeróbicas en heces provenientes de animales de experimentación

Análisis de varianza (ANVA) por días, medios y tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Días	3	0.09037	0.03012	6.76	0.004
Medios	1	4.28415	4.28415	960.81	0.000
Tratamientos	2	0.16608	0.08304	18.62	0.000
Medios*Tratamientos	2	0.04193	0.02096	4.70	0.026
Error	15	0.06688	0.00446		
Total	23	4.64940			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba de Tukey para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

<i>Dosificación (Días)</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0	6	8.75167	X
10	6	8.75833	X
20	6	8.68333	XX
30	6	8.60667	X

<i>Medios</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MRS-C	12	9.1225	X
MRS-C-VB-V	12	8.2775	X

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T1	8	8.72250	X
T2	8	8.78875	X
T3	8	8.58875	X

<i>Medios x Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
MRS-C x T1	4	9.1800	X
MRS-C x T2	4	9.1525	X
MRS-C x T3	4	9.0350	X
MRS-C-VB-V x T2	4	8.4250	X
MRS-C-VB-V x T1	4	8.2650	X
MRS-C-VB-V x T3	4	8.1425	X

Anexo 7: Registro de los pesos vivos de los animales experimentales (día 31)

Repetición	Peso vivo (g)		
	T1	T2	T3
1	302.0	308.9	284.9
2	291.4	308.8	308.3
3	292.8	300.5	314.7
4	291.0	296.5	311.6
5	293.2	320.2	289.3
6	307.8	303.7	288.9
7	294.0	255.7	299.8
8	284.4	294.7	291.7
9	283.2	292.9	291.7
10	297.2	290.8	285.2
11	315.9	292.0	294.0
12	306.5	280.0	285.7
13	285.7	315.1	245.8
14	301.4	281.6	299.4
15	271.8	279.1	309.2
16	294.0	308.0	305.0
17	302.0	280.0	270.0
18	288.0	296.0	304.0

T1: BAL- y GLS-, T2: BAL- y GLS+, T3: BAL+ y GLS+

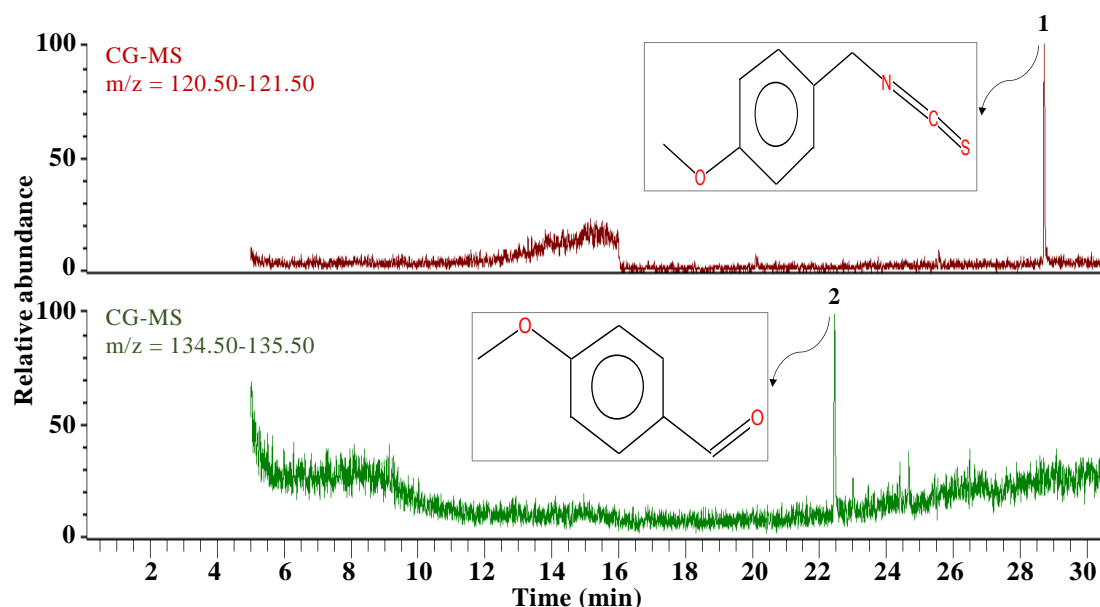
Anexo 8: Cantidad de heces y orina obtenidos por cada tratamiento y los tiempos evaluados

Tratamiento	Lapso de recolección (horas)	Heces		Orina (mL)
		Peso (g)	Materia seca (%)	
T1	0-1	6.32	39.8	6.0
	1-3	3.40	44.1	4.9
	3-5	1.69	48.9	4.8
	5-9	3.78	73.8	4.0
	9-24	5.78	36.0	52.0
	24-30	6.37	52.7	9.0
T2	0-1	5.29	43.3	4.7
	1-3	1.23	54.1	6.4
	3-5	1.50	55.1	3.4
	5-9	4.72	70.4	7.0
	9-24	10.47	38.7	45.0
	24-30	3.51	37.7	9.4
T3	0-1	4.45	44.5	3.9
	1-3	1.81	51.6	8.4
	3-5	0.84	70.4	2.5
	5-9	3.20	68.6	4.0
	9-24	6.47	47.6	47.2
	24-30	1.01	57.4	3.8

T1: BAL- y GLS-, T2: BAL- y GLS+, T3: BAL+ y GLS+. n=3 para cada hora.

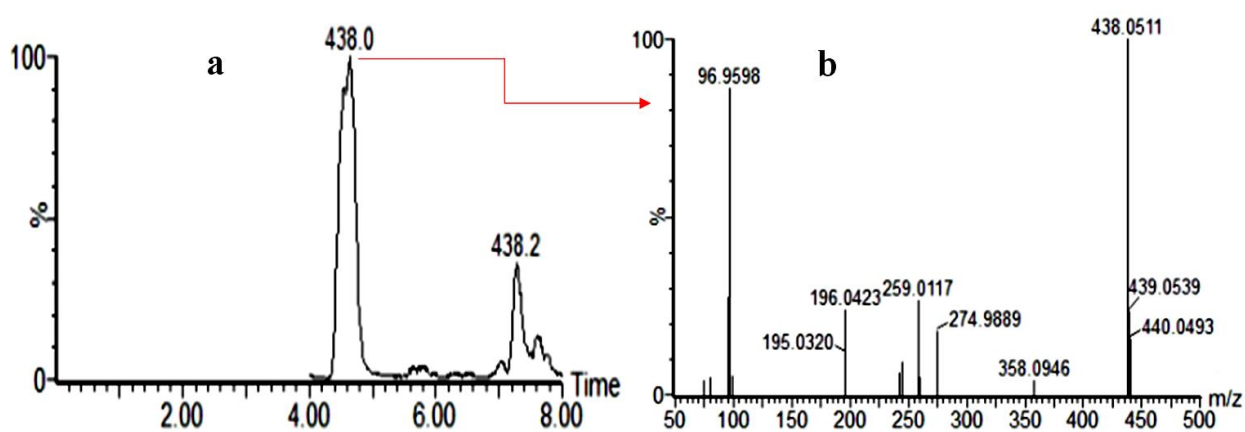
Anexo 9: Cromatogramas obtenidos por CG-MS de los derivados de la hidrólisis del 4-metoxibencil glucosinato (glucoaubrietina) de muestras de sangre, orina y heces de animales experimentales

Pico 1: 4-metoxibencil isotiocianato, Pico 2: 4-metoxibenzaldehído



Anexo 10: Cromatograma obtenido por UPLC-qTOF-MS-MS del 4-metoxibencil glucosinato (glucoaubrietina) extraído de las muestras de orina de los animales de experimentación

a) Cromatograma del pico del ion base (BPI, por sus siglas en ingles base peak ion). b) Espectro de masa del 4-metoxibencil glucosinato (glucoaubrietina)



Anexo 11: Análisis estadístico para contenido de Glucoabrietina a 1 hora de recolección en muestras de heces

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	58.4626	58.4626	2464.49	0.000
Error	3	0.0949	0.0237		
Total	4	58.5575			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias y nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	2	2.0010	X
T3	3	8.244	X

Anexo 12: Análisis estadístico para contenido de Glucoabrietina a 1 hora de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	198.789	198.789	736.44	0.000
Error	4	1.080	0.270		
Total	5	199.869			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	11.204	X
T3	3	22.716	X

Anexo 13: Análisis estadístico para contenido de Glucoalbúmina a las 3 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	71.760	71.7604	250.68	0.000
Error	4	1.145	0.2863		
Total	5	72.905			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	22.280	X
T3	3	15.363	X

Anexo 14: Análisis estadístico para contenido de Glucoalbúmina a las 5 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	44.3904	44.3904	1165.61	0.000
Error	4	0.1523	0.0381		
Total	5	44.5427			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	9.787	X
T3	3	4.347	X

Anexo 15: Análisis estadístico para contenido de Glucoalbúmina a las 9 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	2.4448	2.44482	94.33	0.001
Error	4	0.1037	0.02592		
Total	5	2.5485			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	5.230	X
T3	3	6.507	X

Anexo 16: Análisis estadístico para contenido de Glucoabrietina a las 30 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	0.026800	0.026800	121.09	0.000
Error	4	0.000885	0.000221		
Total	5	0.027686			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	0.3753	X
T3	3	0.2417	X

Anexo 17: Análisis estadístico para contenido de Glucoabrietina a las 24 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	0.256680	0.25668	186.05	0.000
Error	4	0.005519	0.00138		
Total	5	0.262199			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	1.2190	X
T3	3	1.6327	X

Anexo 18: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibencil isotiocianato a las 3 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	5.2173	5.2173	36.26	0.004
Error	4	0.5755	0.1439		
Total	5	5.7929			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias y nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	11.262	X
T3	3	13.127	X

Anexo 19: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibencil isotiocianato a las 5 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	7.6320	7.63205	94.48	0.001
Error	4	0.3231	0.08078		
Total	5	7.9552			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	11.126	X
T3	3	8.871	X

Anexo 20: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibencil isotiocianato a las 9 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	5.9004	5.90042	194.84	0.000
Error	4	0.1211	0.03028		
Total	5	6.0216			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	8.643	X
T3	3	10.627	X

Anexo 21: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibenzaldehído a las 5 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	6.48752	6.48752	343.65	0.000
Error	4	0.07551	0.01888		
Total	5	6.56303			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	8.091	X
T3	3	10.171	X

Anexo 22: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibenzaldehido a las 9 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	26.3761	26.3761	795.26	0.000
Error	4	0.1327	0.0332		
Total	5	26.5087			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	7.9067	X
T3	3	12.100	X

Anexo 23: Análisis estadístico para contenido de 4-Metoxibenzaldehido a las 24 horas de recolección en muestras de orina

Análisis de varianza (ANVA) por tratamientos

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados Ajustados	Cuadrados Medios Ajustados	Valor-F	Valor-p
Tratamientos	1	6.0499	6.04990	62.89	0.001
Error	4	0.3848	0.09620		
Total	5	6.4347			

Prueba de múltiples rangos usando la prueba *t*-Student para comparación de medias, nivel de confianza del 95%

Tratamiento	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T2	3	7.727	X
T3	3	9.736	X