

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**



**“EVOLUCIÓN DE GLUCOSINOLATOS, COMPUESTOS FENÓLICOS  
Y  $\beta$ -SITOSTEROL EN TRES ECOTIPOS DE MACA (*Lepidium meyenii*  
Walp.) DURANTE LA PRE Y POST-COSECHA”**

**Presentada por:**

**EMILIO FREDY YÁBAR VILLANUEVA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE *DOCTORIS PHILOSOPHIAE***

**EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**

**Lima – Perú**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**

**“EVOLUCIÓN DE GLUCOSINOLATOS, COMPUESTOS FENÓLICOS  
Y  $\beta$ -SITOSTEROL EN TRES ECOTIPOS DE MACA (*Lepidium meyenii*  
Walp.) DURANTE LA PRE Y POST-COSECHA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE**

***Doctoris Philosophiae (Ph. D.)***

**Presentada por:**

**EMILIO FREDY YÁBAR VILLANUEVA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Dra. Doris Zúñiga Dávila  
**PRESIDENTE**

Dr. David Campos Gutiérrez  
**PATROCINADOR**

Ph.D. William Roca Pizzini  
**MIEMBRO**

Ph.D. Gretty Villena Chávez  
**MIEMBRO**

Dra. Lena Gálvez Ranilla  
**MIEMBRO EXTERNO**

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi madre y padre.

Siempre los recuerdo.

A mi familia

A mi esposa Vilma por compartir mi vida

A mis hijos Fredy Enrique y Jesús Noel, para mí fue un gran reto, para ustedes sólo un ejemplo.

A la memoria de mi maestro Ph. D. Marcel Gutiérrez Correa, de quien aprendí lo maravilloso de la Biología y la Biotecnología Molecular.

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. David Campos Gutiérrez, por su invaluable apoyo en la realización de la Tesis Doctoral, su ejemplo de dedicación a la investigación.

Al Ph.D. Marcel Gutiérrez Correa por sus enseñanzas de genómica, evolución dirigida, bioeconomía, biodiversidad, transgénesis y un mundo por descubrir.

A la Dra. Rosana Chirinos Gallardo, por su apoyo en la comprensión y la importancia que tienen los compuestos fenólicos en los alimentos andinos.

A la Dra. Ana Aguilar Gálvez, siempre incentivándome a culminar lo iniciado y por su gran ejemplo de sencillez.

A los productores de maca de la meseta de Bombón, que sigan contribuyendo en la preservación de nuestra cultura alimentaria.

A la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional del Centro el Perú que me dio la oportunidad de formarme profesionalmente y a mi alma mater la Universidad Nacional Agraria La Molina por enseñarme el significado de identidad.

A mis colegas, amigos que me dan grandes lecciones de convivencia humana.

Y a todas las personas que de alguna manera contribuyeron al desarrollo de la Tesis Doctoral.

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>I</b>	
<b>CAPÍTULO I.</b> Introducción general.....	1
1.1 Importancia nutricional, funcional y económica de la maca ( <i>Lepidium meyenii</i> Walp).....	1
1.2 Glucosinolatos.....	4
1.2.1 Biosíntesis y degradación de glucosinolatos.....	4
1.2.2 Los glucosinolatos y beneficios en la salud.....	7
1.3 Compuestos fenólicos.....	9
1.3.1 Biosíntesis y degradación de compuestos fenólicos.....	10
1.3.2 Los compuestos fenólicos y beneficios en la salud.....	12
1.4 Fitosteroles.....	13
1.4.1 Biosíntesis y degradación de fitosteroles.....	13
1.4.2 Los fitosteroles y beneficios en la salud.....	16
1.5 Objetivos.....	17
1.5.1 Objetivo general.....	17
1.5.2 Objetivos específicos.....	17
1.6 Referencias Bibliográficas.....	17
<b>II</b>	
<b>CAPÍTULO II.</b> Evolución del contenido de glucosinolatos y actividad mirosinasa en tres ecotipos de maca ( <i>Lepidium meyenii</i> Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	22
Resumen.....	22
Abstract.....	23
2.1 Introducción.....	23
2.2 Materiales y Métodos.....	25
2.2.1 Material vegetal.....	25
2.2.2 Estándares y reactivos químicos.....	26
2.2.3 Determinación de humedad.....	26
2.2.4 Extracción de glucosinolatos.....	26
2.2.5 Análisis por HPLC de glucosinolatos.....	27
2.2.6 Actividad mirosinasa (tioglucósido glucohidrolasa, EC 3.2.3.1).....	27
2.2.7 Análisis estadístico.....	28
2.3. Resultados y Discusión.....	28

2.3.1	Identificación y cuantificación de glucosinolatos durante la cosecha en tres ecotipos de maca.....	28
2.3.2	Perfiles y contenido de glucosinolatos para los tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha.....	32
2.3.3	Perfiles y contenido de glucosinolatos para los tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha.....	33
2.3.4	Actividad de la mirosinasa durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha .....	36
2.4.	Conclusiones.....	38
2.5	Referencias Bibliográficas.....	39
<b>III</b>	<b>CAPÍTULO III.</b> Evolución del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres ecotipos de maca ( <i>Lepidium meyenii</i> Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	43
	Resumen.....	43
	Abstract.....	44
3.1	Introducción.....	44
3.2	Materiales y Métodos.....	47
3.2.1	Material vegetal.....	47
3.2.2	Estándares y reactivos químicos.....	48
3.2.3	Determinación de humedad.....	48
3.2.4	Determinación de compuestos fenólicos totales.....	48
3.2.5	Determinación de la capacidad antioxidante.....	48
3.2.6	Determinación de antocianinas totales.....	49
3.2.7	Determinación de flavanoides totales.....	49
3.2.8	Determinación de flavonoides totales.....	50
3.2.9	Análisis por HPLC - PDA de compuestos fenólicos.....	50
3.2.10	Análisis estadístico.....	51
3.3.	Resultados y Discusión.....	51
3.3.1	Contenido de compuestos fenólicos totales, flavanoides totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante ABTS <sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la cosecha.....	51

3.3.2	Contenido de compuestos fenólicos totales en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	54
3.3.3	Capacidad antioxidante ABTS <sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	59
3.3.4	Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS <sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	63
3.3.5	Análisis por HPLC-PDA de los compuestos fenólicos en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	64
3.4	Conclusiones.....	75
3.5	Referencias Bibliográficas.....	75
<b>IV</b>	<b>CAPÍTULO IV. Evolución del contenido de <math>\beta</math>-sitosterol en tres ecotipos de maca (<i>Lepidium meyenii</i> Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....</b>	<b>80</b>
	Resumen.....	80
	Abstract.....	81
4.1	Introducción.....	81
4.2	Materiales y Métodos.....	83
4.2.1	Material vegetal.....	83
4.2.2	Estándares y reactivos químicos.....	84
4.2.3	Determinación de humedad.....	84
4.2.4	Análisis por HPLC-PDA de $\beta$ -sitosterol.....	84
4.2.5	Análisis estadístico.....	85
4.3	Resultados y Discusión.....	85
4.3.1	Contenido de humedad en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	86
4.3.2	Perfil cromatográfico del $\beta$ -sitosterol.....	88
4.3.3	Contenido de $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha.....	90
4.3.4	Contenido de $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha.....	92

4.4 Conclusiones.....	94
4.5 Referencias Bibliográficas.....	94
<b>V      CAPÍTULO V. Conclusiones y Recomendaciones Generales.....</b>	<b>98</b>
5.1 Conclusiones generales.....	98
5.2 Recomendaciones generales.....	99
<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1:	Contenido de glucosinolatos en los ecotipos de maca amarilla, roja y negra durante la cosecha.....	30
Tabla 2:	Contenido de glucosinolatos en hipocótilos de maca durante la pre-cosecha ( $\text{mmol kg}^{-1}$ MS).....	33
Tabla 3:	Contenido de glucosinolatos en hipocótilos de maca durante el secado post-cosecha ( $\text{mmol kg}^{-1}$ MS).....	36
Tabla 4:	Contenido de compuestos fenólicos totales, flavanoides totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante ABTS <sup>•+</sup> en hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la cosecha.....	52
Tabla 5:	Contenido de compuestos fenólicos totales en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha...	55
Tabla 6:	Capacidad antioxidante ABTS <sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	60
Tabla 7:	Características cromatográficas y espectrales de los compuestos fenólicos detectados en los hipocótilos de tres ecotipos de maca por HPLC – PDA y criterios de cuantificación.....	65
Tabla 8:	Contenido de compuestos fenólicos por HPLC-PDA en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ MS).....	67
Tabla 9:	Contenido de humedad en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha en $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ .....	87
Tabla 10:	Contenido de humedad en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha en $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ .....	87
Tabla 11:	Contenido de $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha en $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ MS.....	91
Tabla 12:	Contenido de $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha en $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$ MS.....	93

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1:	Ciclo de elongación de la cadena de aminoácidos para la biosíntesis de los glucosinolatos.....	5
Figura 2:	Biosíntesis de la estructura del núcleo de los glucosinolatos.....	6
Figura 3:	Hidrólisis de los glucosinolatos.....	8
Figura 4:	Metabolismo de los isotiocianatos.....	9
Figura 5:	Esquema de las principales ramificaciones de la biosíntesis de polifenoles.....	11
Figura 6:	Principales vías de biosíntesis de esteroles en las plantas.....	15
Figura 7:	Principales estructuras de oxisteroles.....	16
Figura 8:	Perfiles HPLC de glucosinolatos en los ecotipos de maca amarilla, roja y negra durante la cosecha (maca fresca).....	29
Figura 9:	Actividad mirosinasa ( $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ ) en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	37
Figura 10:	Coefficiente de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a un nivel de significación $p < 0.01$ .....	64
Figura 11:	Perfiles fenólicos HPLC-PDA de la fracción acuosa a 280 nm.....	66
Figura 12:	Evolución del contenido de compuestos fenólicos totales determinados por HPLC-PDA en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	72
Figura 13:	Hipocótilos de maca ( <i>Lepidium meyenii</i> Walp.) en las tres etapas de estudio.....	86
Figura 14:	Perfil HPLC-PDA de $\beta$ -sitosterol para el hipocótilo de maca amarilla...	90

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>	<b>Título</b>	<b>Pág.</b>
Anexo 1:	Prueba de Duncan del contenido de glucosinolatos totales, glucotropaeolin durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	100
Anexo 2:	Prueba de Duncan de la actividad de la enzima mirosinasa durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	102
Anexo 3:	Prueba de Duncan del contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante ABTS <sup>•+</sup> , correlación de Pearson, contenido de compuestos fenólicos totales HPLC-PDA durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	103
Anexo 4:	Prueba de Duncan del contenido de $\beta$ -sitosterol durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.....	107

## RESUMEN GENERAL

La tesis doctoral “Evolución de glucosinolatos, compuestos fenólicos y  $\beta$ -sitosterol en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha y post-cosecha”, fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Industrial del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina, consta de cinco capítulos. El capítulo uno, introducción general, describe la importancia de la maca como alimento nutritivo y funcional, las rutas metabólicas biosintéticas y degradativas de los glucosinolatos, compuestos fenólicos y  $\beta$ -sitosterol; el capítulo dos, evolución del contenido de glucosinolatos y actividad mirosinasa en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha; el capítulo tres, evolución del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha; el capítulo cuatro, evolución del contenido de  $\beta$ -sitosterol en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha. Finalmente, en el capítulo cinco, las conclusiones y recomendaciones generales a las que se llegaron en el trabajo de investigación. Los objetivos del estudio fueron, determinar el efecto de las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en el perfil, contenido de glucosinolatos y actividad de la mirosinasa; en el perfil, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante; y en el contenido de  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca. Se identificaron seis glucosinolatos y once compuestos fenólicos HPLC-PDA, donde el bencil glucosinolato fue el más abundante representando el 80% de los glucosinolatos totales y los derivados del flavanol (flavan-3-ol) el 84% de los compuestos fenólicos totales. Durante la pre-cosecha se incrementaron significativamente los glucosinolatos, la biosíntesis ocurrió hasta los 15 días de secado post-cosecha, los compuestos fenólicos presentaron un comportamiento variable debido probablemente a la complejidad de sus rutas metabólicas de biosíntesis y degradación, también se observó un incremento en el contenido de  $\beta$ -sitosterol a distintos tiempos entre la pre-cosecha a la cosecha. Durante la cosecha, en los tres ecotipos, no se observaron diferencias en sus contenidos de glucosinolatos y  $\beta$ -sitosterol, los compuestos fenólicos HPLC-PDA en la maca roja y negra fueron superiores al de la maca amarilla; el ecotipo rojo presentó mayor contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> que los ecotipos amarillo y negro. Durante el secado post-cosecha, en condiciones tradicionales, se

observó una pérdida significativa de los glucosinolatos entre el 20% a 50%, de compuestos fenólicos entre el 66 a 90% y de  $\beta$ -sitosterol entre el 46 a 64%, el cual se atribuyó a la ruptura celular por fluctuaciones de temperatura de congelación y descongelación durante el proceso de secado. Por lo tanto, las condiciones de secado tradicional deben revisarse.

## SUMMARY

The doctoral thesis "Evolution of glucosinolates, phenolic compounds and  $\beta$ -sitosterol in three ecotypes of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) during pre-harvest and post-harvest" was carried out at the Industrial Biotechnology Laboratory of the Institute of Biotechnology (IBT) of Universidad Nacional Agraria La Molina, it consists of five chapters. Chapter one, general overview, describes the importance of maca as a nutritious and functional food, biosynthetic and degradative metabolic pathways of glucosinolates, phenolic compounds and  $\beta$ -sitosterol; chapter two, evolution of glucosinolate content and myrosinase activity in three ecotypes of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) during pre-harvest, harvest and post-harvest drying; chapter three, evolution of the phenolic compound content and antioxidant capacity in three ecotypes of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) during pre-harvest, harvest and post-harvest drying; chapter four, evolution of  $\beta$ -sitosterol content in three ecotypes of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) during pre-harvest, harvest and post-harvest drying. Finally, in chapter five, the conclusions and general recommendations that resulted from this research. This study aimed to determine the effect of pre-harvest, harvest and post-harvest drying on the profile, glucosinolate content and myrosinase activity; on the profile, content of phenolic compounds and antioxidant capacity; and on  $\beta$ -sitosterol content in the hypocotyls of three ecotypes of maca. Six glucosinolates and eleven phenolic compounds HPLC-DAD were identified in the three ecotypes, from which benzyl glucosinolate was the most abundant representing 80% of total glucosinolates and flavanol derivatives (flavan-3-ol) representing 84% of total phenolic compounds. During pre-harvest, glucosinolates were significantly increased, biosynthesis occurred up to 15 days post-harvest drying, phenolic compounds showed a variable behavior probably due to the complexity of their metabolic pathways of biosynthesis and degradation and an increase in  $\beta$ -sitosterol content at different times between pre-harvest and harvest was observed. During harvest, no differences were observed in their contents of glucosinolates and  $\beta$ -sitosterol in the three ecotypes, the phenolic compounds HPLC-DAD in the red and black maca were superior to that of the yellow maca; the red ecotype presented higher content of total phenolic compounds and antioxidant ABTS  $\bullet^+$  capacity than the yellow and black ecotypes. During post-harvest drying, under traditional condi -

tions, a significant decrease of glucosinolates between 20% and 50%, phenolic compounds between 66% and 90% and of  $\beta$ -sitosterol between 46% and 64% was observed, which was attributed to cell breakdown by freezing and thawing temperature fluctuations during the drying process. Therefore, traditional drying conditions should be reviewed.

# I. CAPÍTULO I

## Introducción General

### 1.1 Importancia nutricional, funcional y económica de la maca (*Lepidium meyenii* Walp)

La maca es una planta herbácea bianual, se cultiva entre los 3,950 y los 4,500 metros de altitud, crece en forma de roseta y postrada a nivel del suelo, ventaja adaptativa que le permite prosperar adecuadamente en condiciones climáticas extremas, el área geográfica de cultivo de la maca está localizada entre las regiones de Junín y Pasco, en la Meseta del Bombón, específicamente en los distritos de Junín, Carhuamayo, Ondores y San Pedro de Cajas en la región Junín y en los distritos de Ninacaca, Vicco y Huayllay en la región Pasco, con un área potencial para el cultivo de la maca de 239,078 hectáreas, además alberga 510 comunidades campesinas con más de 48 mil habitantes (Aliaga *et al.*, 2011).

En una evaluación nutricional, el hipocótilo de maca reportó un 10.2% de proteínas, 2.2% de lípidos, 59% de carbohidratos hidrolizables, 8.5% de fibra total y 4.9% de cenizas, excelente perfil de aminoácidos esenciales comparado al estándar FAO-OMS, buena relación de ácidos grasos saturados/ácidos grasos insaturados (0.76), lípidos con 45.5% de  $\beta$ -sitosterol, 27.3% de campesterol, 13.6% de ergosterol, 9.1% de brasicasterol y 4.5% de  $\Delta^{7,22}$  ergostadienol y minerales como potasio 16.2 mg g<sup>-1</sup>, sodio 260 mg kg<sup>-1</sup>, zinc 58.4 mg kg<sup>-1</sup>, hierro 72.3 mg kg<sup>-1</sup>, cobre 5.14 mg kg<sup>-1</sup> y níquel 0.49 mg kg<sup>-1</sup> (Dini *et al.*, 1994; Valentová *et al.*, 2006).

En los Andes peruanos, la tradición oral menciona muchas bondades de la maca, como el tratamiento de la infertilidad y la menopausia, incremento de la energía física y mental. Las propiedades nutricionales de la harina de maca y efectos aparentes sobre el rendimiento reproductivo y sexual en ratas y seres humanos han sido ampliamente documentados (Gonzales *et al.*, 2001a; González *et al.*, 2001b; Gonzales *et al.*, 2004). Además se le atribuye funciones anti-proliferativas, se ha reportado que el extracto acuoso de maca roja redujo el peso de la cara ventral de la próstata en ratas adultas normales así como en ratas



tratadas con enantato de testosterona, sustancia que incrementa significativamente el peso de dicho órgano (Gonzales *et al.*, 2005, 2006). Las ratas a las que se les administró vía oral maca roja, mostraron efectos beneficiosos en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (HBP) inducida experimentalmente con testosterona, confirmando su efecto (Gasco *et al.*, 2007). Entre los mecanismos propuestos para esta función anti-proliferativa y la citoprotección en condiciones de estrés oxidativo está su capacidad para eliminar los radicales libres (Lee *et al.*, 2005; Sandoval *et al.*, 2002). La presencia de alcaloides y esteroides en la maca estarían implicados en su actividad anticancerígena (Wang *et al.*, 2007), así como sus glucosinolatos y derivados (Fahey *et al.*, 2001). Según Wang *et al.* (2007) en la maca, la presencia de alcaloides, glucosinolatos y esteroides pueden contribuir a su actividad anticancerígena, los fitoesteroides y otros metabolitos secundarios estarían relacionados en el control de la osteoporosis postmenopáusia.

Varias pruebas experimentales, mostraron que la maca tiene propiedades nutricionales, energizantes, potenciador de la fertilidad, control de la osteoporosis y la hiperplasia prostática benigna, mejora de la memoria y el aprendizaje; los ensayos clínicos demostraron su eficacia en las disfunciones sexuales, incremento de espermatozoides y su motilidad; todos estos resultados promueven a la maca como un adaptógeno (ayudan al organismo a alcanzar un rendimiento óptimo mental, físico y de trabajo) y nutracéutico (Gonzales, 2012). La maca negra muestra mejores resultados sobre la espermatogénesis, la memoria y contra la fatiga, mientras que la maca roja es la que mejor revierte la hiperplasia prostática benigna y la osteoporosis inducida experimentalmente por enantato de testosterona (Gonzales *et al.*, 2014).

La actividad antioxidante de un extracto acuoso de maca, evaluada por varios métodos, demostró su capacidad de eliminar radicales libres y proteger a las células contra el estrés oxidativo, no se conoce la cantidad para prevenirla; sin embargo, estiman un consumo aproximado de 75 g día<sup>-1</sup>, equivalente al consumo de ~ 1 g taza<sup>-1</sup> de té verde (Sandoval *et al.*, 2002). Lee *et al.* (2005) reportaron que los compuestos de interés de la maca tienen alta polaridad, pueden ser extraídos con metanol y presentaron una alta actividad antioxidante, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), demostrando efectos significativos sobre el crecimiento y la supervivencia de alevinos de trucha arco iris, que podrían explicarse por la presencia de compuestos anti estrés que deben ser identificados. Los extractos acuoso y etanólico de maca negra administrados a ratones machos por 35 días, mejoraron

significativamente el deterioro de la memoria inducida por escopolamina, debido a que inhibieron la actividad de acetilcolinesterasa y no afectaron la actividad de la monoaminoxidasa, los compuestos relacionados con su efecto neuroprotector todavía no han sido esclarecidos, presumen que el efecto en el aprendizaje y la memoria se deben a la presencia de compuestos polifenólicos (Rubio *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que los compuestos polifenólicos también pueden ser eficaces contra las infecciones virales *in vitro*. Utilizando células renales caninas de Madin-Darby (MDCK), el extracto metanólico de maca inhibió significativamente el efecto citopático inducido por la influenza y mostró propiedades inhibitorias contra los virus de la influenza A y B, esto puede representar un nuevo tratamiento terapéutico con actividad antiviral contra la influenza (del Valle *et al.*, 2014).

La presencia de la maca en el mercado internacional, está basado en la iniciativa BioTrade de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo (UNCTAD), que define el biocomercio, como «actividades de recolección, producción, transformación y comercialización de bienes y servicios derivados de la biodiversidad nativa (recursos genéticos, especies y ecosistemas) que involucran prácticas de conservación y uso sostenible y son generados con criterios de sostenibilidad ambiental, social y económica», tienen como soporte los siguientes principios: principio 1, conservación de la biodiversidad; principio 2, uso sostenible de la biodiversidad; principio 3 distribución justa y equitativa de beneficios derivados del uso de la biodiversidad; principio 4, sostenibilidad socioeconómica (de gestión, productiva, financiera y de mercado); principio 5, cumplimiento de la legislación nacional e internacional; principio 6, respeto de los derechos de los actores involucrados en el biocomercio; y principio 7, claridad sobre la tenencia de la tierra, el uso y acceso a los recursos naturales y a los conocimientos (UNCTAD, 2007:4).

Las exportaciones de maca (harina cruda, harina gelatinizada, cápsulas y extractos) a nivel mundial siguen incrementándose, el año 2012 se exportaron 1,289 toneladas y 2,890 toneladas el año 2016, siendo los principales mercados Estados Unidos, Hong Kong, Reino Unido, China, Alemania y Japón; la tendencia ascendente se explica por nuevos mercados, en términos monetarios, el año 2015 se exportó 1,411 toneladas de harina de maca por un valor de 26.8 millones de dólares (PROMPERÚ, 2017).

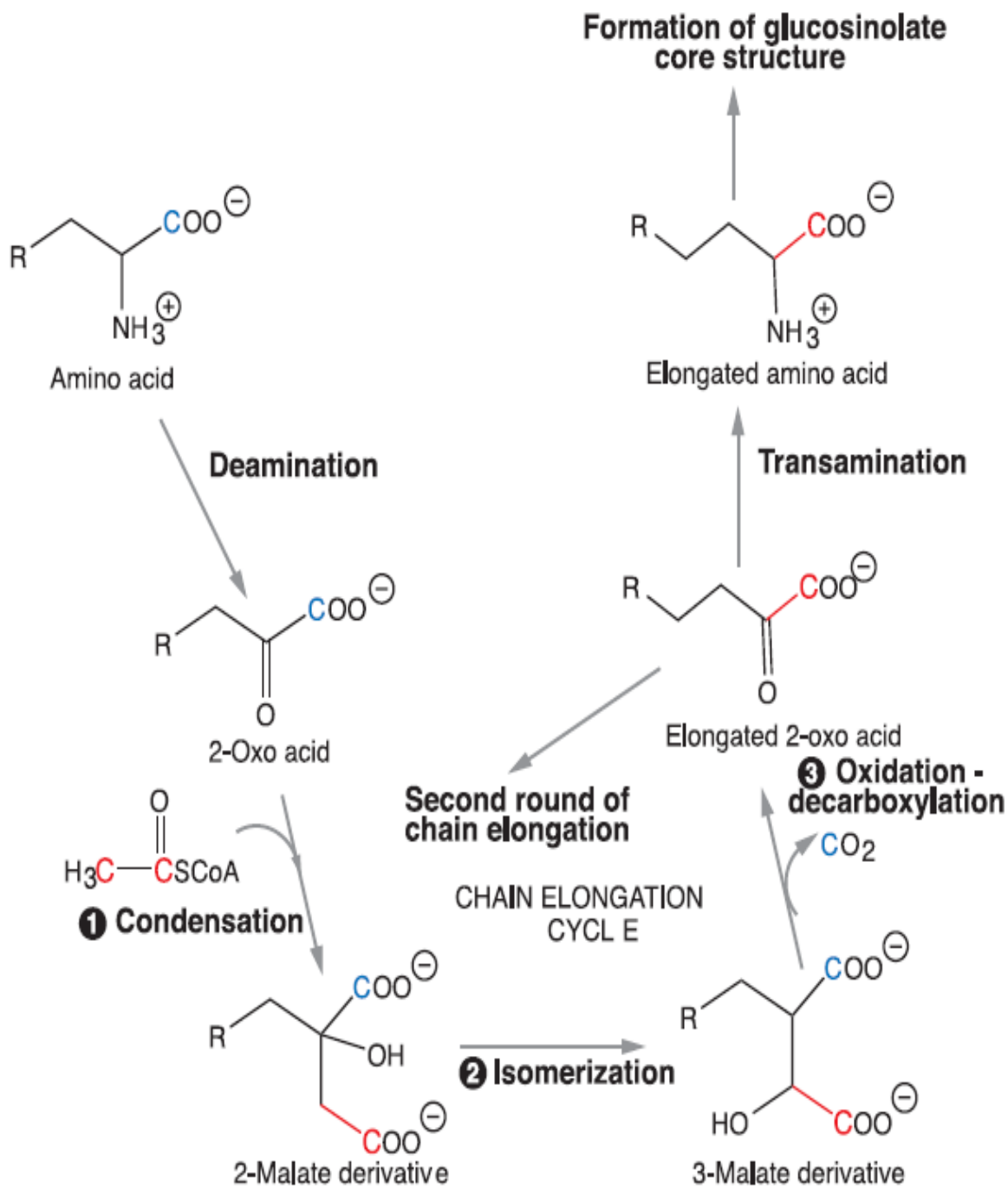
## 1.2 Glucosinolatos

Los aproximadamente 120 glucosinolatos estudiados, comparten una estructura química que consiste en un residuo de  $\beta$ -D-glucopiranososa unido mediante un átomo de azufre a un éster (Z)-N-hidroximinosulfato más un grupo R variable, derivado de uno de los siguientes aminoácidos: Ala, Leu, Ile, Met y Val denominados glucosinolatos alifáticos, Phe y Tyr denominados glucosinolatos aromáticos y Trp denominados indol glucosinolatos (Halkier y Gershenzon, 2006).

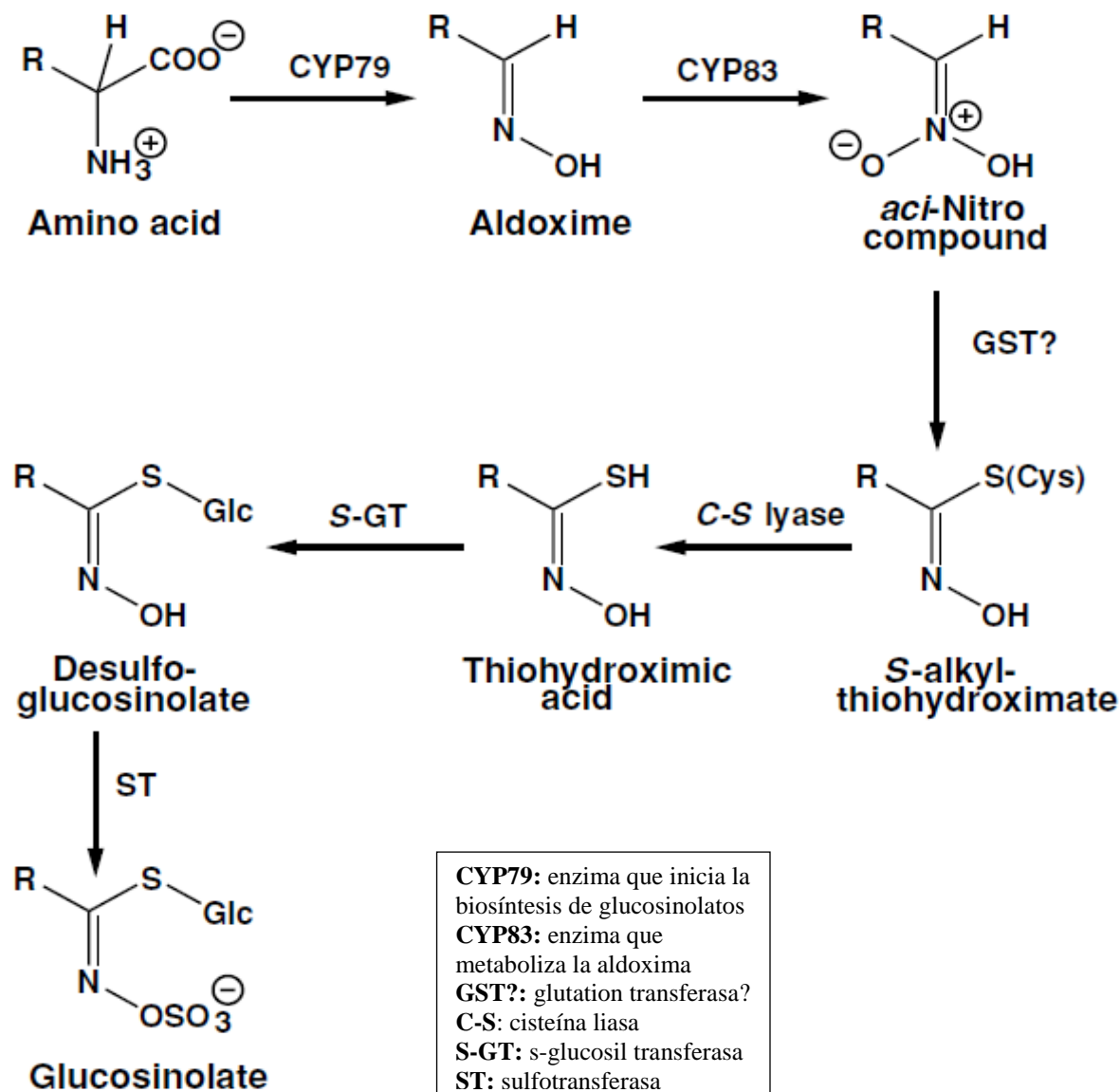
Los glucosinolatos son los metabolitos secundarios más importantes en la maca, la mayoría de ellos de tipo aromático donde el glucotropaeolin es el más abundante (Li *et al.*, 2001). El 80-90% de los glucosinolatos totales en la maca está constituido por glucotropaeolin, están presentes en diferentes órganos de la planta, varían en contenido y tipo, dependiendo de la edad de la planta y color del hipocótilo (Clément *et al.*, 2009, 2010). El mayor contenido de glucosinolatos totales en la maca se encuentran en los hipocótilos frescos, aproximadamente el 1%, unas 100 veces más que la col, coliflor y brócoli, seguido de las semillas, brotes, hipocótilos secos y hojas frescas (Li *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Biosíntesis y degradación de los glucosinolatos

La biosíntesis de los glucosinolatos puede ser dividida en tres fases (Figuras 1 y 2): (1) elongación (inserción de grupos metileno) de la cadena lateral de los aminoácidos alifáticos o aromáticos, mediante procesos de desaminación, condensación, isomerización y descarboxilación oxidativa el ácido 2-oxo elongada formado puede reingresar al ciclo de elongación o mediante transaminación formar un aminoácido elongado, (2) formación de la estructura del núcleo de glucosinolatos (elongados o no), involucra intermediarios comunes en todos los glucosinolatos, N-hidroxi aminoácidos, aldoximas, aci-nitro u óxido de nitrilo (muy reactivos para aislarse), S-alquil tiohidroximatos, ácido tiohidroxímico y finalmente desulfoglucosinolatos, resalta la actividad de las enzimas S-glucosil transferasa y sulfotransferasa que incorporan glucosa y sulfato, respectivamente y (3) modificación de la cadena lateral de los glucosinolatos, los mismos que están sujetos a cambios posteriores, como la oxidación sucesiva del átomo de S en la cadena lateral del metiltioalquil, transformándose sucesivamente en metilsulfinilalquil y metilsulfonilalquil, las cadenas laterales del metilsulfinilalquil pueden ser modificadas mediante rupturas oxidativas para formar cadenas de alquenil o hidroxialquil, poco se conoce acerca de otras transformacio -



**Figura 1.** Ciclo de elongación de la cadena de aminoácidos para la biosíntesis de los glucosinolatos (FUENTE: Halkier y Gershenzon, 2006).



**Figura 2.** Biosíntesis de la estructura del núcleo de los glucosinolatos (FUENTE: Halkier y Gershenzon, 2006).por ácido benzoico (Halkier y Gershenzon, 2006).

nes secundarias como por ejemplo la esterificación de los grupos hidroxilos por ácido benzoico (Halkier y Gershenzon, 2006).

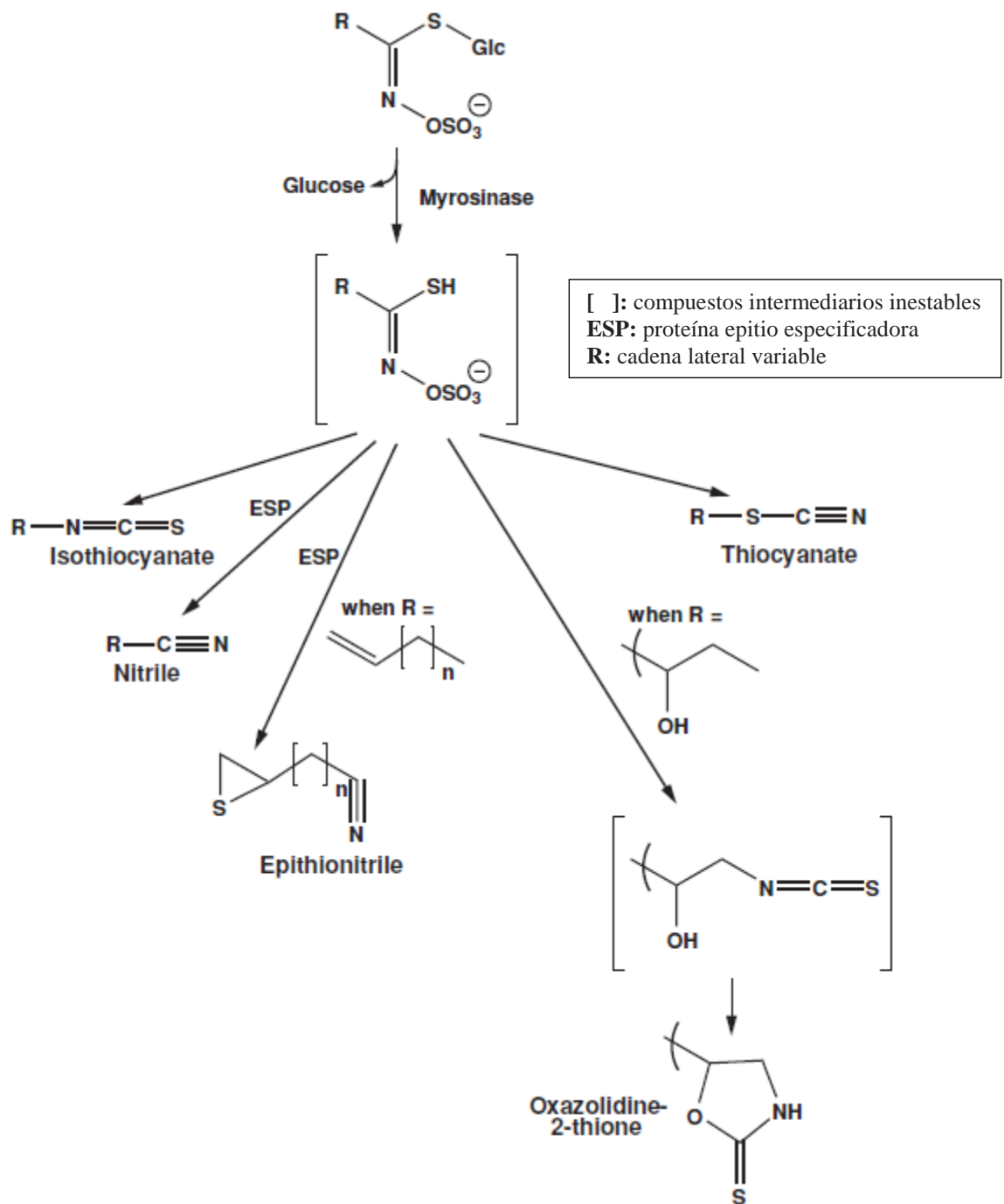
La enzima mirosinasa (tioglucósido glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.147) degrada los glucosinolatos a isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos (Figura 3), en células intactas los glucosinolatos y mirosinasa están en diferentes compartimentos; por lo tanto, el daño celular favorece la ruptura de glucosinolatos por mirosinasa (Fahey *et al.*, 2001). Los productos de hidrólisis de glucosinolatos más comunes son los isotiocianatos, por migración de la cadena lateral del carbono de la oxima al nitrógeno adyacente. Cuando la

cadena lateral de los glucosinolatos lleva un grupo hidroxilo en C-2, un porcentaje importante son los nitrilos, donde una proteína denominada epitioespecificadora (ESP), promueve la reacción del átomo de azufre con el doble enlace de la cadena lateral de los glucosinolatos para formar un anillo tirano generando los epitio-nitrilos; otros productos de hidrólisis son los tiocianatos, que se forman a partir de bencil-, alil y 4-metilsulfinilbutil glucosinolatos (Halkier y Gershenzon, 2006).

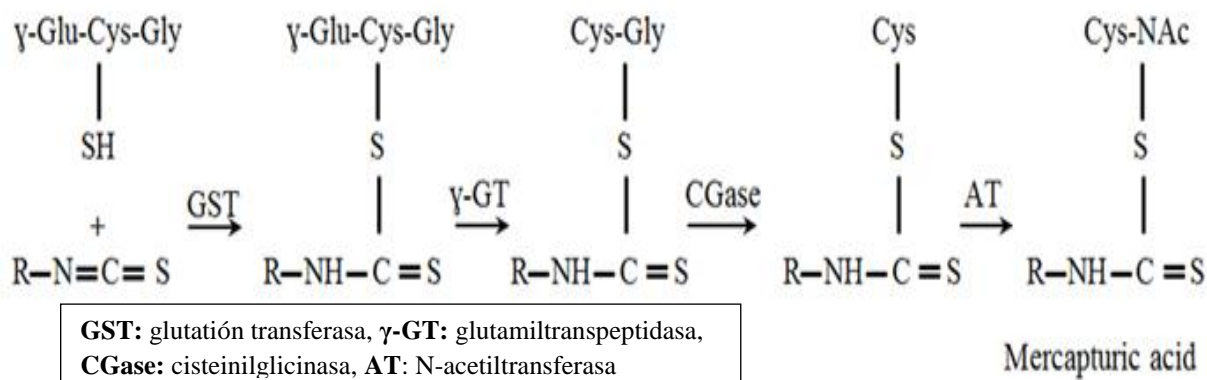
Con respecto a los factores genéticos, bióticos y abióticos, se sabe que la variedad, prácticas de cultivo, tiempo de cosecha, clima y el procesamiento afectan al contenido de glucosinolatos y han sido ampliamente documentados (Kushad *et al.*, 1999; Mrkic *et al.*, 2009; Rosa *et al.* 1996; Verkerk *et al.*, 2001).

### **1.2.2 Los glucosinolatos y beneficios en la salud**

Los isotiocianatos son potentes inductores de enzimas citoprotectoras del hombre y mamíferos, después de su absorción se metabolizan a través de la ruta del ácido mercaptúrico (Figura 4), inicialmente se conjugan con glutatión en una reacción catalizada por glutatión transferasa (GST); el conjugado isotiocianato-glutatión sufre una serie de reacciones de escisión secuenciales catalizadas por glutamiltranspeptidasa ( $\gamma$ -GT), cisteinilglicinasa (CGase), y N-acetiltransferasa (AT) para dar conjugados N-acetilcisteína o ácidos mercaptúricos (Dinkova-Kostova y Kostov, 2012).



**Figura 3.** Hidrólisis de los glucosinolatos (FUENTE: Halkier y Gershenzon, 2006).



**Figura 4.** Metabolismo de los isotiocianatos (FUENTE: Dinkova-Kostova y Kostov, 2012).

La protección contra la carcinogénesis por isotiocianatos aromáticos y sulforafano, no es específica de ningún órgano, utilizando ratas y ratones, se ha experimentado con éxito en pulmones, esófago, estómago, colon, glándulas mamarias, vejiga, páncreas y la piel; los isotiocianatos inhibieron el crecimiento de las células tumorales humanas en xenoinjerto de próstata PC-3, colorrectal, esófago de Barrett y cáncer de mama, en un xenoinjerto de cáncer de páncreas, el cotratamiento con sulforafano aumentó el efecto antitumoral en más del 70%, los mecanismos son múltiples e incluyen al menos los siguientes, inducción de la interrupción del ciclo celular y la apoptosis, inhibición de la angiogénesis y la metástasis, cambios en el estado de acetilación de histonas, actividades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Dinkova-Kostova y Kostov, 2012).

### 1.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están ampliamente dispersos en todo el reino vegetal representando aproximadamente 8,000 estructuras fenólicas diferentes, tienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo unidos, varían desde moléculas simples de bajo a alto peso molecular y complejas, generalmente se encuentran como ésteres y glucósidos debido a su estabilidad (Carocho y Ferreira, 2013).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de considerable importancia fisiológica y morfológica de las plantas, proporcionan protección frente a patógenos y depredadores, contribuyen a las características sensoriales de los vegetales, presentan efecto antialérgico, antiaterogénico, antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante, antitrombótico, cardioprotector y vasodilatador, los efectos beneficiosos derivados de



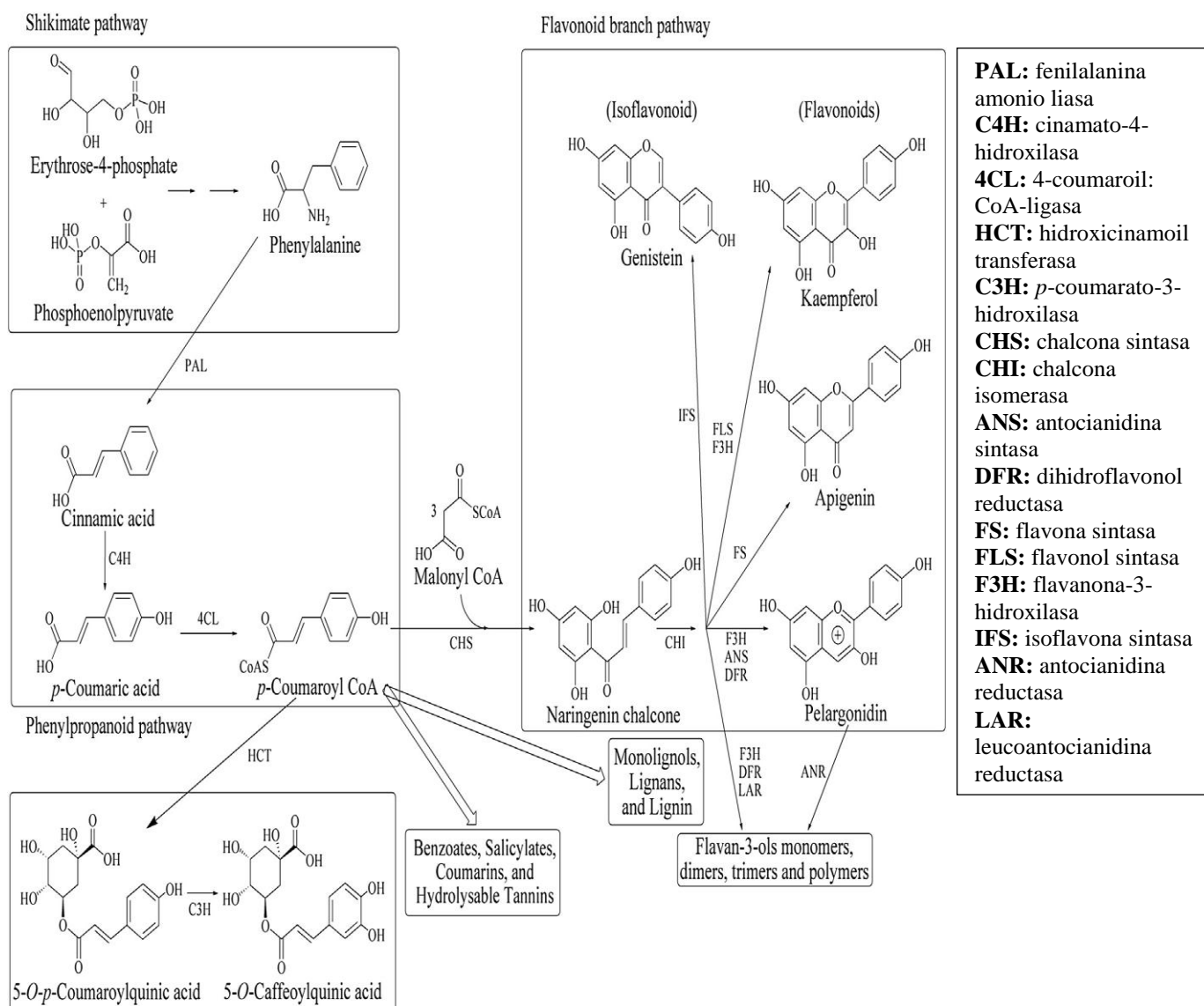
compuestos fenólicos han sido atribuido a su actividad antioxidante (Balasundram *et al.*, 2006).

Un antioxidante es un compuesto redox activo que limita la acumulación de daño oxidativo ocasionado por moléculas denominadas especies reactivas de oxígeno (EROs) que comprometen la función normal de las células y del organismo, el cuerpo humano tiene un sistema de defensa antioxidante y una dieta rica en antioxidantes refuerzan dicho sistema, estos actúan de manera sinérgica con la vitamina C, E y otros componentes bioactivos (Blomhoff, 2005; Blomhoff *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Biosíntesis y degradación de compuestos fenólicos

Como regla general, el término “fenólicos vegetales” deben ser utilizados estrictamente para referirse a metabolitos secundarios naturales derivados biogénicamente de la vía shikimato/fenilpropanoide, que proporcionan directamente fenilpropanoides o de la vía del poliquétido acetato/malonato (Figura 5), estas vías producen una gran variedad de estructuras monoméricas y poliméricas que cumplen una amplia gama de funciones fisiológicas en las plantas, se clasifican sobre la base de sus estructuras básicas: C<sub>6</sub> (fenoles simples, benzoquinonas), C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (ácidos fenólicos y aldehídos), C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> (acetofenonas, ácidos fenilacéticos), C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (ácidos hidroxicinámicos, cumarinas, fenilpropanos, cromonas), C<sub>6</sub>-C<sub>4</sub> (naftoquinonas), C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> (xantonas), C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> (estilbenos, antraquinonas), C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides), (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>2,3</sub> (bi-, tri flavonoides, dímeros y trimeros de proantocianidinas), (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (lignanós, neolignanós), (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub> (ligninas), (C<sub>6</sub>)<sub>n</sub> (catecol melaninas, florotaninos), (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub> (taninos condensados), las de importancia funcional, se producen en las plantas superiores (Cheynier *et al.*, 2013).

La biosíntesis y concentración de compuestos fenólicos en las plantas depende del genotipo, factores bióticos (plagas, infección por patógenos) y al estrés abiótico (luz, temperatura, fuente de nutrientes, disponibilidad de agua, condiciones de crecimiento y radiación UV), además de las condiciones de almacenamiento, tratamiento post-cosecha y los métodos de estimación; los fenoles se producen en las plantas como metabolitos secundarios por medio de la vía del ácido shikímico, la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave que cataliza la biosíntesis de compuestos fenólicos a partir del aminoácido –



**Figura 5.** Esquema de las principales ramificaciones de la biosíntesis de polifenoles (FUENTE: Cheynier *et al.*, 2013).

aromático fenilalanina, son sensibles al estrés biótico y abiótico (Cartea *et al.*, 2011), también afectan a la actividad de la polifenoloxidasa (PPO) y peroxidasa (PX) por consiguiente en la concentración final de polifenoles en los tejidos vegetales (de Pascale *et al.*, 2007), además afectan el tratamiento doméstico (lavado, pelado, cortado, etc.) e industrial como el procesamiento convencional térmico y no térmico (altas presiones, campos eléctricos pulsantes, ultrasonido/sonicación, ozono, ultravioleta) (Tiwari y Cummins, 2013).

La degradación de compuestos fenólicos ocurre por oxidación enzimática y pardeamiento no enzimático. Las polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1), catalizan la *o*-hidroxilación de monofenoles a *o*-difenoles y la posterior oxidación de *o*-difenoles a *o*-quinonas, los que se condensan para producir polímeros marrones relativamente insolubles (melaninas), requieren disponibilidad de oxígeno, las peroxidasas (EC 1.11.1.7), catalizan la reducción de peróxidos y la oxidación de polifenoles, las lacasas (EC 1.10.3.2), catalizan la oxidación sucesiva de fenoles en radicales libres, éstos en quinonas para terminar en una polimerización y las lipoxigenasas (EC 1.13.11.12), como las hidroperoxidasas, oxidan algunos polifenoles como el resveratrol para formar radicales libres (López-Nicolás y García-Carmona, 2010).

Durante el procesamiento (tratamiento térmico, fermentación y secado) y almacenamiento de alimentos ocurren procesos bioquímicos y químicos, dentro de ellas las reacciones degradativas de polifenoles, se sabe que los polifenoles pueden reaccionar con los grupos amino complicando la vía de reacciones del pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard), disminuyendo sus propiedades saludables, además el calor y las condiciones de extracción pueden cambiar la estereoisomería (enantiómeros y epímeros) de los polifenoles modificando su comportamiento (López-Nicolás y García-Carmona, 2010).

### **1.3.2 Los compuestos fenólicos y beneficios en la salud**

Estudios epidemiológicos han demostrado repetidamente una asociación inversa entre el riesgo de enfermedades humanas crónicas y el consumo de una dieta rica en polifenoles, demostraron protección contra el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento; los grupos fenólicos pueden aceptar un electrón para formar radicales fenoxilo relativamente estables, alterando de esta manera las reacciones en cadena de la oxidación en los componentes celulares; por lo tanto, los polifenoles protegen los componentes celulares contra el daño y estrés oxidativo (Pandey y Rizvi, 2009).

Los polifenoles son potentes inhibidores de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), promueven el incremento de lipoproteínas de alta densidad (HDL), además demuestran efecto anticancerígeno en líneas celulares de cáncer humano, boca, estómago, duodeno, colorrectal, próstata, hígado, pulmón, glándulas mamarias y piel, en el efecto antidiabético, controlan el desarrollo progresivo de la retinopatía, nefropatía, neuropatía

que se asocia con los riesgos de amputaciones, úlceras del pie y otras perturbaciones como la disfunción sexual, mediante la inhibición de la absorción de glucosa en el intestino o por los tejidos periféricos, proporciona protección contra las enfermedades neurológicas, alzheimer y parkinson; por otra parte, la función antioxidante también se relaciona con la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes y desintoxicantes en particular en el cerebro, que no está dotado de un sistema de defensa antioxidante bien organizada (Pandey y Rizvi, 2009).

## **1.4 Fitoesteroles**

Los fitoesteroles son triterpenos, se asemejan al colesterol en estructura y función, se han descrito 44 esteroides presentes en las plantas, siendo los principales,  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etilcolesterol), campesterol (24 $\alpha$ -metilcolesterol) y estigmasterol ( $\Delta^{22}$ , 24 $\alpha$ -etilcolesterol); el ergosterol ( $\Delta^{7,22}$ , 24 $\alpha$ -metilcolesterol) es el principal esteroide de la levadura y se encuentra en los aceites de maíz, semillas de algodón, maní y lino (Kritchevsky y Chen, 2005). El  $\beta$ -sitosterol, es un metabolito secundario de las plantas y consta de  $\beta$ -sitosterol libre y conjugado como, ésteres de esteril-acil graso (SE), esteril- $\beta$ -D-glucósidos (SG) y esteril-6-O-acil graso- $\beta$ -D-glucósidos (ASG) (Moreau *et al.*, 2002).

Los fitoesteroles, son componentes estructurales lipofílicos de las membranas vegetales, son esenciales para el crecimiento y desarrollo, como la formación embrionaria, división celular, elongación celular, polaridad celular epidérmica, acumulación de celulosa, actúan en la regulación de la actividad de las proteínas dentro de la membrana, son precursores para la biosíntesis de la hormona brasinoesteroides; estudios genéticos han demostrado las interacciones genéticas entre la biosíntesis de esteroides y las vías de señalización del etileno (Boutté y Grebe, 2009).

La forma reducida de los fitoesteroles son los fitoestanoles, un subgrupo totalmente saturado, se encuentran en cantidades muy pequeñas en muchas especies de plantas y se sintetizan en mayores niveles en algunas especies de cereales (Moreau *et al.*, 2002).

### **1.4.1 Biosíntesis y degradación de fitoesteroles**

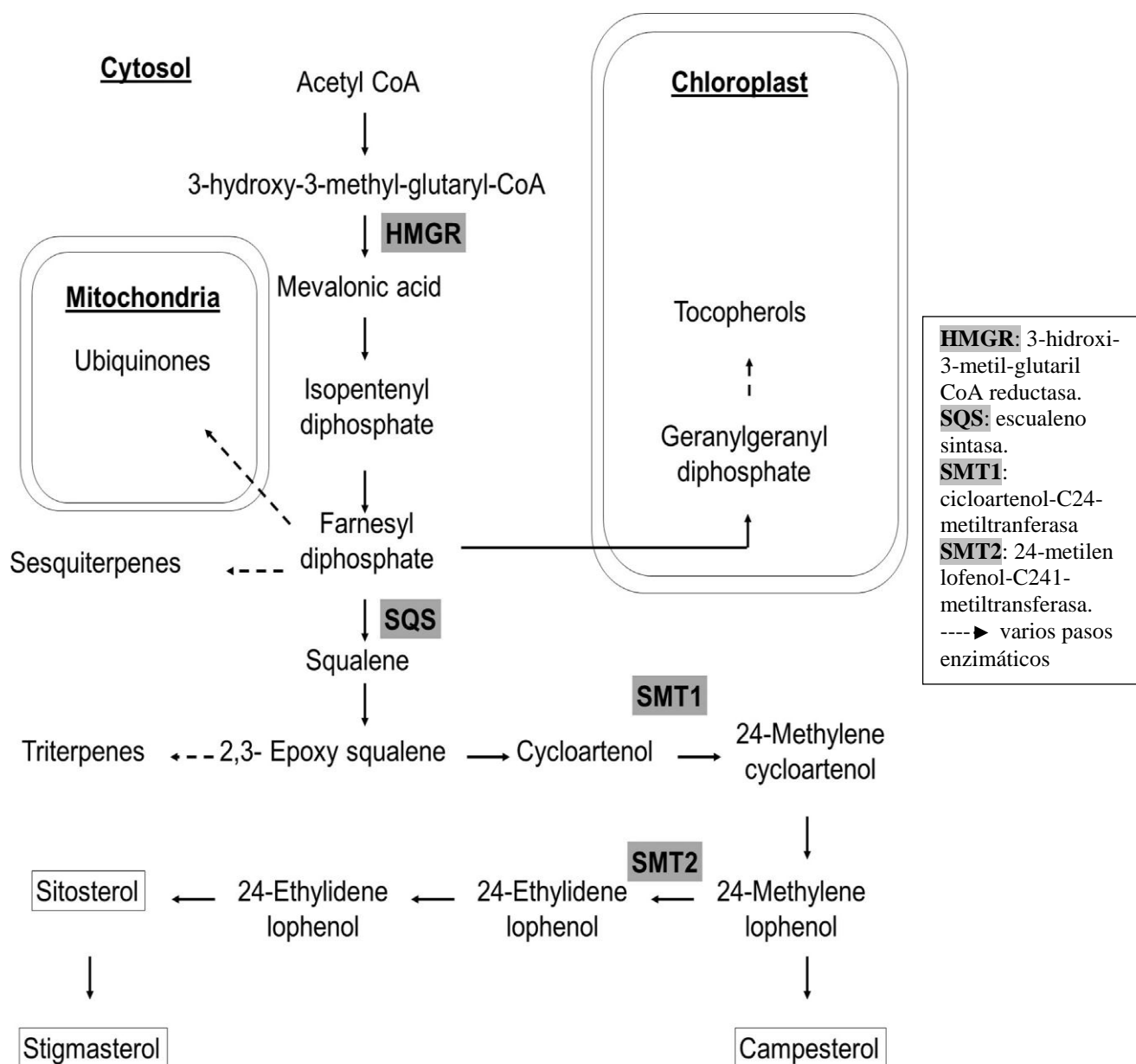
Los esteroides son mayormente derivados de la vía del mevalonato en la biosíntesis de isoprenoides (Figura 6), la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA reductasa (HMGR) regu-

En la ruta metabólica, la enzima escualeno sintasa (SQS) cataliza la primera reacción clave en la biosíntesis de esteroides, actúa en la condensación de dos moléculas de farnesil pirofosfato (FPP) para producir escualeno que se produce en dos etapas, primero una condensación para formar pre-escualeno difosfato, seguido de una reorganización y reducción por NADPH para formar escualeno, el cual es metabolizado para sintetizar esteroides como  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y campesterol, son importantes también la actividad del cicloartenol-C24-metiltransferasa (SMT1) que cataliza la metilación del cicloartenol y del 24-metilen lofenol-C241-metiltransferasa (SMT2) que cataliza la metilación del 24-metilenlofenol (Nguyen *et al.*, 2013).

La mayoría de los genes biosintéticos implicados en la ruta metabólica del post-escualeno, han sido aislados y caracterizados por medio de interferencia metabólica, inhibición farmacológica, disección genética, complementación y expresión funcional, purificación de proteínas y secuenciamiento (Schaller, 2004; Boutté y Grebe, 2009).

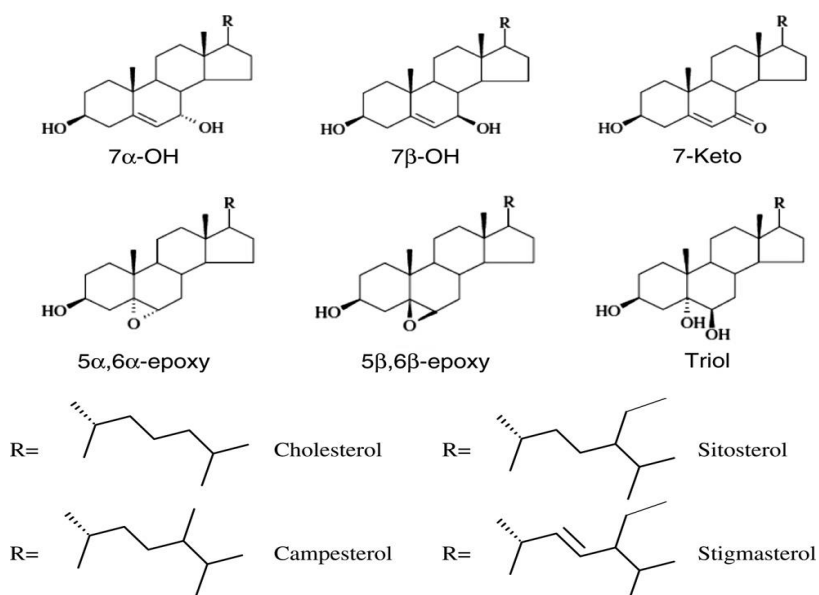
Los vegetales contienen un promedio de 1 a 3 mg de esteroides por gramo de peso seco, se sintetizan por medio del metabolismo de isoprenoides, generando varios productos finales como el  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol e isofucosterol en proporciones definidas genéticamente (Schaller, 2004).

Los productos de oxidación de los fitoesteroides (POP),  $\alpha$  y  $\beta$ -epoxisitosterol,  $\alpha$  y  $\beta$ -epoxisitostanol y sitostanetriol, campestanetriol, 7-cetositosterol,  $7\alpha$  y  $7\beta$ -hidroxisitosterol (Figura 7), que se forman durante el almacenamiento y procesamiento de los alimentos, también pueden producirse *in vivo* mediante oxidación no enzimática, similar a lo demostrado para el colesterol (Maerker *et al.* 1988), son absorbidos y se encuentran en el suero humano, no afectan directamente la absorción del colesterol.



**Figura 6.** Principales vías de biosíntesis de esteroides en las plantas (FUENTE: Nguyen *et al.*, 2013).

Se ha observado distintos niveles de citotoxicidad, resultando mayores los óxidos de  $\beta$ -sitosterol, seguido de los óxidos de campesterol, estigmasterol y dihidrobrasicasterol, particularmente de los derivados 7  $\beta$ -hidroxi y 7-ceto, existe evidencia de su capacidad aterogénica, incrementan las citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ) que afectan la integridad del epitelio intestinal, incrementan la producción de superóxido y depleción de la proteína antioxidante glutatión, producen disfunción mitocondrial y alta actividad caspasa, una cisteína proteasa considerada como el ejecutor de la apoptosis (Otaegui-Arazola *et al.*, 2010; O'Callaghan *et al.*, 2014).



**Figura 7.** Principales estructuras de oxisteroles (FUENTE: Otaegui-Arazola *et al.*, 2010).

#### 1.4.2 Los fitoesteroles y beneficios en la salud

La literatura científica médica describe varios efectos fisiológicos; sin embargo, el efecto hipocolesterémico es el mejor evidenciado clínicamente en ratas y humanos, su mecanismo de acción se conoce parcialmente. El  $\beta$ -sitosterol tiene la capacidad de disminuir el contenido de colesterol total y colesterol de lipoproteínas séricas de baja densidad cuando se consume con regularidad reduciendo el riesgo de arterioesclerosis coronaria (Moreau *et al.*, 2002).

Diversos estudios han mostrado que el consumo de 2 g de esteroides vegetales al día reducen el colesterol sérico en un 10%, esta reducción de los niveles de colesterol en el suero se logra a expensas de un aumento de los niveles de esteroides vegetales en el mismo, además pueden tener otros efectos promotores de la salud como actividad contra el cáncer de mama, cáncer al colon, cáncer de próstata y algunos actividad antioxidante (Moreau *et al.*, 2002; Weingärtner *et al.*, 2014).

Finalmente, a la fecha, no existen investigaciones relacionadas con la evolución de los glucosinolatos, compuestos fenólicos y  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha, debe advertirse que todas estas etapas fueron realizadas de manera tradicional con tecnologías que hasta la fecha se siguen utilizando en las comunidades campesinas de la Meseta de Bombón. El

secado post-cosecha de la maca, sigue considerándose una etapa crítica, porque en ella ocurren los cambios bioquímicos más trascendentales que influyen en su valor biológico y comercial. Brevemente, el secado al medio ambiente se lleva a cabo durante aproximadamente 90 días en condiciones de temperaturas extremas que van de -10 a 15 °C y humedades relativas de 70 a 95%. Estas condiciones ambientales extremas junto con los procedimientos de manipulación durante la cosecha y post-cosecha pueden tener efectos significativos en el contenido final de glucosinolatos, compuestos fenólicos y  $\beta$ -sitosterol en la maca.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en el contenido de glucosinolatos, compuestos fenólicos y  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en el perfil, contenido de glucosinolatos y actividad de la mirosinasa en los hipocótilos de tres ecotipos de maca.
2. Determinar el efecto de las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en el perfil, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en los hipocótilos de tres ecotipos de maca.
3. Determinar el efecto de las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en el contenido de  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca.

## **1.6 Referencias Bibliográficas**

- Aliaga, R; Espinoza, E; Rodríguez, G; Villagómez, V; Janampa, M; Bazán, R; Blas, R; Llanos, N. 2011. La cadena de valor de la maca en la Meseta del Bombón. Análisis y lineamientos estratégicos para su desarrollo. Disponible en <http://bibliotecavirtual.minam.gob.pe/biam/bitstream/handle/minam/1432/BIV01208.pdf>.
- Balasundram, N; Sundram, K; Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-



- industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:191-203.
- Blomhoff, R. 2005. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 16:47-54.
- Blomhoff, R; Carlsen, MH; Andersen, LF; Jacobs, DR. 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition* 96: (Suppl. 2), S52-S60.
- Boutté, Y; Grebe, M. 2009. Cellular processes relying on sterol function in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:705-713.
- Carocho, M; Ferreira, ICFR. 2013. The role of phenolic compounds in the fight against cancer – a review. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* 13:1236-1258.
- Cartea, ME; Francisco, M; Soengas, P; Velasco, P. 2011. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. Review. *Molecules* 16:251-280.
- Cheyrier, V; Comte, G; Davies, KM; Lattanzio, V; Martens, S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* 72:1-20.
- Clément, C; Diaz, DA; Avula, B; Khan, IA; Mayer, AC; Ponce-Aguirre, DD; *et al.* 2009. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of maca (*Lepidium meyenii* Walpers). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:861-869.
- Clément, C; Diaz, DA; Manrique, I; Avula, B; Khan, IA; Ponce-Aguirre, DD; *et al.* 2010. Secondary metabolites in maca as affected by hypocotyl colour, cultivation history, and site. *Agronomy Journal* 102:431-439.
- Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo (PROMPERÚ) (2017). Exportación del producto maca según sus principales mercados en kg 2012 – 2017. Disponible en <http://www.siicex.gob.pe/siicex/apb/ReporteProducto.aspx?psector=1025&preporte=prodmercvolu&pvalor=1934>.
- Conferencia de las Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo (UNCTAD) (2007:4). Iniciativa Biotrade. Principios y criterios de biocomercio. Naciones Unidas. Nueva York/ Ginebra. Disponible en [http://unctad.org/es/Docs/ditcted20074\\_sp.pdf](http://unctad.org/es/Docs/ditcted20074_sp.pdf).
- de Pascale, S; Maggio, A; Pernice, R; Fogliano, V; Barbieri, G. 2007. Sulphur fertilization may improve the nutritional value of *Brassica rapa* L. subsp. *Sylvestris*. *European Journal of Agronomy* 26:418-424.
- del Valle, J; Pumarola, T; Alzamora, L; del Valle, LJ. 2014. Antiviral activity of maca

- (*Lepidium meyenii*) against human influenza virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7(Suppl 1): S415-S420.
- Dini, A; Migliuolo, G; Rastrelli, L; Saturnino, P; Schettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* 49:347-349.
- Dinkova-Kostova, AT; Kostov, RV. 2012. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. Review. *Trends in Molecular Medicine* 18:337-347.
- Diplock, AT; Aggett, PJ; Ashwell, M; Bornet, F; Fern, EB; Roberfroid, MB. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition* 81: (suppl. 1), S1-S27.
- Fahey, JW; Zalcmann, AT; Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Gasco, M; Villegas, L; Yucra, S; Rubio, J; Gonzales, GF. 2007. Dose-response effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone enanthate. *Phytomedicine* 14:460-464.
- Gonzales, C; Rubio, J; Gasco, M; Nieto, J; Yucra, S; Gonzales, GF. 2006. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103:448-454.
- Gonzales, GF. 2012. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a plant from the Peruvian highlands. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:1-10.
- Gonzales, GF; Córdova, A; Gonzales, C; Chung, A; Vega, K; Villena, A. 2001b. *Lepidium meyenii* (maca) improved semen parameters in adult men. *Asian Journal of Andrology* 3:301-304.
- Gonzales, GF; Gasco, M; Córdova, A; Chung, A; Rubio, J; Villegas, L. 2004. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *Journal of Endocrinology* 180:87-95.
- Gonzales, GF; Miranda, S; Nieto, J; Fernández, G; Yucra, S; Rubio, J; *et al.* 2005. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3:5,1-16.
- Gonzales, GF; Ruiz, A; Gonzales, C; Villegas, L; Córdova, A. 2001a. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian Journal of Andrology* 3:231-233.
- Gonzales, GF; Villaorduña, L; Gasco, M; Rubio, J; y Gonzales, C. 2014. Maca (*lepidium*

- meyenii* walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 31:100-110.
- Kritchevsky, D; Chen, SC. 2005. Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research* 25:413-428.
- Lee, KJ; Dabrowski, K; Sandoval, M; Miller, MJS. 2005. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their anti-oxidant activities and effects on growth, feed utilization and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture* 244:293-301.
- Li, G; Ammermann, U; Quirós, CF. 2001. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 55:255-262.
- López-Nicolás, JM; García-Carmona, F. 2010. “Enzymatic and Nonenzymatic Degradation of Polyphenols”, 101-129, en LA. de la Rosa; E. Alvarez-Parrilla; GA. González-Aguilar Eds. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability* (first edition), Blackwell Publishing Iowa, USA.
- Maerker, G; Nungesser, EH; Bunick, FJ. 1988. Reaction of cholesterol 5,6-epoxides with simulated gastric juice. *Lipids* 23:761-765.
- Moreau, RA; Whitaker, BD; Hicks, KB. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. Review. *Progress in Lipid Research* 41:457-500.
- Nguyen, HTM; Neelakadan, AK; Quach, TN; Valliyodan, B; Kumar, R; Zhang, Z; Nguyen, HT. 2013. Molecular characterization of *Glycine max* squalene synthase genes in seed phytosterol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 73:23-32.
- O’Callaghan, Y; McCarthy, FO; O’Brien, NM. 2014. Recent advances in phytosterol oxidation products. Review. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446:786-791.
- Otaegui-Arrazola, A; Menéndez-Carreño, M; Ansorena, D; Astiasarán, I. 2010. Oxysterols: A world to explore. Review. *Food and Chemical Toxicology* 48:3289-3303.
- Pandey KB; Rizvi SI. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2:5, 270-278.
- Rosa, EAS; Heaney, RK; Portas, CA; Roger, G. 1996. Changes in glucosinolate concentrations in *Brassica* crops (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing

- seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:237-244.
- Rubio, J; Dang, H; Gong, M; Liu, X; Chen, S.-L; Gonzales, GF. 2007. Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black Maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food and Chemical Toxicology* 45:1882-1890.
- Sandoval, M; Okuhama, NN; Angeles, FM; Melchor, VV; Condezo, LA; Lao, J; *et al.* 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry* 79:207-213.
- Schaller, H. 2004. New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. Review. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:465-476.
- Tiwari, U; Cummins, E. 2013. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. *Food Research International* 50:497-506.
- Valentová, K; Buckiová, D; Křen, V; Pěkníková, J; Ulrichová, J; Šimánek, V. 2006. The *in vitro* biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biology and Toxicology* 22:91-99.
- Verkerk, R; Dekker, M; Jongen, WMF. 2001. Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:953-958.
- Wang, Y; Wang, Y; McNeil, B; Harvey, LM. 2007. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Research International* 40:783-792.
- Weingärtner, O; Baber, R; Teupser, D. 2014. Plant sterols in food: No consensus in guidelines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446:811-813.

## II. CAPÍTULO II

**Evolución del contenido de glucosinolatos y actividad mirosinasa en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha**

Artículo publicado en *Food Chemistry* 127 (2011) 1576-158

### RESUMEN

Se evaluaron los perfiles de glucosinolatos, contenido de glucosinolatos y actividad mirosinasa en hipocótilos de maca amarilla, roja y negra durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha. En la cosecha, se identificaron seis glucosinolatos (GLs): 5-metilsulfonilpentil, 4-hidroxibencil, bencil, 3-metoxibencil, 4-hidroxi-3-indolilmetil y 4-metoxi-3-indolilmetil glucosinolatos, de los cuales el bencil glucosinolato fue el más abundante en los tres ecotipos, representando el 80% de los GLs totales. Se observó un incremento significativo en GLs en los tres ecotipos durante los 90 días antes de la cosecha y durante los 15-30 días de secado post-cosecha. Esto fue seguido de una importante disminución de los GLs durante el período de 30 a 45 días, que se atribuyó a la ruptura celular, debido a las fluctuaciones en las temperaturas durante el proceso de secado y se correlacionó con una alta actividad de mirosinasa. Durante el último período de secado post-cosecha, los GLs considerablemente disminuidos se correlacionaron con una baja actividad de mirosinasa y baja humedad del hipocótilo de maca. Una combinación de la técnica artesanal y otras técnicas de procesamiento deberían ser utilizadas con el fin de preservar mejor los glucosinolatos de la maca.

**Palabras clave:** Maca, *Lepidium meyenii*, pre y post-cosecha, glucosinolatos y actividad mirosinasa

## ABSTRACT

Glucosinolate profiles, glucosinolate contents and myrosinase activity were evaluated in yellow, red and black hypocotyls of maca during pre-harvest, at harvest and during post-harvest drying. At harvest, six glucosinolates (GLs) were identified: 5-methylsulfinylpentyl, 4-hydroxybenzyl, benzyl, 3-methoxybenzyl, 4-hydroxy-3-indolylmethyl and 4-methoxy-3-indolylmethyl, of which benzyl glucosinolate was the most abundant in the three ecotypes, representing 80% of the total GLs. A significant increase in GLs was observed for the three ecotypes during the 90 days before harvest and during the 15-30 days of post-harvest drying. This was followed by an important decrease of GLs during the 30-45 day period, which was attributed to cell breakdown, due to fluctuations in temperatures during the drying process, and was correlated with a high myrosinase action. During the last period of post-harvest drying, GLs were much lower and correlated to lower myrosinase activity and lower maca hypocotyl humidity. A combination of artisanal and other processing techniques should be utilised, in order to best preserve maca glucosinolates.

**Keywords:** Maca, *Lepidium meyenii*, pre and post-harvest, glucosinolates and myrosinase activity

### 2.1 Introducción

La Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) es un cultivo andino tradicional perteneciente a la familia *Brassicaceae* que crece en altitudes entre los 3,500 y 4,500 metros sobre el nivel del mar en la región andina central del Perú. Esta zona se caracteriza por tener terrenos áridos y rocosos, con intensa luz solar, fuertes vientos y temperaturas bajo cero. Pocos cultivos pertenecientes a la familia de las *solanáceas* pueden sobrevivir en condiciones tan severas (Flores *et al.*, 2003).

El valor nutricional de este cultivo ha sido ampliamente estudiado (Dini *et al.*, 1994; Valentová *et al.*, 2006) y se han observado efectos estimulantes. En los Andes peruanos, el uso folklórico de este cultivo incluye el tratamiento de la infertilidad, incremento de la energía física y mental y tratamiento de la menopausia. Las propiedades nutricionales de la harina de maca y efectos aparentes sobre el rendimiento reproductivo y sexual en ratas y seres humanos han sido ampliamente documentados (Gonzales *et al.*, 2001a; Gonzales *et al.*, 2001b; Gonzales *et al.*, 2004). Sin embargo, los estudios relacionados con la mejora del

rendimiento sexual siguen siendo controversiales (Wang *et al.*, 2007). La maca, además, mostró funciones anti-proliferativas y retardó el incremento de peso de la próstata inducida debido al tratamiento con testosterona (Gonzales *et al.*, 2005, 2006). Las ratas a las que se les administró por vía oral maca roja, mostraron efectos beneficiosos en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (HBP) inducida experimentalmente por testosterona (Gasco *et al.*, 2007). Dentro de los mecanismos propuestos para esta función anti-proliferativa están su capacidad para eliminar los radicales libres y la citoprotección en condiciones de estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2005; Sandoval *et al.*, 2002). La presencia de alcaloides y esteroides en la maca también pueden haber contribuido a su atribuida actividad anticancerígena (Wang *et al.*, 2007), así como sus glucosinolatos y derivados (Fahey *et al.*, 2001). La presencia de fitoesteroides y otros metabolitos secundarios en la maca están relacionadas con su función anti-osteoporosis postmenopáusicas (Wang *et al.*, 2007).

Los glucosinolatos (GLs) son los metabolitos secundarios más importantes en la maca (Johns, 1981) siendo la mayoría de ellos de tipo aromático (Li *et al.*, 2001; Dini *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2003), de los cuales el glucotropaeolin es el más abundante. Según Clément *et al.* (2009) del 80-90% de los GLs totales en la maca correspondieron al glucotropaeolin. Los GLs en la maca están presentes en diferentes órganos de la planta (por ejemplo, semillas, brotes). Los GLs en la maca varían en contenido y tipo dependiendo de la edad de la planta y del color del hipocótilo (Clément *et al.*, 2010). El contenido de glucosinolatos en la maca fresca es aproximadamente el 1%, unas 100 veces más que la encontrada en los cultivos de crucíferas, como la col, coliflor y brócoli (Li *et al.*, 2001). El mayor contenido de glucosinolatos totales en la maca se encontró en los hipocótilos frescos, seguido de las semillas, brotes, hipocótilos secos y hojas frescas (Li *et al.*, 2001). La mirosinasa está implicado en la degradación de los GLs en isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos (Fahey *et al.*, 2001). En las células intactas, los GLs y la mirosinasa están en diferentes compartimentos. Por lo tanto, el daño celular favorece la ruptura de GLs por la mirosinasa. Los efectos de la variedad, las prácticas de cultivo, el tiempo de cosecha, el clima y el procesamiento en el contenido de GLs han sido ampliamente documentados (Rosa *et al.*, 1996; Kushad *et al.*, 1999; Verkerk *et al.* 2001; Mrkic *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta donde sabemos, no existen estudios relacionados con el contenido y el destino de GLs de la maca durante el secado post-cosecha.

El potencial funcional y nutracéutico de la maca se ha traducido en un aumento significa -

tivo de su producción, como resultado de un aumento sostenible de las exportaciones (de 189 a 602 Tn entre 1999 y 2009). Los principales productos de exportación son: harina de maca (secado y molido), harina de maca gelatinizada (secado, extruido y molido), maca encapsulada y extractos hidroalcohólicos. Los principales destinos de exportación son Estados Unidos y Japón (Aliaga y Espinoza, 2007).

Independientemente de los productos, el secado post-cosecha de la maca se realiza de manera artesanal en los lugares de producción, antes de que se realicen otras formas de procesamiento (extrusión, molienda, etc). Brevemente, el secado al medio ambiente se lleva a cabo durante aproximadamente 90 días en condiciones de temperaturas extremas que van de -10 a 15 °C. Estas condiciones ambientales extremas junto con los procedimientos de manipulación durante la cosecha y post-cosecha pueden tener un efecto significativo en el contenido final de glucosinolatos en la maca.

Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la serie de eventos que tienen lugar durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en tres ecotipos de maca en el perfil, contenido de glucosinolatos y actividad de la mirosinasa. Comprendiendo los eventos de ruptura de GLs en la maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha permitiría sugerir mejores alternativas para reducir las pérdidas de GLs y producir productos de maca con un mayor valor agregado.

## **2.2 Materiales y Métodos**

### **2.2.1 Material vegetal**

Tres diferentes ecotipos de maca (amarilla, roja y negra) fueron seleccionados de una plantación comercial. El cultivo se llevó a cabo en noviembre del 2007 en la comunidad de San Pedro de Cajas a 4200 metros sobre el nivel del mar (Junín, Perú). Los tubérculos de maca se cosecharon en julio del 2008. Las muestras fueron tomadas al azar de la siguiente manera: (a) se tomaron muestras de 10 plantas (~2 kg) a los 90, 45, 30 y 15 días antes de la cosecha, (b) en la cosecha y (c) después de 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días de secado post-cosecha. Después de la cosecha, los hipocótilos, formando montones, fueron expuestos al medio ambiente en el lugar de la cosecha con el objetivo de secar parcialmente las hojas y la tierra impregnada durante 2 días, luego son sacudidos, utilizando una malla, para eliminar la tierra y colocados en costales de rafia de aproximadamente 50 kg y mantenidos



en tales condiciones por 3 días. Después de este período, fueron transportados a la zona de secado donde se extendieron en rumas de aproximadamente 10 cm de altura. Durante las noches, los tubérculos de maca se cubrieron con carpas para protegerlos de las condiciones de congelación (-10°C). Las temperaturas de secado variaron de -10 a 15 °C y la humedad relativa de 70% a 90%. Las muestras de tubérculos de maca se transportaron al laboratorio, donde se lavaron con agua potable y agua destilada, se secaron con papel toalla y se envasaron en bolsas de polietileno negro para conservarlos a -20 °C hasta el momento de su análisis.

### **2.2.2 Estándares y reactivos químicos**

El metanol fue de Fermont (México, DF); se utilizaron acetonitrilo de grado HPLC, acetato de sodio, fosfato de sodio dihidrogenado monohidratado, fosfato disódico hidrogenado dihidratado de Merck (Darmstadt, Alemania). DEAE Sephadex A-25, sulfatasa de *Helix pomatia* tipo H-1 y sinigrina hidratado (Biochemika) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Bencilglucosinolato de KVL (Copenhague, Dinamarca) y rapeseed BC-367 ERM de IRMM (Geel, Bélgica) se utilizaron como estándares de glucosinolatos.

### **2.2.3 Determinación de humedad**

La humedad fue determinada según el método AOAC (1998).

### **2.2.4 Extracción de glucosinolatos**

Se utilizó el protocolo descrito por Verkerk *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Los hipocótilos de maca se congelaron con nitrógeno líquido e inmediatamente se fraccionaron y molieron para evitar la acción de la mirosinasa. La pulpa de maca (~1 g MS) se pesó y mezcló con 10 ml de metanol caliente al 70%. Las muestras se incubaron en baño maría a 75 °C durante 25 min y luego se centrifugaron a 4500 g por 20 min. El sobrenadante se recolectó y la torta se volvió a re-extraer con 10 ml de metanol caliente al 70%, similar a la primera extracción. Ambos sobrenadantes se combinaron y mezclaron. Los extractos de glucosinolatos se purificaron en una columna de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-25 de 1.5 cm. La columna se lavó dos veces con 1 ml de agua Milli-Q y se alimentaron con 2 ml del extracto de GLs extraídos y se lavó dos veces con 1 ml de una solución de 20 mM de NaAc. La enzima sulfatasa (100 µl de una solución de 25 mg/ml) se añadió a la columna. La incubación se llevó a cabo durante la noche a temperatura ambiente.

Los desulfoglucosinolatos se eluyeron con 4 ml de agua Millipore. El eluido se filtró a través de un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$  (13 mm, Millipore Corporation, Billerica, MA) y esta muestra fue disponible para el análisis HPLC.

### **2.2.5 Análisis por HPLC de glucosinolatos**

Los desulfoglucosinolatos de maca se analizaron mediante cromatografía líquida de alta performance. Se utilizó un módulo de separación de HPLC Waters 2695 (Waters, Milford, MA) equipado con un autoinyector, un detector de matriz de fotodiodos (PDA) 2996 con software autorizado y columna (Waters) Atlantis C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm) y una pre-columna de seguridad 4.6 x 2.0 mm, para la separación a 28 °C con una velocidad de flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup>, se inyectó 20  $\mu\text{l}$  de muestra. La elución de los desulfoglucosinolatos de la columna de HPLC se realizó por un sistema de gradiente de agua (**A**) y acetonitrilo/agua (20:80, v/v, **B**). El tiempo total de corrida fue de 35 min con la siguiente gradiente: 98% de **A** durante 1 min, luego en 35 min a 75% de **A**, y en 1 min de nuevo a 98% de **A** y volver a equilibrar durante 10 min. La elución se monitoreó por un detector de matriz de fotodiodos entre 200 y 400 nm (con 2 nm de intervalo). Los desulfoglucosinolatos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y las características espectrales UV para desulfoglucosinolatos de estándares puros de sinigrina, glucotropaeolin, el patrón de glucosinolatos típico de semillas de canola (*Brassica napus*) BCR-367 (Linsinger *et al.*, 2001) y extractos purificados de coliflor blanca, col roja y mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). La detección se realizó a 229 nm. Las concentraciones molares de los glucosinolatos individuales y los factores de respuesta relativos (Brown *et al.*, 2003; Linsinger *et al.*, 2001) se utilizaron para corregir las diferencias de absorbancia entre el patrón interno (sinigrina) y los otros componentes del extracto. Los GLs totales se expresaron como  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de materia seca (MS) ( $\text{mmol kg}^{-1}$  MS) y determinada por la suma de todos los GLs individuales (Linsinger *et al.*, 2001).

### **2.2.6 Actividad mirosinasa (tioglucósido glucohidrolasa, EC 3.2.3.1)**

Se utilizó la metodología descrita por Verkerk y Dekker (2004) con algunas modificaciones. Los hipocótilos de maca se homogenizaron en una licuadora comercial con buffer fosfato 100 mM (pH 6.0) en una relación de 1:10 (m/v). Esta solución fue filtrada para eliminar las partículas sólidas e incubadas en un baño maría a 40 °C durante 2 h para hidrolizar los glucosinolatos endógenos. Cinco mililitros del extracto hidrolizado fue tratado con 1 ml de sinigrina 6 mM a 40 °C durante 20 min. La reacción se detuvo con

12 ml de metanol caliente (~75 °C) durante 10 min a 75 °C. El extracto se centrifugó a 6,000 g por 15 min. El extracto fue purificado, desulfatado y analizado por HPLC tal como se detalló en las Secciones 2.2.4 y 2.2.5. La actividad mirosinasa se expresó como la cantidad de sinigrina transformado en  $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ .

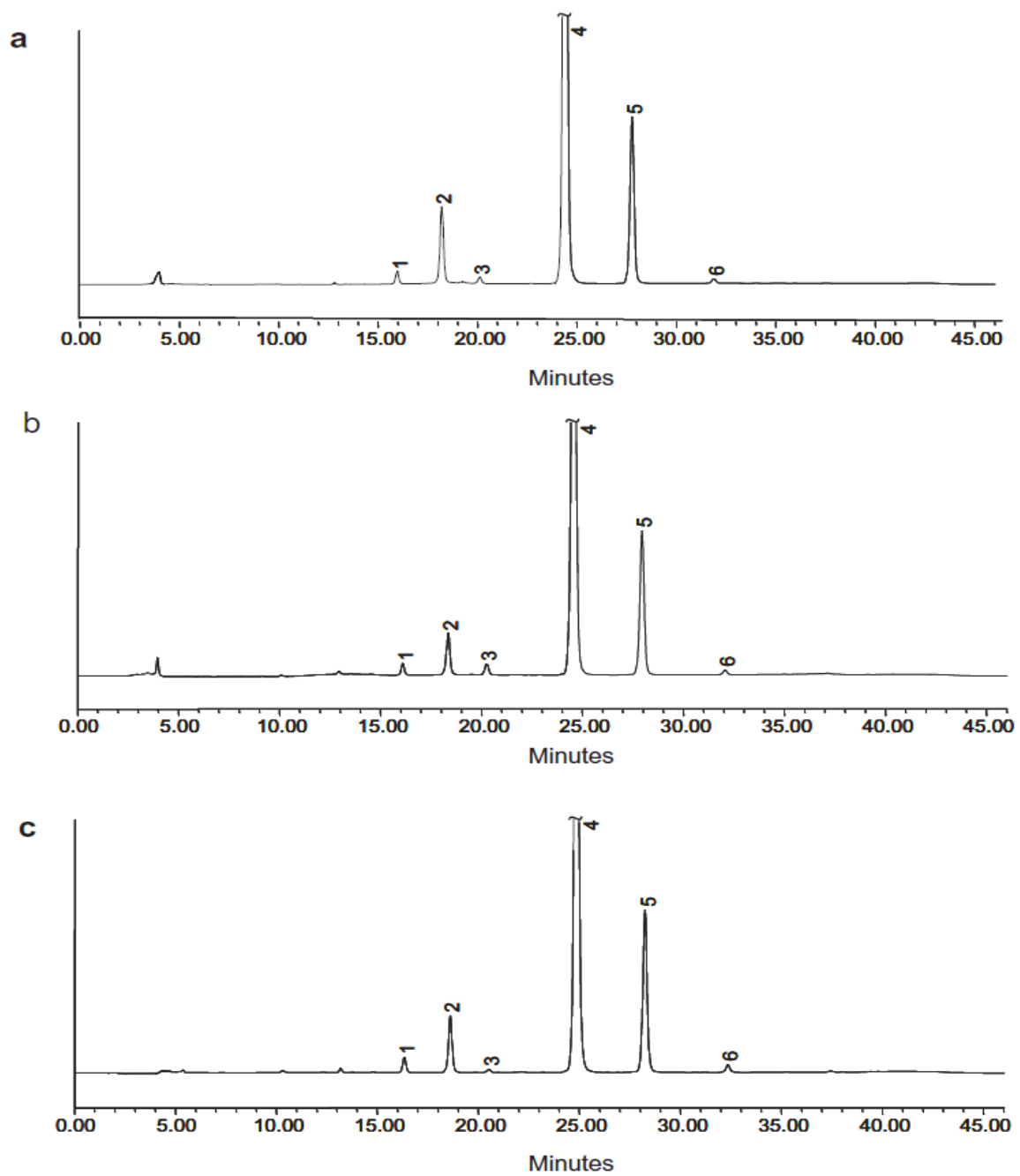
### **2.2.7 Análisis estadístico**

Se realizaron tres repeticiones en todos los análisis. Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza de un factor. Se utilizó la prueba de Duncan para evaluar la diferencia de medias entre los diferentes tratamientos. Diferencias a un  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos. El software SPSS 14.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL) fue utilizado para llevar a cabo todos los análisis estadísticos.

## **2.3 Resultados y Discusión**

### **2.3.1 Identificación y cuantificación de glucosinolatos durante la cosecha en tres ecotipos de maca**

En los tres ecotipos de maca fueron identificados seis glucosinolatos diferentes (Figura 8). Estos glucosinolatos correspondieron a tres aromáticos: 4-hidroxibencil (glucosinalbin), bencil (glucotropaeolin) y 3-metoxibencil (glucolimnantin); un alifático: 5-metilsulfonilpentil (gucoalissin) y dos indólicos: 4-hidroxi-3-indolilmetil (4-hidroxi-glucobrassicin) y 4-metoxi-3-indolilmetil (4-metoxi-glucobrassicin) (Tabla 1).



**Figura 8.** Perfiles HPLC de glucosinolatos en los ecotipos de maca amarilla, roja y negra durante la cosecha (maca fresca): (a) amarilla (b) roja y (c) negra. (1) Glucoalissin, (2) glucosinalbin, (3) 4-hidroxi glucobrassicin, (4) glucotropaeolin, (5) glucolimnantin y (6) 4-metoxi glucobrassicin.

**Tabla 1.** Contenido de glucosinolatos en los ecotipos de maca amarilla, roja y negra durante la cosecha.

Nombre sistemático	Nombre común	Clase	Amarilla (mmol kg-1 MS) <sup>A</sup>	Roja (mmol kg-1 MS) <sup>A</sup>	Negra (mmol kg-1 MS) <sup>A</sup>
5-Metilsulfinilpentil glucosinolato	Glucoalisin	Alifático	0.25 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>b</sup>
4-Hidroxibencil glucosinolato	Glucosinalbin	Aromático	1.03 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>a</sup>
Bencil glucosinolato	Glucotropaeolin	Aromático	29.1 ± 1.67 <sup>a</sup>	28.4 ± 0.42 <sup>a</sup>	25.2 ± 0.75 <sup>a</sup>
3-Metoxibencil glucosinolato	Glucolimnantin	Aromático	5.77 ± 0.73 <sup>a</sup>	5.51 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.18 ± 0.16 <sup>a</sup>
4-Hidroxil-3-indolilmetil glucosinolato	4-Hidroxiglucobrassicin	Indólico	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>
4-Metoxil-3-indolilmetil glucosinolato	4-Metoxiglucobrassicin	Indólico	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>a</sup>
		Total	36.2 ± 2.12 <sup>a</sup>	34.9 ± 0.56 <sup>a</sup>	31.4 ± 0.94 <sup>a</sup>

<sup>A</sup>Los resultados son promedios ± SD (n = 3).

Medias dentro de una fila con el mismo superíndice no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

La presencia de glucoalisin se confirmó con el perfil de glucosinolatos de coliflor blanca (Ciešlik *et al.*, 2007). Este glucosinolato es importante en *Lepidium* (Fahey *et al.*, 2001). El glucotropaeolin se confirmó con un estándar externo. El glucolimnantin (3 - metoxibencil) es el segundo glucosinolato más importante en la maca (pico 5, Figura 8) como fue reportado por Piacente *et al.* (2002) y Clément *et al.* (2010). La presencia de glucoaubrietin se descartó a través de ensayos realizados con *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon como lo reportó Ramallo *et al.* (2004) quien destacó que este es el glucosinolato más importante en mashua. El 4-hidroxiglucobrassicin se confirmó con los tiempos de retención y los espectros de absorción de los glucosinolatos encontrados en semillas de canola BCR-367 y en extractos de col roja y coliflor blanca (Oerlemans *et al.*, 2006). El 4-metoxiglucobrassicin se confirmó con los perfiles de col roja y coliflor blanca (Volden *et al.*, 2009). Li *et al.* (2001) identificaron y cuantificaron GLs en diferentes partes de la planta de maca y productos procesados. Así, en el hipocótilo de maca amarilla fresca se reportaron ocho glucosinolatos: 5-metilsulfinilpentil glucosinolato (glucoalisin), 4-hidroxibencil glucosinolato (glucosinalbin), 3-hidroxibencil glucosinolato (identificación tentativa), 4-pentenil glucosinolato (glucobrassicin), bencil glucosinolato (glucotropaeolin), indol-3-ilmetil glucosinolato (glucobrassicin), 4-metoxibencil glucosinolato (glucoaubrietin) y 4-metoxiindol-3-ilmetil glucosinolato (4-metoxiglucobrassicin). Recientemente, Clément *et al.* (2009) identificaron y cuantificaron diferentes GLs en ecotipos de maca amarilla, rosada, violeta y plomo. Estos correspondieron a: glucotropaeolin, glucolimnantin (alternativamente glucoaubrietin), glucosinalbin, 4-hidroxiglucobrassicin, glucoalisin y glucorafanin. Dini *et al.* (2002) identificaron glucotropaeolin y glucolimnantin en harina de maca y sugirieron el uso de estos dos GLs como marcadores quimiotaxonómicos para esta especie ya que esta

combinación de GLs no ocurre en otras plantas de la familia *Brassicaceae*. Sin embargo, está claro que el más importante GL corresponde a glucotropaeolin. Clément *et al.* (2009) reportaron que el 80-90% de los GLs totales en maca correspondió a glucotropaeolin.

La cuantificación de los GLs totales en los ecotipos amarilla, roja y negra reportó, 36.2, 34.9 y 31.4 mmol kg<sup>-1</sup> MS (corresponde a 30.4, 28.2 y 25.1 mmol kg<sup>-1</sup> MF), respectivamente. La suma de los GLs aromáticos representaron en promedio 99% del contenido total de GLs (35.9, 34.5 y 31.1 mmol kg<sup>-1</sup> MS) de los cuales, glucotropaeolin fue el más abundante en los tres ecotipos (29.1, 28.4, 25.2 mmol kg<sup>-1</sup> MS) representando alrededor del 80% de los GLs totales. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en GLs totales, GLs aromáticos y glucotropaeolin para los tres ecotipos de maca. Clément *et al.* (2010) reportaron diferencias en GLs respecto al color del ecotipo de maca. Sin embargo, para el ecotipo de maca amarilla, los GLs fueron superiores a los reportados por Li *et al.* (2001) (25.7 y 16.9 mmol kg<sup>-1</sup> MS para GLs totales y glucotropaeolin, respectivamente). Clément *et al.* (2010) reportaron valores de 37.2, 36.4 y 31.4 mmol kg<sup>-1</sup> MS para GLs totales, GLs aromáticos y glucotropaeolin, respectivamente. Estos valores fueron similares a los reportados en este trabajo. Nuestros resultados demuestran que la maca es una fuente importante de glucosinolatos aromáticos. Investigaciones en bencil isotiocianato y su precursor bencil glucosinolato como quimiopreventivos del cáncer están siendo documentados (Higdon *et al.*, 2007). El contenido del GL alquiltioalquil (glucoalissin) de 0.25, 0.23 y 0.28 mmol kg<sup>-1</sup> MS se encontró en los ecotipos amarillo, rojo y negro, respectivamente. Estos valores representaron de 0.6% a 0.9% de los GLs totales y los indol GLs representaron de 0.2% a 0.3% del total de GLs. Clément *et al.* (2010) reportaron contenidos de alquiltioalquil GL (glucoalissin y glucorafanin) de 0.42, 0.71, 2.0 y 0.49 mmol kg<sup>-1</sup> MS (1-6.5% de los GLs totales) para los ecotipos de maca amarilla, rosada, violeta y plomo. Los GLs indólicos se encontraron en cantidades menores (0.06-0.09 mmol kg<sup>-1</sup> MS), comparados con los valores de 0.15 a 0.26 mmol kg<sup>-1</sup> MS encontrados por Clément *et al.* (2010). Las diferencias encontradas en el perfil y contenido de GLs entre este trabajo y el de Clément *et al.* (2010) podrían estar relacionados con el hecho de que ellos trabajaron con accesiones de laboratorio y condiciones experimentales de cultivo. La variación en la cantidad y perfil de GLs es atribuido a factores genéticos y ambientales, edad y partes de la planta, ataque de depredadores, temperatura, estrés hídrico, tipo de suelo y factores agronómicos (Velasco *et al.*, 2007). Las prácticas de cultivo en este trabajo correspondieron a las prácticas culturales de los campesinos de las -

comunidades locales.

### **2.3.2 Perfiles y contenido de glucosinolatos para los tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha**

El período pre-cosecha es considerado como la etapa biosintética de glucosinolatos y otros compuestos bioactivos en los hipocótilos. La biosíntesis de glucosinolatos puede ser dividido en tres fases: (i) formación del ácido 2-oxo con un grupo metileno adicional (ii) formación de la estructura del núcleo de glucosinolatos y (iii) transformación del grupo R. Los genes implicados han sido identificados en las tres fases de biosíntesis (Halkier y Gershenzon, 2006). Sólo existen pocos estudios en brotes pero raramente durante la pre-cosecha.

El contenido total de glucosinolatos se incrementó durante el crecimiento de los hipocótilos (Tabla 2). Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes tiempos de pre-cosecha. Noventa días antes de la cosecha y en la cosecha, se obtuvieron valores de 11.3 y 36.2, 10.5 y 34.9, 11.2 y 31.4 mmol kg<sup>-1</sup> MS para los hipocótilos amarillo, rojo y negro respectivamente. Durante la etapa pre-cosecha, sólo se encontró una pequeña cantidad de glucoalissin. La mayoría de los GLs totales (99%) correspondieron al tipo aromático (glucosinalbin + glucotropaeolin + glucolimnatin) de los cuales 75.6 a 87.4% correspondieron a glucotropaeolin. No se detectaron GLs indólicos durante el crecimiento. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los GLs totales en los tres ecotipos de maca para los diferentes tiempos pre-cosecha evaluados. Velasco *et al.* (2007) reportaron para hojas de col rizada (*Brassica oleracea* Grupo Acephala) tomadas a 30, 90, 180 y 300 después del cultivo que los GLs se incrementaron (8.45, 9.31, 41.03 y 44.63 μmol g<sup>-1</sup> MS respectivamente). El más importante GL, sinigrina, mostró una tendencia similar a los GLs totales. El contenido de glucobrassicin aumentó durante las tres primeras etapas de desarrollo de la planta (3.45, 4.20 y 12.6 mmol kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente), pero luego se redujo a 7.48 mmol kg<sup>-1</sup> MS a los 300 días. El incremento en el contenido total de GLs es explicado con la teoría de *novo* síntesis. También se confirmó que los glucosinolatos indólicos son más sensibles a los factores ambientales que los glucosinolatos alifáticos.

**Tabla 2.** Contenido de glucosinolatos en hipocótilos de maca durante la pre-cosecha (mmol kg<sup>-1</sup> MS).

Glucosinolatos	Pre-cosecha (días)				Cosecha
	90	45	30	15	
<b>Amarilla</b>					
Glucoalissin	0.11 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>AB</sup>	0.18 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>B</sup>
Glucosinalbin	0.37 ± 0.01 <sup>AB</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>AB</sup>	0.60 ± 0.09 <sup>B</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>C</sup>
Glucotropaeolin	8.53 ± 0.25 <sup>A</sup>	17.5 ± 1.72 <sup>B</sup>	17.8 ± 0.82 <sup>B</sup>	25.1 ± 0.57 <sup>C</sup>	29.1 ± 1.67 <sup>C</sup>
Glucolimnantin	2.26 ± 0.07 <sup>A</sup>	2.76 ± 0.27 <sup>A</sup>	3.74 ± 0.18 <sup>B</sup>	4.91 ± 0.09 <sup>C</sup>	5.77 ± 0.73 <sup>D</sup>
4-Hidroxiglucobrassicin	ND	ND	ND	ND	0.04 ± 0.01 <sup>A</sup>
4-Metoxiglucobrassicin	ND	ND	ND	ND	0.02 ± 0.01 <sup>A</sup>
Total	11.3 ± 0.33 <sup>Aa</sup>	20.7 ± 2.02 <sup>Ba</sup>	22.1 ± 1.06 <sup>Bab</sup>	30.7 ± 0.78 <sup>Cb</sup>	36.2 ± 2.12 <sup>Da</sup>
<b>Roja</b>					
Glucoalissin	0.12 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>BC</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>C</sup>
Glucosinalbin	0.38 ± 0.02 <sup>AB</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>BC</sup>	0.60 ± 0.06 <sup>D</sup>	0.58 ± 0.01 <sup>C</sup>
Glucotropaeolin	7.97 ± 0.33 <sup>A</sup>	16.0 ± 0.72 <sup>B</sup>	19.9 ± 0.49 <sup>C</sup>	26.1 ± 0.39 <sup>D</sup>	28.4 ± 0.42 <sup>E</sup>
Glucolimnantin	2.07 ± 0.07 <sup>A</sup>	2.29 ± 0.09 <sup>A</sup>	4.70 ± 0.14 <sup>C</sup>	3.04 ± 0.06 <sup>B</sup>	5.51 ± 0.02 <sup>D</sup>
4-Hidroxiglucobrassicin	ND	ND	ND	ND	0.07 ± 0.07 <sup>A</sup>
4-Metoxiglucobrassicin	ND	ND	ND	ND	0.02 ± 0.01 <sup>A</sup>
Total	10.5 ± 0.45 <sup>Aa</sup>	18.6 ± 0.84 <sup>Ba</sup>	25.2 ± 0.71 <sup>Cb</sup>	29.9 ± 0.54 <sup>Db</sup>	34.9 ± 0.56 <sup>Ea</sup>
<b>Negra</b>					
Glucoalissin	0.13 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.15 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>B</sup>
Glucosinalbin	0.29 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>AB</sup>	0.45 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.39 ± 0.00 <sup>AB</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>C</sup>
Glucotropaeolin	8.88 ± 0.63 <sup>A</sup>	14.6 ± 0.39 <sup>B</sup>	17.3 ± 0.13 <sup>C</sup>	21.9 ± 0.25 <sup>D</sup>	25.2 ± 0.75 <sup>E</sup>
Glucolimnantin	1.93 ± 0.14 <sup>A</sup>	2.26 ± 0.11 <sup>A</sup>	2.86 ± 0.03 <sup>B</sup>	3.76 ± 0.05 <sup>C</sup>	5.18 ± 0.16 <sup>D</sup>
4-Hidroxiglucobrassicin	ND	ND	ND	ND	0.01 ± 0.00 <sup>A</sup>
4-Metoxiglucobrassicin	ND	ND	ND	ND	0.06 ± 0.00 <sup>A</sup>
Total	11.2 ± 0.84 <sup>Aa</sup>	17.3 ± 0.55 <sup>Ba</sup>	20.8 ± 0.21 <sup>Ca</sup>	26.2 ± 0.30 <sup>Da</sup>	31.43 ± 0.94 <sup>Ea</sup>

Resultados son promedios ± SD (n = 3).

ND: no detectado.

Filas con la misma letra superíndice mayúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Columnas con la misma letra superíndice minúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

### 2.3.3 Perfiles y contenido de glucosinolatos para los tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha

Se observó un aumento significativo en el contenido de GLs ( $p < 0.05$ ) durante los primeros 15 días de secado post-cosecha para los hipocótilos amarillo, rojo y negro (26.3%, 36.7% y 38.5%), respectivamente. No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los 15 y 30 días de secado post-cosecha. El incremento fue similar para la suma de GLs aromáticos y glucotropaeolin (Tabla 3). Este incremento podría ser debido al stress



provocado por el acondicionamiento de los hipocótilos antes del secado. Así como, al calor sensible generado por la respiración de toda la planta (hipocótilos más hojas), el apilamiento en el campo y el embalaje en sacos o costales de aproximadamente 50 kg generaron una atmósfera modificada y por lo tanto podrían haber acelerado el metabolismo durante los primeros cuatro días. Otro evento es la translocación de los glucosinolatos de las hojas a los hipocótilos. Sin embargo, durante este período, una pequeña pérdida de GLs podría esperarse debido a la actividad de la mirosinasa, considerando que los hipocótilos son expuestos a temperaturas extremas de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante las noches y  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante el día. Durante la congelación y descongelación, las células son fracturadas, la enzima y el sustrato (GLs), que se encontraban inicialmente en diferentes compartimentos, entran en contacto. Estas pérdidas atribuidas a la actividad de la mirosinasa durante este periodo fueron insignificantes en comparación con el incremento causado por el estrés inducido durante las actividades de manejo post-cosecha y la translocación de los GLs de las hojas a los hipocótilos. El brócoli almacenado durante 7 días a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  en diferentes ambientes, se observaron distintos comportamientos. Cuando se almacenaron al ambiente y  $0.5\%$  de  $\text{O}_2$  +  $20\%$  de  $\text{CO}_2$ , los GLs totales aumentaron un  $42\%$  y  $21\%$ , respectivamente, mientras que a  $20\%$  de  $\text{CO}_2$ , el contenido total de GLs disminuyó en un  $15\%$  (Hansen *et al.*, 1995). Se observó un importante incremento en el nivel de glucosinolatos indólicos en la col y el brócoli después de cortarlos y almacenarlos por 48 h en condiciones ambientales. En la col blanca aumentó 15 veces el contenido de 4-metoxi- y 1-metoxi-3-indolilmetil glucosinolatos, mientras que en el brócoli aumentó 3.5 y 2 veces el contenido de 4-hidroxi- y 4-metoxi-3-indolilmetil-glucosinolatos, respectivamente. En estos casos, la hidrólisis de GLs inducida por la actividad de la mirosinasa parece ser contrarrestada por el incremento post-cosecha de los glucosinolatos indólicos debido a un estrés inducido (Verkerk *et al.*, 2001). Según Hodges *et al.* (2006), el incremento en el contenido de gluconapin y glucobrassicin en la coliflor a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  en condiciones de atmósfera modificada podrían estar relacionados con los cambios metabólicos asociados con la senescencia natural y/o por el estrés inducido. Las hojas de col rizada (*Brassica oleracea* Grupo Acephala) deben ser consumidos preferentemente entre los 180 y 300 días después del cultivo, debido que a los 390 días, se produce la translocación de los GLs de las hojas a las yemas florales (Velasco *et al.*, 2007).

Entre los 30 y 45 días de secado post-cosecha, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de GLs. Después de 45 días de secado post-cosecha, se observaron pérdidas graduales. Entre los 60 y 90 días, la disminución de los GLs totales fue significativamente menor para los tres ecotipos ( $p < 0.05$ ). Esta tendencia se observó para los GLs totales, GLs aromáticos y glucotropaeolin para los tres ecotipos. Las pérdidas observadas entre 30 y 60 días de secado post-cosecha podrían estar relacionadas con la acción de la mirosinasa, debido a la ruptura de las células por los ciclos de congelación-descongelación. Las temperaturas que oscilan entre  $-10$  a  $15$  °C y la humedad de los hipocótilos (40-55%) son suficientes para que la enzima esté activa. Por otro lado, entre los 75 y 90 días de secado post-cosecha, la humedad de los hipocótilos (12-30%) restringió la acción de la mirosinasa. Al final del secado post-cosecha (90 días), el contenido de GLs totales para los ecotipos de maca amarilla, roja y negra fueron  $22.6$ ,  $27.7$  y  $15.0$  mmol kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente. Por lo tanto, se observaron pérdidas de GLs totales de 37.6, 20.4 y 52.4% para los ecotipos de maca amarilla, roja y negra, respectivamente.

**Tabla 3.** Contenido de glucosinolatos en hipocótilos de maca durante el secado post-cosecha (mmol kg<sup>-1</sup> MS).

Glucosinolatos	Cosecha	Post-cosecha (días)					
		15	30	45	60	75	90
<b>Amarilla</b>							
Glucolissin	0.25 ± 0.01 <sup>AB</sup>	0.40 ± 0.03 <sup>B</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.21 ± 0.10 <sup>A</sup>	0.23 ± 0.04 <sup>A</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>A</sup>
Glucosinalbin	1.03 ± 0.08 <sup>CD</sup>	1.26 ± 0.08 <sup>D</sup>	0.86 ± 0.05 <sup>BC</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>A</sup>	0.70 ± 0.16 <sup>AB</sup>	0.84 ± 0.03 <sup>ABC</sup>	0.75 ± 0.00 <sup>ABC</sup>
Glucotropaeolin	29.1 ± 1.67 <sup>B</sup>	35.9 ± 1.53 <sup>C</sup>	37.9 ± 1.53 <sup>C</sup>	24.7 ± 1.43 <sup>AB</sup>	22.2 ± 2.93 <sup>A</sup>	18.1 ± 1.16 <sup>A</sup>	18.4 ± 0.37 <sup>A</sup>
Glucolimnantin	5.77 ± 0.73 <sup>B</sup>	8.00 ± 0.35 <sup>C</sup>	5.62 ± 0.24 <sup>B</sup>	4.50 ± 0.29 <sup>AB</sup>	4.54 ± 0.65 <sup>AB</sup>	4.53 ± 0.32 <sup>AB</sup>	3.28 ± 0.05 <sup>A</sup>
4-Hidroxiglucobrassicin	0.04 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.06 ± 0.03 <sup>A</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
4-Metoxiglucobrassicin	0.02 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>A</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
Total	36.2 ± 2.12 <sup>BCa</sup>	45.7 ± 2.03 <sup>Da</sup>	44.6 ± 1.85 <sup>CDa</sup>	29.9 ± 1.76 <sup>ABa</sup>	27.6 ± 3.84 <sup>Aa</sup>	23.7 ± 1.55 <sup>Ab</sup>	22.6 ± 0.44 <sup>Ab</sup>
<b>Roja</b>							
Glucolissin	0.23 ± 0.01 <sup>B</sup>	0.35 ± 0.02 <sup>C</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>BC</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>BC</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>B</sup>
Glucosinalbin	0.58 ± 0.01 <sup>A</sup>	1.21 ± 0.02 <sup>C</sup>	1.00 ± 0.07 <sup>B</sup>	0.62 ± 0.06 <sup>A</sup>	0.91 ± 0.06 <sup>B</sup>	0.88 ± 0.02 <sup>B</sup>	0.66 ± 0.02 <sup>A</sup>
Glucotropaeolin	28.4 ± 0.42 <sup>B</sup>	39.6 ± 0.15 <sup>C</sup>	40.9 ± 2.47 <sup>C</sup>	22.91 ± 2.00 <sup>A</sup>	20.00 ± 0.42 <sup>A</sup>	21.1 ± 0.08 <sup>A</sup>	22.1 ± 0.29 <sup>A</sup>
Glucolimnantin	5.51 ± 0.02 <sup>C</sup>	6.38 ± 0.03 <sup>D</sup>	6.63 ± 0.40 <sup>D</sup>	3.51 ± 0.32 <sup>A</sup>	3.67 ± 0.10 <sup>A</sup>	5.54 ± 0.01 <sup>C</sup>	4.65 ± 0.09 <sup>B</sup>
4-Hidroxiglucobrassicin	0.07 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>A</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
4-Metoxiglucobrassicin	0.02 ± 0.01 <sup>A</sup>	0.05 ± 0.02 <sup>A</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
Total	34.9 ± 0.56 <sup>Ba</sup>	47.6 ± 0.25 <sup>Ca</sup>	48.8 ± 2.98 <sup>Ca</sup>	27.2 ± 2.42 <sup>Aa</sup>	24.8 ± 0.60 <sup>Aa</sup>	27.8 ± 0.13 <sup>Ab</sup>	27.7 ± 0.41 <sup>Ac</sup>
<b>Negra</b>							
Glucolissin	0.28 ± 0.01 <sup>C</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>C</sup>	0.22 ± 0.00 <sup>BC</sup>	0.23 ± 0.01 <sup>BC</sup>	0.13 ± 0.06 <sup>AB</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>ABC</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>A</sup>
Glucosinalbin	0.69 ± 0.02 <sup>BCD</sup>	0.86 ± 0.06 <sup>D</sup>	0.81 ± 0.00 <sup>CD</sup>	0.89 ± 0.03 <sup>D</sup>	0.52 ± 0.10 <sup>AB</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>BC</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>A</sup>
Glucotropaeolin	25.2 ± 0.75 <sup>C</sup>	36.7 ± 2.51 <sup>D</sup>	34.9 ± 0.18 <sup>D</sup>	26.5 ± 0.75 <sup>C</sup>	18.4 ± 2.94 <sup>B</sup>	13.9 ± 1.57 <sup>AB</sup>	11.8 ± 0.85 <sup>A</sup>
Glucolimnantin	5.18 ± 0.16 <sup>B</sup>	5.65 ± 0.38 <sup>B</sup>	5.48 ± 0.02 <sup>B</sup>	5.37 ± 0.17 <sup>B</sup>	3.12 ± 0.55 <sup>A</sup>	3.24 ± 0.36 <sup>A</sup>	2.77 ± 0.23 <sup>A</sup>
4-Hidroxiglucobrassicin	0.01 ± 0.00 <sup>A</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>A</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
4-Metoxiglucobrassicin	0.06 ± 0.00 <sup>C</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>B</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>A</sup>	ND	ND	ND	ND
Total	31.4 ± 0.94 <sup>Ba</sup>	43.53 ± 2.93 <sup>Ca</sup>	41.4 ± 0.21 <sup>Ca</sup>	33.0 ± 0.97 <sup>Ba</sup>	22.2 ± 3.66 <sup>Aa</sup>	18.0 ± 2.00 <sup>Aa</sup>	15.0 ± 1.12 <sup>Aa</sup>

Resultados son promedios ± SD (n = 3).

ND: no detectado.

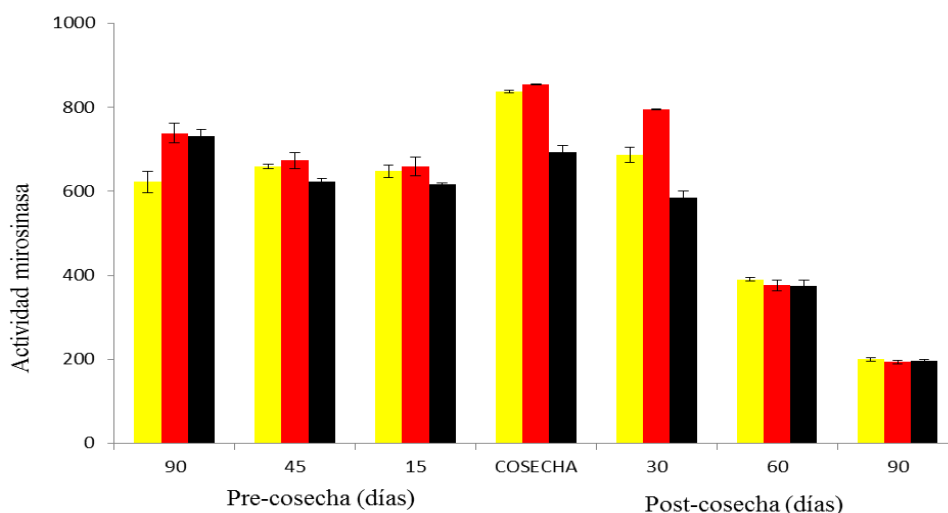
Filas con la misma letra superíndice mayúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Columnas con la misma letra superíndice minúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

### 2.3.4 Actividad de la mirosinasa durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

La enzima mirosinasa (tioglucósido glucohidrolasa, EC 3.2.1.147, anteriormente EC 3.2.3.1) cataliza la hidrólisis de los glucosinolatos en las plantas del orden *Brassicales* después de un daño tisular (Travers-Martin *et al.*, 2008).

Antes de la cosecha, la actividad de mirosinasa varió de 622 a 739 nm min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MS (Figura 9).



**Figura 9.** Actividad mirosinasa ( $\text{nmol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ ) en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

La más alta actividad de la mirosinasa fue encontrada a los 90 días antes de la cosecha para los ecotipos rojo y negro. Similar actividad de la mirosinasa fue determinada a los 45 y 15 días antes de la cosecha para los tres ecotipos ( $p > 0.05$ ). En la cosecha, la actividad de la mirosinasa aumentó considerablemente en los hipocótilos amarillo y rojo ( $838$  y  $854 \text{ nm min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ ) comparado con el ecotipo negro ( $693 \text{ nm min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ ). La actividad de la mirosinasa ( $\text{nm min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$ ) en la semilla de brócoli, cultivar calabrese fue  $\sim 7$ , aumentó a  $8.5$  después de 2 días de germinación y disminuyó a  $4.5$  al tercer día de germinación. Se mantuvo en el rango de 4 a 6 hasta los 14 días de germinación (Williams *et al.*, 2008). Según Travers-Martin *et al.* (2008) la mirosinasa está presente en diferentes formas (soluble e insoluble) y su actividad es dependiente del sustrato y la parte de la planta.

Se observaron pérdidas significativas de la actividad mirosinasa ( $p < 0.05$ ) durante la etapa de secado post-cosecha. Después de 30 días, los valores observados (% de disminución) correspondieron a:  $686$  (18.1%),  $791$  (6.8%) y  $585$  (15.5%)  $\text{nm min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$  para los ecotipos amarillo, rojo y negro, respectivamente. Después de 60 días de secado post-cosecha, estos valores fueron de:  $390$  (53.4%),  $376$  (56%) y  $376$  (45.8%)  $\text{nm min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ , para los ecotipos amarillo, rojo y negro, respectivamente. Los valores finales obtenidos al terminar el proceso de secado post-cosecha correspondieron a:  $199$  (76.1%),  $194$  (77.3%) y  $196$  (71.8%)  $\text{nm min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$ , para los ecotipos amarillo, rojo y negro, respectivamente. Después de 60 días de secado post-cosecha, se observó una actividad de la mirosinasa

inferior y se correlacionó con una menor pérdida de GLs totales entre 60 y 90 días de secado post-cosecha (Tabla 3).

La actividad de la mirosinasa durante el secado de la maca parece estar relacionada con la pérdida de agua, disponibilidad de agua, estructura de la enzima y los factores que condicionan su actividad. La presencia de varios enlaces iónicos, puentes disulfuro y enlaces puentes de hidrogeno promueven la estabilidad de la mirosinasa en el entorno extracelular donde la enzima funciona después del daño tisular. Las mirosinasas son altamente glicosilados con carbohidratos que representan hasta el 20% de su masa molecular (Halkier y Gershenzon, 2006). Varios trabajos mencionan que el sistema de glucosinolatos/mirosinasa es modificado durante el procesamiento de vegetales del género *Brassica*, debido a la inactivación parcial o total de la enzima. Además, la concentración de los glucosinolatos y la actividad de mirosinasa residual en la col fueron dependientes del método y la duración del procesamiento (Rungapamestry *et al.*, 2006). Jones *et al.* (2006) reportaron que el secado de brócoli entero a 50-65 °C conservó los glucosinolatos y la actividad de mirosinasa. Sólo cuando el producto fue rehidratado los glucosinolatos fueron hidrolizados (Rosa *et al.*, 1997).

## 2.4 Conclusiones

La maca es una fuente importante de glucosinolatos principalmente del tipo aromático (glucotropaeolin). En total, se identificaron seis glucosinolatos en los ecotipos amarillo, rojo y negro. Estos glucosinolatos correspondieron a 5-metilsulfinilpentil, 4-hidroxibencil, bencil, 3-metoxibencil, 4-hidroxi-3-indolilmetil y 4-metoxi-3-indolilmetil.

El perfil y el contenido de glucosinolatos en los tres ecotipos analizados fueron similares. Ellos aumentaron gradual y significativamente desde 90 días antes de la cosecha. Durante el secado post-cosecha (15 a 30 días) en condiciones ambientales (-10 a 15 °C, 70 a 90% de humedad relativa), los tres ecotipos de maca analizados mostraron un incremento importante de GLs totales y aromáticos. Después de 45 días y al final de este proceso, las pérdidas del 20% a 50% de los GLs totales fueron correlacionadas con una disminución de la actividad de la mirosinasa.

La técnica de secado artesanal y tradicional en los Andes peruanos debe ser revisada debido a las altas pérdidas de GLs. Podría ser evaluado, una propuesta técnica que

considere el secado en condiciones ambientales durante 15 días seguido de un escaldado para inactivar la mirosinasa para luego ser secado con aire caliente. Productos con significativo mayor valor agregado (mayor contenido de GLs) pueden ser obtenidos.

## 2.5 Referencias Bibliográficas

- Aliaga, R; Espinoza, E. 2007. La cadena de valor de maca Meseta del Bombón, Junín y Pasco Análisis y lineamientos estratégicos. Disponible en <[www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/.../5456/1/BVCI0004884.pdf](http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/.../5456/1/BVCI0004884.pdf)>.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1998. *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Brown, PD; Tokuhisa, JG; Reichelt, M, Gershenzon, J. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 62:471-481.
- Cieślik, E; Leszczyńska, T; Filipiak-Florkiewicz, A; Sikora, E; Pisulewski, PM. 2007. Effects of some technological processes on glucosinolate contents in cruciferous vegetables. *Food Chemistry* 105:976-981.
- Clément, C; Diaz, DA, Manrique, I; Avula, B; Khan, IA; Ponce-Aguirre, DD; *et al.* 2010. Secondary metabolites in maca as affected by hypocotyl colour, cultivation history, and site. *Agronomy Journal* 102:431-439.
- Clément, C; Diaz, DA; Avula, B; Khan, IA; Mayer, AC; Ponce-Aguirre, DD; *et al.* 2009. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of maca (*Lepidium meyenii* Walpers). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:861-869.
- Dini, A; Migliuolo, G; Rastrelli, L; Saturnino, P; Schettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* 49:347-349.
- Dini, I; Terone, GC; Dini, A. 2002. Glucosinolates from maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology* 30:1087-1090.
- Fahey, JW; Zalcmann, AT; Talalay, P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51.
- Flores, HE; Walker, TS; Guimarães, RL; Bsid, HP; Vivanco, JM. 2003. Andean root and tuber crops: Underground rainbows. *HortScience* 38:161-167.
- Gasco, M; Villegas, L; Yucra, S; Rubio, J; Gonzales, GF. 2007. Dose-response effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone enanthate. *Phytomedicine* 14:460-464.

- Gonzales, C; Rubio, J; Gasco, M; Nieto, J; Yucra, S; Gonzales, GF. 2006. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103:448-454.
- Gonzales, GF; Córdova, A; Gonzales, C; Chung, A; Vega, K; Villena, A. 2001b. *Lepidium meyenii* (maca) improved semen parameters in adult men. *Asian Journal of Andrology* 3:301-304.
- Gonzales, GF; Gasco, M; Córdova, A; Chung, A; Rubio, J; Villegas, L. 2004. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *Journal of Endocrinology* 180:87-95.
- Gonzales, GF; Miranda, S; Nieto, J; Fernández, G; Yucra, S; Rubio, J; *et al.* 2005. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3:5,1-16.
- Gonzales, GF; Ruiz, A; Gonzales, C; Villegas, L; Córdova, A. 2001a. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian Journal of Andrology* 3: 231-233.
- Halkier, BA; Gershenzon, J. 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annual Review of Plant Biology* 57:303-333.
- Hansen, M; Moller, P; Cantwell de Trejo, HSM. 1995. Glucosinolates in broccoli stored under controlled atmosphere. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120:1069-1074.
- Higdon, JV; Delage, B; Williams, DE; Dashwood, RH. 2007. Cruciferous vegetables and human cancer risk: Epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research* 55: 224-236.
- Hodges, DM; Munro, KD; Forney, CF; McRae, KB. 2006. Glucosinolate and free sugar content in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* cv. Freemont) during controlled-atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology* 40:123-132.
- Johns, T. 1981. The ñu and the maca. *Journal of Ethnobiology* 1:208-212.
- Jones, RB; Faragher, JD; Winkler, S. 2006. A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology* 41:1-8.
- Kushad, MM; Brown, AF; Kurilich, AC; Juvik, JA; Klein, BP; Wallig, MA; *et al.* 1999. Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleracea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:1541-1548.

- Lee, KJ; Dabrowski, K; Sandoval, M; Miller, MJS. 2005. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their anti-oxidant activities and effects on growth, feed utilization and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture* 244: 293-301.
- Li, G; Ammermann, U; Quirós, CF. 2001. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 55:255-262.
- Linsinger, T; Kristiansen, N; Beloufa, N; Schimmel, H; Pauwels, J. 2001. EUR 19764: The certification of the total glucosinolate and sulfur contents of three rapeseed (colza) materials BCR-190R, -366R and -367R.
- Mrkic, V; Redovnikovic, IR; Jolic, SM; Delonga, K; Dragovic-Uzelac, V. 2009. Effect of drying conditions on indole glucosinolate level in broccoli. *Acta Alimentaria* 39:167-174.
- Oerlemans, K; Barrett, DM; Suades, CB; Verkerk, R; Dekker, M. 2006. Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry* 95:19-29.
- Piacente, S; Carbone, V; Plaza, A; Zampelli, A; Pizza, C. 2002. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:5621-5625.
- Ramallo, R; Wathelet, JP; Le Boulengé, E; Torres, E; Marlier, M; Ledent, JF; *et al.* 2004. Glucosinolates in isaño (*Tropaeolum tuberosum*) tubers: Qualitative and quantitative content and changes after maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 701-706.
- Rosa, EAS; Heaney, RK; Fenwick, GR; Portas, CAM. 1997. Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* 19:99-215.
- Rosa, EAS; Heaney, RK; Portas, CA; Roger, G. 1996. Changes in glucosinolate concentrations in *Brassica* crops (*B. oleracea* and *B. napus*) throughout growing seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71:237-244.
- Rungapamestry, V; Duncan, AJ; Fuller, Z; Ratcliffe, B. 2006. Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cooked for different durations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7628-7634.
- Sandoval, M; Okuhama, NN; Angeles, FM; Melchor, VV; Condezo, LA; Lao, J; *et al.* 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry* 79:207-213.



- Travers-Martin, N; Kuhlmann, F; Müller, C. 2008. Revised determination of free and complexed myrosinase activities in plant extracts. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:506-516.
- Valentová, K; Buckiová, D; Křen, V; Pěkníková, J; Ulrichová, J; Šimánek, V. 2006. The *in vitro* biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biology and Toxicology* 22:91-99.
- Velasco, P; Cartea, ME; Gonzáles, C; Vilar, M; Ordás, A. 2007. Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala group*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:955-962.
- Verkerk, R; Dekker, M. 2004. Glucosinolates and myrosinase activity in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata f. rubra* DC.) after various microwave treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:7318-7323.
- Verkerk, R; Dekker, M; Jongen, WMF. 2001. Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:953-958.
- Volden, J; Borge, GIA; Hansen, M; Wicklund, T; Bengtsson, GB. 2009. Processing (blanching, boiling, steaming) effects on the content of glucosinolates and antioxidant-related parameters in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*). *LWT-Food Science and Technology* 42:63-73.
- Wang, Y; Wang, Y; McNeil, B; Harvey, LM. 2007. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Research International* 40:783-792.
- Williams, D; Critchley, C; Pun, S; Nottingham, S; O'Hare, T. 2008. Epithiospecifier protein activity in broccoli: The link between terminal alkenyl glucosinolates and sulphoraphane nitrile. *Phytochemistry* 69:2765-2773.

### III. CAPÍTULO III

#### **Evolución del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha**

#### **RESUMEN**

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el perfil HPLC-PDA de los compuestos fenólicos, su contenido y capacidad antioxidante en los extractos de los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra durante las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha. Los resultados demostraron que la maca es una fuente importante de compuestos fenólicos, los cuales están directamente relacionados con su capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>. De la pre-cosecha al secado post-cosecha, en los tres ecotipos, se observó un incremento significativo de los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>. Durante la cosecha, la maca roja presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos. Los análisis HPLC-PDA revelaron la prevalencia de 11 compuestos fenólicos, pero con diferentes concentraciones en cada ecotipo y en cada etapa de estudio, tales como, seis derivados del flavanol (flavan-3-ol) (82.84 a 84.92%), cuatro derivados del ácido benzoico (13.27 a 14.69%) y un derivado del ácido *o*-cumárico (1.82 a 2.56%). Cabe resaltar que el secado post-cosecha, en condiciones tradicionales, generó una pérdida significativa (maca amarilla 89.90%, maca roja 82.49% y maca negra 66.31%) de compuestos fenólicos, principalmente derivados del ácido benzoico y *o*-cumárico, llegando a límites no detectables, tolerando estas condiciones sólo dos derivados del flavanol (flavan-3-ol). Los resultados del estudio sugieren mejorar las técnicas de cultivo y manejo post-cosecha para preservar el contenido de compuestos fenólicos.

**Palabras clave:** Cultivos andinos, hipocótilos, *Lepidium meyenii*, alimento funcional

## ABSTRACT

This research aimed to evaluate the HPLC-DAD profile of phenolic compounds, their content and antioxidant capacity in the extracts of hypocotyls of yellow, red and black maca during the pre-harvest, harvest and post-harvest drying stages. The results showed that maca is an important source of phenolic compounds, which are directly related to its ABTS<sup>•+</sup> antioxidant capacity. A significant increase in total phenolic compounds and ABTS<sup>•+</sup> antioxidant capacity was observed from pre-harvest to post-harvest drying in all three ecotypes. During harvest, red maca had the highest concentration of phenolic compounds. HPLC-DAD analysis revealed the prevalence of 11 phenolic compounds, but with different concentrations in each ecotype and in each stage of study, such as six flavanol derivatives (flavan-3-ol) (82.84 to 84.92%), four derivatives of benzoic acid (13.27 to 14.69%) and an *o*-coumaric acid derivative (1.82 to 2.56%). It should be noted that post-harvest drying, under traditional conditions, caused a significant loss (yellow maca 89.90%, red maca 82.49% and black maca 66.31%) of phenolic compounds, mainly derived from benzoic and *o*-coumaric acid, until non-detectable limits, only two flavanol derivatives (flavan-3-ol) tolerated these conditions. The results of the study suggest improving cultivation techniques and post-harvest management to preserve the content of phenolic compounds.

**Keywords:** Andean crops, hypocotyls, *Lepidium meyenii*, functional food

### 3.1 Introducción

Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), es el único cultivo andino tradicional perteneciente a la familia *Brassicaceae* que crece en altitudes entre los 3,500 a 4,500 metros sobre el nivel del mar en la región andina central de Perú. La maca es un alimento funcional, debido a que existe una versión tradicional y literatura científica que respalda los beneficios para la salud que trae su consumo, sin embargo; todavía es limitada su evidencia clínica respecto a su eficacia (Lee *et al.*, 2017). Un alimento es funcional, si junto con el impacto básico nutricional, este tiene efectos beneficiosos sobre una o más funciones del organismo humano, ya sea mejorando las condiciones generales y físicas y/o disminuyendo el riesgo de evolución de enfermedades, la cantidad de ingesta y la forma del alimento funcional deben ser lo que se espera normalmente para fines alimenticios (Diplock *et al.*, 1999).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas durante

su desarrollo normal y en respuesta a condiciones de estrés, como la infección por patógenos y parásitos, lesiones, radiación UV, aire contaminado y temperaturas extremas. Las capas externas de las plantas contienen niveles más altos de compuestos fenólicos que los situados en sus partes internas, los compuestos fenólicos insolubles se encuentran en las paredes celulares, contribuyen a su resistencia mecánica y tienen un papel regulador en el crecimiento vegetal y la morfogénesis, mientras que los compuestos fenólicos solubles están presentes dentro de las vacuolas, actúan como fitoalexinas, anti herbívoros y atractivos para los polinizadores; en los alimentos contribuyen al amargor, astringencia, color, sabor, olor y estabilidad oxidativa, algunos tienen propiedades anti nutricionales (Naczki y Shahidi, 2006).

Los compuestos fenólicos más comunes en la dieta humana son ácidos fenólicos, flavonoides y taninos, la absorción de estas sustancias se produce preferentemente en el intestino, en particular las formas glicosiladas, proporcionan beneficios para la salud por varios mecanismos, eliminación de radicales libres, protección y regeneración de otros antioxidantes de la dieta (vitamina E) y quelación de metales pro-oxidantes, además de sus propiedades antioxidantes (inhiben la actividad del anión superóxido, radicales hidroxil y peroxil), inmunomoduladoras, presentan actividad antiobesidad, antidiabética, antiinflamatoria, antimutagénica, antiproliferativa, neuroprotectora, reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, prevención de la aterosclerosis, agente radio protector, tónico para el cabello, repositorio hormonal en la menopausia natural de las mujeres, mejora de la cicatrización de heridas y propiedades antimicrobianas (Balasundram *et al.*, 2006 y Lima *et al.*, 2014)

Un antioxidante es un compuesto redox activo que limita el daño oxidativo ocasionado por moléculas que afectan la función normal de las células y del organismo, el cuerpo humano tiene un sistema de defensa antioxidante para contrarrestar el daño y estrés oxidativo, está formado por componentes enzimáticos y no enzimáticos que impiden la formación de radicales libres, los eliminan antes de que ocurra el daño, reparan y eliminan las moléculas dañadas, se compone de glutatión, tioredoxina y diversas enzimas antioxidantes como catalasa, varios tipos de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, la familia glutatión S-transferasa,  $\gamma$ -glutamil cisteína sintetasa y NAD(P)H: quinona reductasa; una dieta rica en estos compuestos refuerzan dicho sistema, pueden inducir la expresión del gen que los codifican, actúan de manera sinérgica con vitamina C, vitamina E y otros compuestos bio -

activos de plantas (Blomhoff, 2005 y Blomhoff *et al.*, 2006).

La ingesta diaria Americana de fenólicos, flavonoides y antioxidantes de frutas y vegetales se estimó en 450 mg equivalentes de ácido gálico, 103 mg equivalentes de catequina y 591 mg equivalentes de vitamina C, respectivamente; en Francia la ingesta diaria en polifenoles de frutas y vegetales en varones y mujeres se estimó en 296.9 y 260 mg equivalentes de ácido gálico, respectivamente; no se sabe las cantidades diarias mínimas requeridas de antioxidantes (Chun *et al.*, 2005 y Brat *et al.*, 2006).

Un extracto acuoso de maca de 0.3 y 1 mg ml<sup>-1</sup> en 300 µM de peroxinitrito, disminuyó su concentración entre un 15 y 41%, la concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) para la inhibición del radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) y peroxilo fue de 0.61 y 0.43 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente; la protección de la desoxirribosa por el extracto de 1 y 3 mg ml<sup>-1</sup> contra los radicales hidroxilo fue del 57 y 74%, un extracto de 1 mg ml<sup>-1</sup> protegió las células RAW 264.7 (línea celular de macrófagos murinos) contra la apoptosis inducida por peroxinitrito y el aumento de la producción de ATP en las células tratadas con 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estos resultados demuestran que el extracto acuoso de maca tiene la capacidad de eliminar radicales libres y proteger las células contra el estrés oxidativo (Sandoval *et al.*, 2002).

En un ensayo de alimentación de alevinos de trucha arco iris, fueron preparadas ocho dietas isonitrogenadas e isocalóricas, dieta 1 de control, con 15% de harina de trigo, dieta 2, con 15% de harina de maca, dieta 3, con 12.5% de harina de maca después de la extracción con cuatro solventes, dieta 4, mezcla de cuatro extractos, dieta 5, extracto de hexano, dieta 6, extracto de diclorometano, dieta 7, extracto de acetato de etilo y dieta 8, extracto de metanol; de los cuatro extractos, sólo el extracto metanólico mostró una mayor tasa de inhibición contra radical DPPH<sup>•</sup> en comparación con extractos de hexano, acetato de etilo y diclorometano, después de una prueba de alimentación de 14 semanas, los peces alimentados con las dietas 2, 3 y 8 reportaron significativamente mayor crecimiento que los peces alimentados con el control y las otras dietas (Lee *et al.*, 2005).

La biosíntesis y concentración de compuestos fenólicos en las plantas depende del genotipo, factores bióticos (plagas, infección por patógenos) y al estrés abiótico (luz, temperatura, fuente de nutrientes, disponibilidad de agua, condiciones de crecimiento y

radiación UV), además de las condiciones de almacenamiento, tratamiento post-cosecha y métodos de estimación. Los fenoles se producen en las plantas como metabolitos secundarios por medio de la vía del ácido shikímico, la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave que cataliza la biosíntesis de compuestos fenólicos a partir del aminoácido aromático fenilalanina, se determinó que son sensibles al estrés biótico y abiótico (Cartea *et al.*, 2011), afectando también a la actividad de la polifenoloxidasas (PPO) y peroxidasa (PX) (de Pascale *et al.*, 2007), además el tratamiento doméstico (lavado, pelado, cortado, etc.) e industrial como el procesamiento convencional térmico y no térmico (altas presiones, campos eléctricos pulsantes, ultrasonido/sonicación, ozono, ultravioleta) tienen efecto en la concentración final de polifenoles en los tejidos vegetales (Tiwari y Cummins, 2013).

El objetivo del trabajo de investigación fue determinar el efecto de las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en el perfil, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en los hipocótilos de tres ecotipos de maca.

## **3.2 Materiales y Métodos**

### **3.2.1 Material vegetal**

Se trabajó con los hipocótilos de tres ecotipos de maca, amarilla, roja y negra, procedentes de la Comunidad campesina de San Pedro de Cajas, ubicado a 4200 msnm (Junín-Perú). La siembra se realizó en noviembre del 2007 y se cosechó en julio del año 2008. Se tomaron al azar muestras de 10 plantas (~2 kg) a los siguientes tiempos: (a) 90, 45, 30 y 15 días antes de la cosecha, (b) durante la cosecha, y (c) a los 15, 30, 45, 60, 75 y 90 días de secado post-cosecha. Durante la cosecha, los hipocótilos son apilados al medio ambiente durante 2 días, luego colocados en rafias de polipropileno de ~50 kg donde permanecieron por 2 a 3 días. Después de este período, los sacos de maca fueron trasladados al lugar de secado donde se esparcieron hasta una altura aproximada de 10 cm. Durante las noches, los hipocótilos se cubrieron con toldos de plástico para protegerlos de las condiciones extremas de temperatura (-10 °C). Las temperaturas durante el secado estuvieron comprendidas entre -10 a 15 °C y 70 a 95% de HR. Tomadas las muestras, estas fueron acondicionadas en un cooler y transportadas al laboratorio, donde se lavaron, secaron y envasaron en bolsas de polietileno negro y almacenado a -20 °C hasta su análisis.

### 3.2.2 Estándares y reactivos químicos

Estándares fenólicos: ácidos fenólicos (*p*-cumárico, *o*-cumárico, protocatéquico, ferúlico, gálico, cafeico, clorogénico y ácido *p*-hidroxibenzoico), flavonoles (quercetina, rutina, miricetina y kaempferol), flavonas (luteolina y apigenina) y flavanonas (naringenina) fueron adquiridos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO). Flavan-3-oles (catequina y epicatequina) fueron adquiridos de ChromaDex™ (Santa Clara, CA). Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-carboxílico), Dimetilaminocinamaldehído (DMACA), 2N Folin-Ciocalteu y ácido 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>) fueron adquiridos de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO). Cloruro de aluminio, acetonitrilo grado HPLC, otros solventes y reactivos fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany).

### 3.2.3 Determinación de humedad

La humedad se determinó de acuerdo al método propuesto por la AOAC (1998).

### 3.2.4 Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales fueron estimados según el método de Singleton y Rossi (1965). Se pesó aproximadamente un gramo de muestra (en base seca) y se homogenizó con 25 ml de metanol al 80% utilizando una licuadora comercial, se trasvasó a un erlenmeyer de 100 ml, se inyectó nitrógeno por 2 min, se agitó por una hora a temperatura ambiente, seguidamente se centrifugó a 4,500 g por 20 minutos, el sobrenadante se recolectó y la torta se volvió a re-extraer, bajo las mismas condiciones con 25 ml de metanol al 80%. Ambos sobrenadantes se combinaron y mezclaron, se conservaron a -20 °C, hasta el momento del análisis. Una alícuota de 500 µl del extracto, se mezcló con 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu 1N y 1250 µl de una solución de carbonato de sodio, se dejó reaccionar por 30 min, al mismo tiempo una alícuota de 500 µl de agua destilada se trató de la misma forma que la muestra y se utilizó como control. La absorbancia se midió a 755 nm y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) 100 g<sup>-1</sup> de materia seca (MS). Se empleó una curva estándar construida con ácido gálico en el rango de 0.4624 a 3.2368 mg 100 ml<sup>-1</sup>.

### 3.2.5 Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se estimó por el método ABTS<sup>•+</sup> propuesto por Arnao *et al.*

(2003). Se utilizó el extracto preparado y explicado en la sección 3.2.4. Una alícuota de 150 µl del extracto se mezcló con 2,850 µl de solución de ABTS<sup>•+</sup>, preparada según Awika *et al.* (2003). Esta mezcla se dejó reaccionar a 20 °C hasta llegar a una absorbancia constante. Al mismo tiempo, una alícuota de 150 µl de metanol se trató de la misma forma que la muestra y se utilizó como control. Se utilizó como blanco metanol y la disminución de la absorbancia debido a la actividad antioxidante se registró a 734 nm. La capacidad antioxidante se calculó como µmol equivalentes de Trolox (ET) g<sup>-1</sup> de materia seca (MS). Se empleó una curva estándar construida con Trolox en el rango de concentraciones de 0.0497 a 0.7978 µmol ET ml<sup>-1</sup>.

### 3.2.6 Determinación de antocianinas totales

La cuantificación de antocianinas se realizó por el método del pH diferencial propuesto por Giusti y Wrolstad (2001). Se pesó aproximadamente un gramo de muestra en base seca y se mezcló con 20 ml del solvente de extracción (etanol al 95%: HCl 1.5 mol L<sup>-1</sup>, 85:15, v/v), se homogenizó por 2 minutos y se maceró a 4 °C durante 24 h. El extracto se centrifugó a 4,500 g por 20 min, el sobrenadante se diluyó con un buffer (HCl 0.1 molL<sup>-1</sup>, KCl 25 mmolL<sup>-1</sup>) pH 1.0 y buffer (CH<sub>3</sub>COONa 0.4 molL<sup>-1</sup>) a pH 4.5. La absorbancia de las mezclas se midió a 535 y 700 nm tomando como blanco agua destilada. La concentración de antocianinas fue calculada y expresada como mg equivalentes de cianidina-3-glucósido (EC3G) 100 g<sup>-1</sup> de materia seca (MS), aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg EC3G 100 g}^{-1}\text{)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times V \times 1000 \times 100) / \varepsilon \times 1 \text{ cm} \times m$$

Donde A = (Abs<sub>535</sub> - Abs<sub>700</sub>)<sub>pH 1.0</sub> - (Abs<sub>535</sub> - Abs<sub>700</sub>)<sub>pH 4.5</sub>, PM = peso molecular (449.2 g mol<sup>-1</sup>), FD = factor de dilución, ε = coeficiente de extinción molar (26,900 mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), m = cantidad de muestra (g MS), V = volumen total de extracto (ml)

### 3.2.7 Determinación de flavanoides totales

La determinación de flavanoides totales (flavan-3-oles, flavan-4-oles, flavan-3,4-dioles, flavanonas y derivados) fue estimada por el método propuesto por Delcour y Janssens de Varebeke (1985). Se pesó aproximadamente un gramo de muestra (base seca) y se homogenizó con 20 ml de acetona al 70% en una licuadora comercial, se trasvasó a un erlenmeyer de 100 ml, se inyectó nitrógeno por 2 min y se mantuvo en agitación por una hora, seguidamente se centrifugó a 4,500 g por 20 minutos, la torta residual fue sometido a



una segunda extracción similar a la primera, ambos sobrenadantes se combinaron y se concentraron a 40 °C en un rotavapor hasta eliminar toda la acetona, todo el trabajo se realizó en oscuridad. Un mililitro del reactivo cromógeno DMACA (250 mg en 500 ml de HCl concentrado: MeOH, 30:70, v/v) se añadió a 200 µl del extracto, se mezcló y esperó a que ocurra la reacción por 10 min a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se preparó un blanco con agua destilada y se trató de la misma manera que la muestra. La absorbancia se midió a 640 nm. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de catequina (EC) 100 g<sup>-1</sup> de materia seca (MS). Se empleó una curva estándar construida con catequina de rango de concentraciones de 0.6 a 3.72 mg 100 ml<sup>-1</sup>.

### **3.2.8 Determinación de flavonoides totales**

La determinación de flavonoides totales (flavonoles, flavonas e isoflavonas) fue estimada por el método colorimétrico propuesto por Chang *et al.* (2002). Se pesó aproximadamente un gramo de muestra (base seca), se homogenizó con 20 ml de etanol al 80% en una licuadora comercial, se trasvasó a un erlenmeyer de 100 ml, se inyectó nitrógeno por 2 min, se centrifugó a 4,500 g por 20 minutos, se recolectó el sobrenadante y la torta residual fue utilizada para realizar una segunda extracción similar a la primera. Ambos sobrenadantes se mezclaron, el volumen final se concentró en un rotavapor a 40 °C hasta un 30%. Todo el trabajo se realizó en oscuridad. A 250 µl del extracto, se añadió 750 µl de etanol al 96%, 50 µl de cloruro de aluminio al 10%, 50 µl de acetato de potasio 1M y 1,400 µl de agua destilada, se mezcló y esperó 30 min a que ocurra la reacción a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, se preparó un blanco con 50 µl de agua destilada en lugar de cloruro de aluminio al 10%. La absorbancia se midió a 415 nm. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de quercetina (EQ) 100 g<sup>-1</sup> de materia seca (MS). La curva estándar fue preparada con quercetina en el rango de concentraciones de 4.08 a 14.28 mg 100 ml<sup>-1</sup>.

### **3.2.9 Análisis por HPLC-PDA de compuestos fenólicos**

El perfil de los compuestos fenólicos fue determinado de acuerdo con el procedimiento propuesto por Chirinos *et al.* (2008). Se pesó aproximadamente 5 gramos de muestra en base seca y se homogenizó con 50 ml de metanol al 80% utilizando una licuadora comercial, se trasvasó a un frasco de 100 ml, se inyectó nitrógeno por 2 min, se agitó por una hora, se centrifugó a 4500 g por 20 minutos, a la torta residual se realizó una segunda

re-extracción similar a la primera, se mezclaron ambos sobrenadantes y se concentró al vacío a 40 °C, todo el trabajo se realizó en oscuridad. El extracto se purificó en un cartucho Sep-Pak c18 siguiendo el procedimiento reportado por Zheng y Wang (2003). La fracción de compuestos fenólicos fue utilizada para su separación usando el módulo de separación Waters 2695 (Waters, Milford, MA) equipado con auto inyector, un detector PDA 2996, (detector de matriz de fotodiodos). Los datos espectrales fueron registrados entre 200 y 700 nm durante toda la corrida. La columna X-terra RP<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4.6 mm) (Waters, Milford, MA) y la pre-columna 4.6 x 2.0 mm fue utilizada para la separación de los compuestos fenólicos a 30 °C. La fase móvil consistió en el solvente (A) agua: ácido acético (94: 6, v/v, pH 2.27) y solvente (B) acetonitrilo. La elución se realizó con el gradiente siguiente: 0 - 15 % de B en 40 minutos, 15 - 45 % de B en 40 minutos y 45 - 100 % de B en 10 minutos. El flujo fue de 0.5 ml min<sup>-1</sup> y se inyectó 20 µl de muestra. Muestras y fases móviles fueron previamente filtradas con filtros Millipore de 0.22 µm, tipo GV (Millipore, Bedford, MA). Las muestras fueron analizadas por triplicado. Los compuestos fenólicos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y espectros de absorción UV de los estándares fenólicos. Los resultados fueron expresados en mg 100 g<sup>-1</sup> MS. Se tomó como base los criterios de identificación (características cromatográficas y espectrales) de los compuestos fenólicos.

### **3.2.10 Análisis estadístico**

Los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza de un factor. Se utilizó la prueba de Duncan para evaluar la diferencia de medias entre los diferentes tratamientos. Diferencias a una  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos. El software SPSS 14.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL) fue utilizado para llevar a cabo todos los análisis estadísticos.

## **3.3 Resultados y Discusión**

### **3.3.1 Contenido de compuestos fenólicos totales, flavanoides totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la cosecha**

Con el fin de explicar la naturaleza de los compuestos fenólicos en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra, fueron determinados por espectrofotometría, compuestos fenólicos

totales, flavanoides totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>.

**Tabla 4.** Contenido de compuestos fenólicos totales, flavanoides totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la cosecha.

	Ecotipos		
	Amarilla	Roja	Negra
Compuestos fenólicos totales (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> MS) <sup>A</sup>	193.85 ± 0.90 <sup>b</sup>	225.05 ± 0.65 <sup>c</sup>	171.69 ± 0.64 <sup>a</sup>
Flavanoides totales (mg EC 100 g <sup>-1</sup> MS) <sup>A</sup>	2.39 ± 0.14 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.01 <sup>b</sup>	2.47 ± 0.12 <sup>a</sup>
Flavonoides totales (mg EQ 100 g <sup>-1</sup> MS) <sup>A</sup>	ND	ND	ND
Antocianinas totales (mg EC3G 100 g <sup>-1</sup> MS) <sup>A</sup>	ND	28.58 ± 0.40	ND
Capacidad antioxidante ABTS <sup>•+</sup> (μmol ET g <sup>-1</sup> MS) <sup>A</sup>	25.25 ± 0.09 <sup>b</sup>	25.84 ± 0.19 <sup>c</sup>	23.48 ± 0.06 <sup>a</sup>

<sup>A</sup> Resultados promedio ± SD (n=3).

ND: no detectado.

Valores promedios dentro de una fila con diferentes letras en superíndice son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

El contenido de compuestos fenólicos totales es significativamente mayor en los hipocótilos de maca roja, 225.05 ± 0.65 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MS (71.14 ± 0.21 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MF (materia fresca), respecto a la maca amarilla 193.85 ± 0.90 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MS (58.39 ± 0.27 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MF) y maca negra 171.60 ± 0.64 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MS (57.84 ± 0.21 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MF) (Tabla 4). En 11 genotipos de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), los compuestos fenólicos totales variaron de 92 a 337 mg equivalentes de ácido clorogénico (EACG) 100 g<sup>-1</sup> MF, los genotipos ARB-5241 (pulpa púrpura/piel amarilla), DP-0224 (pulpa púrpura/piel púrpura) y AGM-5109 (pulpa púrpura/piel amarilla) tuvieron el mayor contenido, 337, 305 y 275 mg EACG 100 g<sup>-1</sup> MF, respectivamente (Campos *et al.*, 2006). Utilizando los genotipos de mashua púrpura ARB 5241 y DP 0224, en un proceso de optimización, con una extracción acuosa, etanólica y metanólica se obtuvieron compuestos fenólicos totales de 1050 y 1000, 700 y 640, y 1310 y 1290 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MS, respectivamente, estos resultados demuestran que la mashua púrpura supera en más de 2.8 a 5.7 veces a la maca roja (Chirinos *et al.*, 2007b)

Los valores determinados en este trabajo se encuentran dentro del rango de valores determinados por Chirinos *et al.* (2009) para 6 genotipos de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.),

donde el contenido de compuestos fenólicos totales varió entre 40.8 y 161.8 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MF, los genotipos COC-450 (pulpa púrpura/piel amarilla y púrpura), UNC-O-226 (pulpa amarilla/piel amarilla) y UNC-O-338 (pulpa amarilla/piel amarilla) presentaron 161.8 ± 8.1, 40.8 ± 3.4 y 49.9 ± 1.0 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MF, respectivamente; se observa que los valores de maca amarilla y negra superan a los genotipos de oca amarillas; sin embargo, la maca roja es superado por la oca púrpura. Todo indica que la mashua, oca y maca de color roja tienen mayor contenido de compuestos fenólicos que los de color amarillo.

No se observaron diferencias significativas en el contenido de flavanoides totales de los ecotipos amarilla, 2.39 ± 0.14 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MS (0.72 ± 0.05 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MF) y negra, 2.47 ± 0.12 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MS (0.83 ± 0.04 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MF), pero si de ambos respecto a la maca roja que reportó el mayor valor, 4.51 ± 0.01 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MS (1.43 ± 0.003 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MF); similar tendencia fue observada para diez cultivares de mashua, que fueron evaluados durante las etapas de pre-cosecha a cosecha, el rango de variación de flavan-3-ol fue de 0.2 a 5.3 mg EC g<sup>-1</sup> MS, siendo los cultivares púrpuras ARB 5241, DP 0224 y AGM 5109, los de mayor contenido (Chirinos *et al.*, 2007a), se confirmó un mayor contenido en la mashua (5.3 mg EC g<sup>-1</sup> MS) respecto a la maca (4.51 ± 0.01 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MS); del mismo modo, para 6 genotipos de oca, Chirinos *et al.* (2009) encontraron un rango de variación entre 1.22 a 10.7 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MF, los valores mayores correspondieron a los de color púrpura, superando también a la maca roja (1.43 ± 0.003 mg EC 100 g<sup>-1</sup> MF).

No se detectaron flavonoides totales en ninguno de los hipocótilos de maca estudiados. En lo que concierne a antocianinas totales, en la maca roja se determinó, 28.58 ± 0.40 mg EC3G 100 g<sup>-1</sup> MS (9.03 ± 0.12 mg EC3G 100 g<sup>-1</sup> MF), estos pigmentos se localizan principalmente en la cáscara, más no en la pulpa. La maca amarilla y negra no reportaron antocianinas. Si comparamos el contenido de antocianinas totales encontradas en 11 genotipos de mashua pigmentadas por Campos *et al.* (2006), en el margen de 50 a 205 mg EC3G 100 g<sup>-1</sup> MF y genotipos de oca pigmentadas, de 0.53 a 47.4 mg EC3G100 g<sup>-1</sup> MF (Chirinos *et al.*, 2009), con el contenido de antocianinas totales de la maca roja, 9.03 ± 0.12 mg EC3G 100 g<sup>-1</sup> MF, resultan notablemente superiores los de mashua y oca morados, debido a que el pigmento lo contienen tanto en la cáscara como en la pulpa.

Se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> entre los tres ecotipos de maca negra  $23.48 \pm 0.06 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $8.12 \pm 0.02 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ), amarilla  $25.25 \pm 0.09 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $7.32 \pm 0.03 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ) y roja  $25.84 \pm 0.19 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $8.14 \pm 0.06 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ). En 11 genotipos de mashua, la capacidad antioxidante hidrofílica varió de 955 a 9800  $\mu\text{g TE g}^{-1} \text{MF}$  (3.82 a 39.15  $\mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ), los genotipos ARB-5241 (pulpa púrpura/piel amarilla) y DP-0224 (pulpa púrpura/piel púrpura) mostraron los valores más altos con 9800 y 9309  $\mu\text{g TE g}^{-1} \text{MF}$  (39.15 y 37.19  $\mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ), respectivamente, lo cual representa unas 4.8 veces superior al ecotipo rojo (Campos *et al.*, 2006). En los genotipos de mashua ARB 5241 (pulpa púrpura/piel amarilla) y DP 0224 (pulpa púrpura/piel púrpura), la capacidad antioxidante ORAC fue de 190 y 136  $\mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$ , respectivamente, confirmando que la mashua de color púrpura son fuentes importantes de poder antioxidante (Chirinos *et al.*, 2007b). Los valores obtenidos en maca son similares a los reportados para genotipos de oca, la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> de estos varió de 1.1 a 8.9  $\mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$  (Chirinos *et al.*, 2009).

Sandoval *et al.*, (2002) determinaron que extractos acuosos de maca de diferentes concentraciones (0.03, 1.0 y 3.0  $\text{mg ml}^{-1}$ ) tuvieron porcentajes de inhibición del radical libre DPPH (100  $\mu\text{M}$ ) de  $21.64 \pm 0.02$ ,  $55.40 \pm 0.19$  y  $71.38 \pm 0.31$ , correspondientemente, evidenciando actividad antioxidante ascendente.

### **3.3.2 Contenido de compuestos fenólicos totales en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha**

La Tabla 5 presenta los resultados del contenido de compuestos fenólicos totales en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra durante las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

**Tabla 5.** Contenido de compuestos fenólicos totales en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

	Días	Ecotipos de maca		
		Amarilla (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> MS)*	Roja (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> MS)*	Negra (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> MS)*
Pre-cosecha	90	151.76 ± 2.21 <sup>Aa</sup>	165.30 ± 3.77 <sup>Ba</sup>	162.01 ± 0.26 <sup>Bb</sup>
	45	152.19 ± 2.67 <sup>Aa</sup>	163.02 ± 3.70 <sup>Ba</sup>	158.73 ± 0.40 <sup>Ba</sup>
	30	157.49 ± 0.28 <sup>Ab</sup>	172.62 ± 0.45 <sup>Bb</sup>	158.07 ± 0.26 <sup>Aa</sup>
	15	167.17 ± 2.31 <sup>Ac</sup>	182.98 ± 1.75 <sup>Bc</sup>	163.75 ± 2.97 <sup>Ab</sup>
Cosecha	193.85 ± 0.90 <sup>Bd</sup>	225.05 ± 0.65 <sup>Cd</sup>	171.69 ± 0.64 <sup>Ac</sup>	
Post-cosecha	15	212.10 ± 1.84 <sup>Be</sup>	247.47 ± 0.71 <sup>Ce</sup>	203.03 ± 1.95 <sup>Ad</sup>
	30	215.04 ± 1.63 <sup>Af</sup>	255.62 ± 2.44 <sup>Bf</sup>	212.20 ± 1.67 <sup>Ae</sup>
	45	224.02 ± 1.73 <sup>Ag</sup>	260.62 ± 1.23 <sup>Cg</sup>	228.78 ± 1.10 <sup>Bf</sup>
	60	237.64 ± 1.40 <sup>Bh</sup>	284.55 ± 1.20 <sup>Ch</sup>	230.17 ± 1.44 <sup>Af</sup>
	75	301.33 ± 0.23 <sup>Ai</sup>	312.23 ± 1.73 <sup>Bi</sup>	311.73 ± 1.09 <sup>Bg</sup>
	90	349.34 ± 1.35 <sup>Aj</sup>	414.86 ± 0.99 <sup>Cj</sup>	364.72 ± 1.47 <sup>Bh</sup>

\*Resultados promedio ± SD (n=3).

Promedios dentro de una fila con diferentes letras superíndice mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre los tres ecotipos de maca en un determinado tiempo pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha. Promedios dentro de una columna con diferentes letras superíndice minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para un ecotipo de maca durante todo el proceso pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

Durante la etapa pre-cosecha entre ecotipos, entre 90 y 45 días antes de la cosecha, el contenido de compuestos fenólicos totales no difieren entre los hipocótilos de maca roja y negra, pero estos son significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores que en los hipocótilos de maca amarilla; sin embargo entre 30 y 15 días antes de la cosecha, la maca amarilla y negra presentan resultados similares, pero significativamente menores que los obtenidos para la maca roja.

Durante la etapa pre-cosecha por ecotipos, el contenido de compuestos fenólicos totales en los ecotipos amarillo y rojo aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) desde 90 días antes de la cosecha hasta la cosecha de  $151.76 \pm 2.21$  a  $193.85 \pm 0.90$  mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de MS y de  $165.30 \pm 3.77$  a  $225.05 \pm 0.65$  mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de MS, respectivamente. Los hipocótilos de maca negra mostraron una tendencia variable, los compuestos fenólicos disminuyeron en el margen de 90 a 45 días pre-cosecha, entre los 45 a 30 días no mostraron diferencia significativa y de los 30 días pre-cosecha a la cosecha este se incrementó de  $158.07 \pm 0.26$  a  $171.69 \pm 0.64$  mg EAG100 g<sup>-1</sup> de MS.

Chirinos *et al.* (2007a), durante el crecimiento (pre-cosecha) de 10 cultivares de mashua, entre 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5 meses después de la siembra, (desde 2.5 meses antes de la cosecha), encontraron valores promedio ascendentes de compuestos fenólicos totales que oscilaron entre 9 a 21 mg equivalentes de ácido clorogénico (EACG)  $g^{-1}$  MS, los cultivares de mashua púrpuras presentaron los valores más altos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para la maca roja, respecto a los ecotipos amarillo y negro, la tendencia de incremento es similar.

Debido a que son muy escasos los estudios en la etapa de pre-cosecha, sobre todo en brasicáceas, a continuación se reportan trabajos para evidenciarla como una etapa de biosíntesis. Las semillas de *Vigna radiata* cv. *emerald*, después de 7 días de germinación, mostraron un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) de compuestos fenólicos totales, de  $1.09 \pm 0.11$  a  $3.46 \pm 0.07$  mg de catequina  $g^{-1}$  MS; del mismo modo, semillas de soya cultivar *merit*, al cabo de 6 días de germinación registraron un incremento de  $2.98 \pm 0.06$  a  $3.49 \pm 0.08$  mg de catequina  $g^{-1}$  MS (Fernandez-Orozco *et al.*, 2008). De otra parte la pulpa de banano de montaña (*Asimina triloba*) fue afectada significativamente por el grado de madurez del fruto, los valores obtenidos fueron, para banano inmaduro  $15.30 \pm 11.76$ , maduro  $16.65 \pm 10.99$  y sobre maduro  $9.43 \pm 7.71$   $\mu\text{mol}$  EAG  $g^{-1}$  MF (Harris y Brannan, 2009). En otro estudio con cinco cultivares de sandía, se evaluaron fenoles totales durante el proceso de maduración (desde pulpa blanca hasta pulpa roja) en cuatro etapas, encontrándose que la cantidad de compuestos fenólicos totales variaron significativamente ( $p < 0.05$ ), la mayor cantidad de fenoles se detectaron cuando se encontraba en estado maduro (pulpa roja) en todos los cultivares estudiados, así en el cultivar de sandía Crimson sweet, se incrementó de  $42.4 \pm 0.2$  a  $137.2 \pm 0.2$  mg EAG  $kg^{-1}$  MF (Tlili *et al.*, 2011). En un estudio sobre cereza dulce en cinco estados de madurez (denominados del 1 a 5) el contenido de fenoles totales registró un incremento de  $59.05 \pm 3.17$  a  $117.00 \pm 5.64$  mg EAG  $100 g^{-1}$  MF (Serradilla *et al.*, 2011).

Como puede observarse, varios trabajos de investigación, demuestran que la etapa de pre-cosecha, corresponde a una etapa de biosíntesis de compuestos fenólicos. Los resultados de fenoles totales, obtenidos en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra, presentaron un incremento de 21.71, 26.55 y 5.64% respectivamente; sin embargo resulta *sui generis*, el caso de la maca negra, debido a que desde 90 días antes de la cosecha hasta el momento de la cosecha mantuvieron un contenido de fenoles totales con una pequeña variación.

El incremento de compuestos fenólicos debido a factores genéticos y desarrollo fisiológico descrito anteriormente, puede ser reforzado por la hipótesis planteada por Biglari *et al.* (2009) y Mostafavi *et al.* (2012), quienes proponen que un incremento de los polifenoles podría también ser debido a la actividad del etileno que estimula la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave en la biosíntesis de los compuestos fenólicos.

Durante el secado post-cosecha entre ecotipos, a los 15 días se observaron diferencias significativas a  $p < 0.05$  entre los tres ecotipos, correspondiendo el mayor valor a la maca roja ( $247.47 \pm 0.71$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS), seguido de la maca amarilla ( $212.10 \pm 1.84$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS) y maca negra ( $203.03 \pm 1.95$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS). A los 30, 45, 60, 75 y 90 días de secado post-cosecha, el contenido de fenoles totales se incrementó gradualmente en los tres ecotipos, observándose a los 90 días una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tres ecotipos, siendo el mayor valor para la maca roja de  $414.86 \pm 0.99$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS, seguido de la maca negra de  $364.72 \pm 1.47$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS y maca amarilla de  $349.34 \pm 1.35$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS.

Durante el secado post-cosecha por ecotipos, en la maca amarilla durante toda la etapa (15, 30, 45, 60, 75 y 90 días de secado post-cosecha), se evidenció una diferencia significativa a  $p < 0.05$ , observándose un incremento de  $193.85 \pm 0.90$  a  $349.34 \pm 1.35$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS. En la maca roja el comportamiento fue similar, el incremento fue de  $225.05 \pm 0.65$  a  $414.86 \pm 0.99$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS, de igual manera en la maca negra, el incremento fue de  $171.69 \pm 0.64$  a  $364.72 \pm 1.47$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS.

Chirinos *et al.* (2007) encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales en 10 cultivares de mashua durante el soleado post-cosecha ( $p < 0.05$ ), ellos reportaron en los tubérculos púrpuras, DP 0224 (pulpa púrpura/piel púrpura) y AGM 5109 (pulpa púrpura/piel amarilla), entre los 0 y 14 días, un incremento de 12 y 64%, respectivamente; mientras que para el cultivar ARB 5241 (pulpa púrpura/piel amarilla) hubo una disminución del 12% en el mismo periodo de tiempo. Todos los cultivares púrpuras mostraron una disminución en el contenido de fenoles totales después de los 14 días, mientras que en los cultivares amarillos se incrementó al cabo de 35 días.

En *Brassica oleracea* L. var. *acephala*, almacenada a  $1^\circ\text{C}$  durante 6 semanas, el contenido



de fenoles totales aumentó de  $1667 \pm 67$  a  $1750 \pm 31$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS (Hagen *et al.*, 2009), en la congelación rápida de brócoli sin escaldar seguido de un almacenamiento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 7 días, los resultados demostraron que el contenido de compuestos fenólicos se incrementó significativamente de  $521.0 \pm 5.06$  mg EAG  $100^{-1}$  MS a  $679.1 \pm 2.26$  mg EAG  $100^{-1}$  MS al quinto día, al sétimo día disminuyó a  $636.0 \pm 12.61$  mg EAG  $100^{-1}$  MS, este aumento puede estar relacionado con los cambios en el desarrollo y como respuesta al daño ocasionado por la congelación para su reparación y como defensa contra la invasión microbiana (Patras *et al.*, 2011).

Para otro tipo de material biológico, en un estudio con fresas almacenadas a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , realizado por Ayala-Zavala *et al.* (2004), encontraron que los compuestos fenólicos totales se incrementaron de forma continua durante 14 días, mientras que en fresas almacenadas a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  se mantuvieron constantes, los autores señalan que la temperatura y tiempo de almacenamiento tuvieron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la concentración de compuestos fenólicos. En kiwi (*Actinidia deliciosa* cv. “Hayward”), el contenido de compuestos fenólicos totales no cambió en la fruta almacenada durante 2 meses a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguido de un almacenamiento adicional de una semana a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , pero un incremento significativo se observó después de un almacenamiento de 6 meses a  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguido de un almacenamiento adicional de una semana a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , el aumento fue de aproximadamente 40 a 60 mg de ácido gálico  $100 \text{ g}^{-1}$  de peso fresco (Tavarini *et al.*, 2008). En el caso de zanahorias bebé almacenadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  con aire, el contenido de polifenoles se incrementó 10 veces al cabo de 12 días, mientras que en el caso del almacenaje en atmósfera controlada ( $10 \text{ kPa O}_2 + 10 \text{ kPa CO}_2$ ) la concentración de polifenoles fue 6 veces mayor respecto al valor inicial, en cambio en atmósfera controlada con  $5 \text{ kPa O}_2 + 5 \text{ kPa CO}_2$  se duplicó el contenido inicial de polifenoles (Simões *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el contenido de compuestos fenólicos totales en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra, se incrementaron desde la cosecha al final del secado post-cosecha en 44.51, 45.75 y 52.93%, respectivamente. Similar tendencia ha sido observada en los reportes anteriormente señalados. Varios estudios evidencian un incremento en el contenido de polifenoles en vegetales almacenados a temperaturas de refrigeración, en atmósferas modificadas, como respuesta presumiblemente al estrés por frío provocado en las plantas, tiempos más prolongados de almacenamiento resultan en una disminución del contenido de fenoles, manifestándose en

una pérdida de su calidad sensorial siendo el efecto mayor durante el almacenamiento a 20 °C (Cartea *et al.*, 2011).

El incremento de fenoles totales puede deberse a la liberación de grupos hidroxilo por la hidrólisis de flavonoides glicosilados y la liberación de los compuestos fenólicos complejos presentes en las paredes celulares (Ordóñez-Santos *et al.*, 2009). Se ha observado que durante el almacenamiento en frío de frutas y hortalizas frescas cortadas listas para su consumo, presentan un incremento en el contenido de compuestos fenólicos, debido al estrés provocado por el corte y la temperatura que promueven el aumento de la actividad de la fenilalanina amonio liasa (EC 4.3.1.5) y su posterior oxidación catalizada por la actividad de la tirosinasa (EC 1.14.18.1) o lacasa (EC 1.10.3.2), a través de una serie de reacciones de hidroxilación, metilación y deshidratación del ácido cinámico derivan varios fenilpropanoides (Amodio *et al.*, 2014).

### **3.3.3 Capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha**

La Tabla 6 muestra los resultados de la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra durante las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

Durante la pre-cosecha entre ecotipos, se observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre los hipocótilos de maca, siendo mayor en la maca roja. Así a los 15 días antes de la cosecha se obtuvieron valores de  $24.73 \pm 0.19 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $7.67 \pm 0.06 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ) para la maca roja,  $23.81 \pm 0.23 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $6.90 \pm 0.07 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ) para la maca amarilla y  $21.46 \pm 0.30 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $7.34 \pm 0.10 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ) para la maca negra.

**Tabla 6.** Capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

	Días	Ecotipos de maca		
		Amarilla ( $\mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$ )*	Roja ( $\mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$ )*	Negra ( $\mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$ )*
Pre-cosecha	90	16.58 $\pm$ 0.18 <sup>Aa</sup>	19.56 $\pm$ 0.66 <sup>Ba</sup>	16.03 $\pm$ 0.18 <sup>Aa</sup>
	45	19.71 $\pm$ 0.12 <sup>Ab</sup>	22.87 $\pm$ 0.34 <sup>Cc</sup>	21.91 $\pm$ 0.44 <sup>Bd</sup>
	30	19.84 $\pm$ 0.16 <sup>Ab</sup>	21.59 $\pm$ 0.63 <sup>Cb</sup>	20.70 $\pm$ 0.24 <sup>Bb</sup>
	15	23.81 $\pm$ 0.23 <sup>Bc</sup>	24.73 $\pm$ 0.19 <sup>Cd</sup>	21.46 $\pm$ 0.30 <sup>Ac</sup>
	Cosecha	25.25 $\pm$ 0.09 <sup>Bd</sup>	25.84 $\pm$ 0.19 <sup>Ce</sup>	23.48 $\pm$ 0.06 <sup>Ae</sup>
Post-cosecha	15	27.26 $\pm$ 0.22 <sup>Ae</sup>	32.53 $\pm$ 0.24 <sup>Cf</sup>	30.11 $\pm$ 0.12 <sup>Bf</sup>
	30	29.44 $\pm$ 0.20 <sup>Af</sup>	35.92 $\pm$ 0.13 <sup>Cg</sup>	31.31 $\pm$ 0.13 <sup>Bg</sup>
	45	32.37 $\pm$ 0.13 <sup>Ag</sup>	36.55 $\pm$ 0.21 <sup>Ch</sup>	33.43 $\pm$ 0.12 <sup>Bh</sup>
	60	34.76 $\pm$ 0.22 <sup>Ah</sup>	36.87 $\pm$ 0.13 <sup>Bh</sup>	34.61 $\pm$ 0.12 <sup>Ai</sup>
	75	36.91 $\pm$ 0.14 <sup>Ai</sup>	39.59 $\pm$ 0.14 <sup>Ci</sup>	37.78 $\pm$ 0.16 <sup>Bj</sup>
	90	42.84 $\pm$ 0.21 <sup>Aj</sup>	50.33 $\pm$ 0.11 <sup>Cj</sup>	48.23 $\pm$ 0.22 <sup>Bk</sup>

\*Resultados son promedios  $\pm$  SD (n=3)

Promedios dentro de una fila con diferentes letras superíndice mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre los tres ecotipos de maca en un determinado tiempo pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha. Promedios dentro de una columna con diferentes letras superíndice minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para un ecotipo de maca durante todo el proceso pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

Durante la pre-cosecha por ecotipos, la capacidad antioxidante tuvo un comportamiento variable. En los hipocótilos de maca amarilla, se observó una diferencia significativa entre los 90 y 15 días pre-cosecha; sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre los 45 y 30 días, el incremento en esta etapa fue, de  $16.58 \pm 0.18 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $5.18 \pm 0.06 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ) a  $25.25 \pm 0.09 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $7.32 \pm 0.03 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ). En los hipocótilos de maca roja se confirma un comportamiento variable y se observaron diferencias significativas en todo el periodo pre-cosecha, el incremento fue de  $19.56 \pm 0.66 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $6.05 \pm 0.21 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ) a  $25.84 \pm 0.19 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $8.14 \pm 0.06 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ). En la maca negra se repite el comportamiento variable, el incremento fue de  $16.03 \pm 0.18 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $4.89 \pm 0.05 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ) a  $23.48 \pm 0.06 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MS}$  ( $8.12 \pm 0.02 \mu\text{mol ET g}^{-1} \text{MF}$ ).

En un estudio realizado por Chirinos *et al.* (2007a) con 10 cultivares de mashua entre 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5 (cosecha) meses después de la siembra, reportaron resultados ascendentes de capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> que oscilaron entre 80 a  $378 \mu\text{mol ET g}^{-1}$

MS, los cultivares de mashua púrpuras presentaron los valores más altos. Comparando con la maca roja, se confirma que la mashua supera en más de 5 veces la capacidad antioxidante.

Debido a los escasos estudios pre-cosecha en brasicáceas, se exponen las siguientes referencias. En semillas de soya cultivar *merit*, a los 6 días de germinación, reportaron un incremento de  $63.0 \pm 0.50$  a  $71.8 \pm 0.03$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS, que representa aproximadamente un incremento del 10-14% (Fernandez-Orozco *et al.*, 2008). La actividad antioxidante DPPH de los extractos de pulpa de banano de montaña (*Asimina triloba*) fue afectada significativamente por el nivel de madurez en el siguiente orden, inmaduro ( $32.25 \pm 2.09\%$ ), maduro ( $33.63 \pm 6.76\%$ ) y sobre maduro ( $20.02 \pm 7.08\%$ ) (Harris y Brannan, 2009). En cinco cultivares de sandía (Crimson sweet, Dumara, Giza, P503 y P403), la actividad antioxidante TEAC durante el proceso de maduración de pulpa blanca a roja divididas en cuatro etapas, fueron significativamente diferentes entre las etapas de maduración estudiados ( $p < 0.05$ ), así en el cultivar Crimson sweet, se incrementó de  $148.5 \pm 0.2$  a  $535.1 \pm 3.4$   $\mu\text{M ET } 100 \text{ g}^{-1}$  MF, se demostró la influencia del estado de madurez y la importancia del antecedente genético (Tlili *et al.*, 2011). En cinco estados de madurez de cereza dulce del cultivar Ambrunés, representados numéricamente del 1 al 5, la actividad antioxidante total ABTS<sup>•+</sup>, varió de  $317.92 \pm 1.84$  a  $439.10 \pm 14.13$   $\text{mg ET } 100 \text{ g}^{-1}$  MF, el punto óptimo de madurez, es considerado como la de mejor calidad sensorial, nutricional y funcional (Serradilla *et al.*, 2011).

Los resultados demuestran que los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra, durante la pre-cosecha, la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>, aumentó en 34.34, 24.30 y 31.73% respectivamente.

Durante el secado post-cosecha se observó una tendencia general ascendente entre ecotipos, siendo mayor la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en la maca roja, seguido de la maca negra y por último la maca amarilla. Así a los 15 días de secado la capacidad antioxidante de la maca roja fue de  $32.53 \pm 0.24$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS, seguido de la maca negra de  $30.11 \pm 0.12$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS y maca amarilla de  $27.26 \pm 0.22$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS. A los 30, 45, 60, 75 y 90 días de secado post-cosecha la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> se incrementó gradualmente. Al final del secado se obtuvo para la maca roja,  $50.33 \pm 0.11$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS, seguido de la maca negra,  $48.23 \pm 0.22$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS y maca amarilla,  $42.84 \pm 0.21$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS.

Durante todo el periodo de secado por ecotipos, el incremento de la capacidad antioxidante fue de  $25.25 \pm 0.09$  a  $42.84 \pm 0.21$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS (69.7%) en la maca amarilla, en la maca roja el rango de incremento fue de  $25.84 \pm 0.19$  a  $50.33 \pm 0.11$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS (94.8%) y en la maca negra, el incremento fue de  $23.48 \pm 0.06$  a  $48.23 \pm 0.22$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS (105.4%).

Contrastando con otras investigaciones la tendencia fue similar, se encontraron diferencias significativas en la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en diez cultivares de mashua durante el soleado post-cosecha ( $p < 0.05$ ), se observaron valores promedios altos en los cultivares de mashua púrpuras, el genotipo DP 0224 (pulpa púrpura/piel púrpura) incrementó en promedio 1.37 veces a los 14 días, seguido de una disminución gradual hasta 14% a los 35 días, cultivares con baja capacidad antioxidante reportaron un incremento de aproximadamente 28% durante el soleado post-cosecha (Chirinos *et al.*, 2007a).

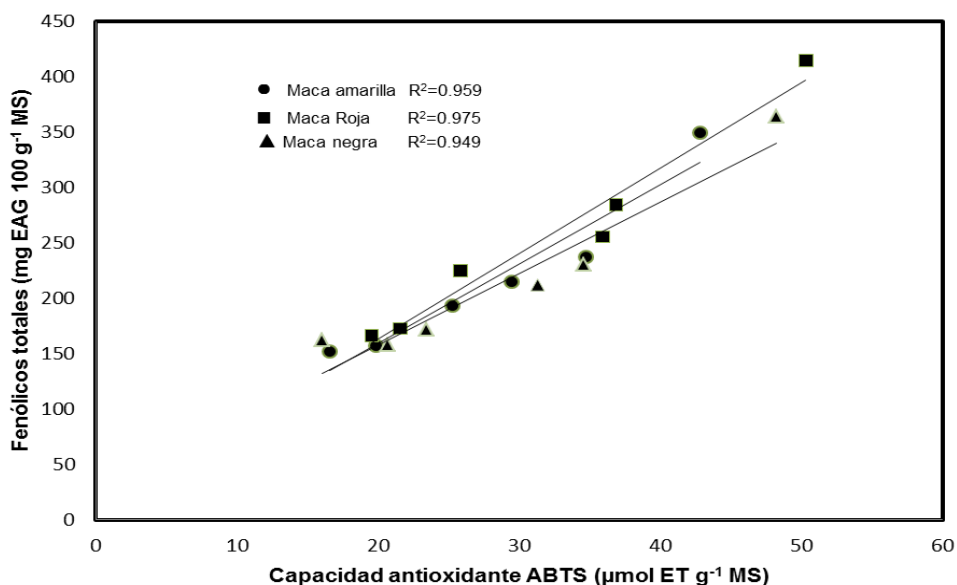
Utilizando referencias post-cosecha en otros cultivos, en kiwi (*Actinidia deliciosa* cv. "Hayward"), la capacidad antioxidante FRAP, disminuyó significativamente después de 6 meses de almacenamiento a 0 °C y se incrementó ligeramente al cabo de una semana a 25 °C (Tavarini *et al.*, 2008). El almacenamiento de *Brassica oleracea* L. var. acephala durante 6 semanas a 1°C, la capacidad antioxidante ORAC, varió de  $363 \pm 14$  a  $354 \pm 5$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  (Hagen *et al.*, 2009). La capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> de dos muestras de cáscara de papa liofilizadas, variedades Penta y Marcy, aumentaron significativamente a las 2, 4 y 8 semanas de almacenamiento a -20, 4 y 25 °C, debido probablemente a la producción de glicoalcaloides como respuesta al estrés, a la ruptura de los compuestos polifenólicos durante las primeras etapas de almacenamiento, así como a las interacciones sinérgicas entre los componentes individuales (Al-Weshahy *et al.*, 2013), contradictoriamente la actividad antioxidante FRAP de inflorescencias de brócoli frescos, al momento de su cosecha reportó  $3.96$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MF, empacados en plásticos y almacenados a  $15 \pm 1$  y  $55 \pm 2\%$  de HR y a  $4 \pm 0.5$  °C y  $50 \pm 2\%$  de HR, después de 6 días, reportaron una disminución de  $3.96$  a  $1.83$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MF (53.8% de reducción) y de  $3.96$  a  $2.00$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MF (49.5% de reducción), respectivamente (Nath, *et al.*, 2011). La aplicación de un proceso tecnológico, no siempre genera un incremento de la capacidad antioxidante, puede ocurrir un efecto inverso, lo cual depende de la naturaleza del material biológico y de las condiciones a la que es sometido.

### 3.3.4 Correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

La Figura 10, muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> para los tres ecotipos durante todo el proceso (pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha). En los hipocótilos de maca amarilla  $R^2=0.959$ , maca roja  $R^2=0.975$  y maca negra  $R^2=0.949$  a un nivel de significación de  $p < 0.01$ , lo cual significa que mucho de la capacidad antioxidante se debe al contenido de compuestos fenólicos totales de la maca. En un estudio realizado por Chirinos *et al.* (2007a), encontraron que durante el crecimiento de 10 cultivares de mashua (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5 meses) la correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en los cultivares púrpuras fue de 0.786 a 0.879 a  $p \leq 0.01$  y en los cultivares amarillas de 0.691 a 0.911 a  $p \leq 0.01$ ; durante el soleado post-cosecha la correlación entre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante en los cultivares de mashua púrpura varió entre 0.459 a 0.829 a  $p \leq 0.01$  y en cultivares amarillas varió de 0.393 a 0.855 a  $p \leq 0.01$ .

Campos *et al.* (2006) y Chirinos *et al.* (2009) encontraron una alta correlación entre el contenido total de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en genotipos de mashua,  $R^2=0.84$  a  $p = 0.00$  y oca  $R^2= 0.98$  a  $p < 0.01$ . En cultivos distintos al área andina, Zhou *et al.* (2009) en fresa china, *Myrica rubra* Sieb. et Zucc., reportaron una alta correlación entre los fenoles totales con la actividad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>,  $R^2 > 0.93$ . Du *et al.* (2009) observaron coeficientes de correlación entre distintos ensayos de capacidad antioxidante (ORAC: Oxygen radical absorbance, ABTS<sup>•+</sup>: 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, FRAP: Ferric reducing antioxidant power, SRSA: Superoxide radical scavenging activity) y fenólicos totales, los resultados fueron, ORAC,  $R^2=0.72$ ,  $p < 0.01$ ; ABTS<sup>•+</sup>,  $R^2=0.84$ ,  $p < 0.05$ ; DPPH,  $R^2=0.81$ ,  $p < 0.05$ ; FRAP,  $R^2=0.96$ ,  $p < 0.05$  y SRSA,  $R^2=0.88$ ,  $p < 0.05$ .

Todos estos trabajos de investigación, respecto a la correlación existente entre compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante, tienen un coeficiente de correlación superior a  $R^2 > 0.70$ , lo cual coincide con nuestros resultados.



**Figura 10.** Coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> a un nivel de significación  $p < 0.01$ .

### 3.3.5 Análisis por HPLC-PDA de los compuestos fenólicos en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

La Tabla 7 reporta las características cromatográficas y espectrales de los compuestos fenólicos y la Figura 11 presenta los perfiles fenólicos HPLC-PDA a 280 nm de los tres ecotipos de maca fresca (cosecha) y seca.

Analizando las características cromatográficas y espectrales UV-Vis de los perfiles de compuestos fenólicos HPLC-PDA encontrados en los tres hipocótilos de maca, considerados como significativos son: seis derivados del flavanol (flavan-3-ol), cuatro derivados del ácido benzoico y uno derivado del ácido *o*-cumárico. En los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra, en el momento de la cosecha, el total de los seis derivados del flavanol (flavan-3-ol), representan,  $95.38 \pm 4.00$  (84.92%),  $105.84 \pm 3.12$  (82.84%) y  $116.53 \pm 3.67$  (84.26%) mg EC 100 g<sup>-1</sup> MS, el total de los cuatro derivados del ácido benzoico,  $14.90 \pm 0.95$  (13.27%),  $18.53 \pm 0.25$  (14.60%) y  $18.53 \pm 1.19$  (13.40%) mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MS y un derivado del ácido *o*-cumárico,  $2.04 \pm 0.01$  (1.82%),  $3.27 \pm 0.04$  (2.56%) y  $3.23 \pm 0.04$  (2.34%) mg EAG 100 g<sup>-1</sup> MS, respectivamente. Chirinos *et al.* (2008) estudiaron el perfil de compuestos fenólicos de tres diferentes genotipos de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), ARB 5241 (piel púrpura/pulpa amarilla), DP 0224

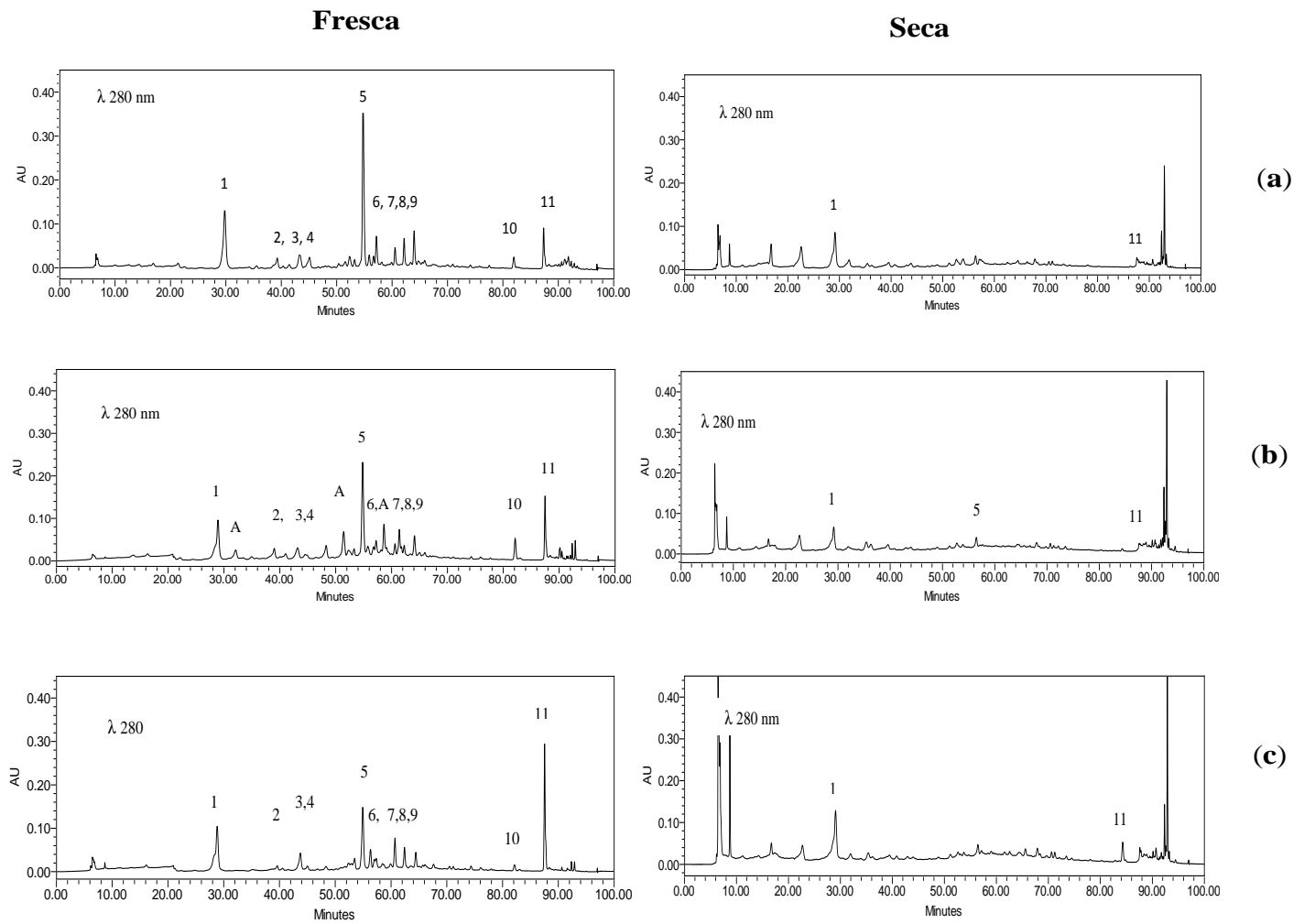
(piel púrpura/pulpa púrpura) y ARB 5576 (piel amarilla/pulpa amarilla), ellos encontraron que los genotipos púrpura y amarilla contienen cantidades importantes de epigallocatequina, derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico, derivados del ácido cinámico, derivados de galocatequina y procianidina B<sub>2</sub>. Además Chirinos *et al.* (2009) encontraron que la fracción acuosa de los genotipos de oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), COC-450 (piel púrpura/pulpa amarilla-púrpura) y M-2032 (piel amarilla/pulpa amarilla) presentaron perfiles similares de compuestos fenólicos con diferencias en la concentración de cada compuesto individual, identificaron tentativamente derivados del ácido cafeico, derivados de ácido vanílico, derivados del ácido cinámico y otros picos que parecen corresponder a formas ligadas de catequina, luteolina y apigenina.

**Tabla 7.** Características cromatográficas y espectrales de los compuestos fenólicos detectados en los hipocótilos de tres ecotipos de maca por HPLC-PDA y criterios de cuantificación.

Número de pico	Tiempo de retención (min)	$\lambda$ Max. (nm)	Denominación del compuesto fenólico	Forma de cuantificación
1	28.74	279.6	Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	Cuantificado como catequina
2	39.01	226.4/277.2	Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	Cuantificado como catequina
3	43.19	281.9/324.7	Derivado del o-cumárico	Cuantificado como ácido gálico
4	44.72	252.4/272.5	Derivado del ácido benzoico	Cuantificado como ácido gálico
5	54.69	252.4	Derivado del ácido benzoico	Cuantificado como ácido gálico
6	57.14	253.0/272.5	Derivado del ácido benzoico	Cuantificado como ácido gálico
7	60.51	252.4	Derivado del ácido benzoico	Cuantificado como ácido gálico
8	62.20	228.8/278.4	Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	Cuantificado como catequina
9	64.11	278.4	Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	Cuantificado como catequina
10	81.97	245.3/274.8	Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	Cuantificado como catequina
11	87.40	242.9/271.3	Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	Cuantificado como catequina

La Tabla 8 presenta el contenido de compuestos fenólicos HPLC-PDA en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.





**Figura 11.** Perfiles fenólicos HPLC-PDA de la fracción acuosa a 280 nm: (a) maca amarilla, (b) maca roja, y (c) maca negra. A: antocianina.

**Tabla 8.** Contenido de compuestos fenólicos por HPLC-PDA en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha (mg 100 g<sup>-1</sup> MS)\*.

Denominación de los compuestos fenólicos			Pre-cosecha			Cosecha	Post-cosecha		
	Picos	T.R.	90	45	30		30	60	90
<b>Amarilla</b>									
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	1	28.74	55.29±0.90 <sup>F</sup>	40.03±2.41 <sup>D</sup>	47.61±0.80 <sup>E</sup>	34.17±2.15 <sup>C</sup>	56.10±0.35 <sup>F</sup>	30.20±1.05 <sup>B</sup>	9.62±0.24 <sup>A</sup>
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	2	39.01	3.92±0.08 <sup>B</sup>	5.61±0.16 <sup>D</sup>	2.03±0.24 <sup>A</sup>	4.78±0.21 <sup>C</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido <i>o</i> -cumárico	3	43.19	3.03±0.02 <sup>D</sup>	4.19±0.03 <sup>E</sup>	1.84±0.06 <sup>B</sup>	2.04±0.01 <sup>C</sup>	0.45±0.02 <sup>A</sup>	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	4	44.72	1.77±0.04 <sup>B</sup>	2.38±0.03 <sup>C</sup>	2.33±0.08 <sup>C</sup>	0.85±0.05 <sup>A</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	5	54.69	24.36±0.44 <sup>E</sup>	9.83±0.61 <sup>C</sup>	7.41±0.20 <sup>B</sup>	12.03±0.83 <sup>D</sup>	2.04±0.02 <sup>A</sup>	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	6	57.14	3.42±0.13 <sup>C</sup>	1.00±0.08 <sup>A</sup>	1.32±0.03 <sup>B</sup>	1.23±0.02 <sup>B</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	7	60.51	1.96±0.07 <sup>C</sup>	2.04±0.06 <sup>C</sup>	2.00±0.03 <sup>C</sup>	0.79±0.05 <sup>A</sup>	1.18±0.02 <sup>B</sup>	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	8	62.20	10.78±0.55 <sup>C</sup>	3.25±0.12 <sup>A</sup>	15.15±0.24 <sup>D</sup>	10.26±0.21 <sup>C</sup>	4.31±0.16 <sup>B</sup>	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	9	64.11	14.47±1.74 <sup>D</sup>	2.98±0.12 <sup>A</sup>	2.58±0.22 <sup>A</sup>	10.41±0.13 <sup>C</sup>	5.76±0.03 <sup>B</sup>	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	10	81.97	5.65±0.17 <sup>B</sup>	7.55±0.12 <sup>C</sup>	3.77±0.23 <sup>A</sup>	7.93±0.11 <sup>D</sup>	ND	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	11	87.40	18.17±1.13 <sup>B</sup>	29.20±1.32 <sup>E</sup>	22.22±1.25 <sup>C</sup>	27.83±1.19 <sup>DE</sup>	25.72±0.82 <sup>D</sup>	1.94±0.02 <sup>A</sup>	1.73±0.12 <sup>A</sup>
<b>Total</b>			<b>142.82±5.26<sup>Eab</sup></b>	<b>108.06±5.05<sup>Da</sup></b>	<b>108.25±3.36<sup>Da</sup></b>	<b>112.32±4.97<sup>Da</sup></b>	<b>95.56±1.42<sup>Cb</sup></b>	<b>32.14±1.07<sup>Ba</sup></b>	<b>11.34±0.36<sup>Aa</sup></b>
<b>Roja</b>									
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	1	28.74	38.73±2.20 <sup>D</sup>	52.31±2.11 <sup>E</sup>	66.71±1.83 <sup>F</sup>	32.49±0.34 <sup>C</sup>	74.19±0.63 <sup>G</sup>	25.36±1.91 <sup>B</sup>	19.89±1.91 <sup>A</sup>
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	2	39.01	5.15±0.18 <sup>D</sup>	2.30±0.11 <sup>B</sup>	2.83±0.09 <sup>C</sup>	2.03±0.12 <sup>A</sup>	2.91±0.13 <sup>C</sup>	ND	ND
Derivado del ácido <i>o</i> -cumárico	3	43.19	2.68±0.06 <sup>C</sup>	3.13±0.02 <sup>D</sup>	2.18±0.04 <sup>B</sup>	3.27±0.04 <sup>E</sup>	1.89±0.01 <sup>A</sup>	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	4	44.72	1.28±0.03 <sup>C</sup>	1.23±0.03 <sup>B</sup>	0.81±0.02 <sup>A</sup>	1.63±0.02 <sup>D</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	5	54.69	18.65±0.14 <sup>E</sup>	10.68±0.53 <sup>C</sup>	11.33±0.48 <sup>C</sup>	12.74±0.12 <sup>D</sup>	4.33±0.22 <sup>B</sup>	1.95±0.02 <sup>A</sup>	1.38±0.02 <sup>A</sup>

Derivado del ácido benzoico	6	57.14	2.25±0.06 <sup>D</sup>	0.94±0.01 <sup>A</sup>	1.65±0.02 <sup>B</sup>	2.08±0.05 <sup>C</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	7	60.51	1.73±0.03 <sup>B</sup>	2.19±0.03 <sup>C</sup>	2.33±0.01 <sup>D</sup>	2.21±0.06 <sup>C</sup>	0.95±0.03 <sup>A</sup>	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	8	62.20	17.90±1.11 <sup>D</sup>	13.40±0.06 <sup>C</sup>	12.88±0.05 <sup>C</sup>	4.09±0.08 <sup>A</sup>	7.30±0.13 <sup>B</sup>	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	9	64.11	13.72±0.11 <sup>E</sup>	7.18±0.10 <sup>B</sup>	5.32±0.03 <sup>A</sup>	10.03±0.13 <sup>D</sup>	7.89±0.10 <sup>C</sup>	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	10	81.97	15.04±0.22 <sup>C</sup>	6.15±0.18 <sup>B</sup>	2.95±0.11 <sup>A</sup>	6.10±0.12 <sup>B</sup>	ND	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	11	87.40	33.74±1.12 <sup>E</sup>	24.57±1.06 <sup>C</sup>	24.53±0.05 <sup>C</sup>	51.10±2.33 <sup>F</sup>	30.18±0.57 <sup>D</sup>	3.94±0.19 <sup>B</sup>	1.11±0.01 <sup>A</sup>
<b>Total</b>			<b>150.89±5.26<sup>Eb</sup></b>	<b>124.09±4.24<sup>Cb</sup></b>	<b>133.53±2.74<sup>Db</sup></b>	<b>127.78±3.40<sup>CDb</sup></b>	<b>129.62±1.82<sup>CDe</sup></b>	<b>31.26±2.13<sup>Ba</sup></b>	<b>22.38±1.94<sup>Ab</sup></b>
<b>Negra</b>									
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	1	28.74	55.69±1.12 <sup>D</sup>	64.79±1.46 <sup>E</sup>	43.78±0.95 <sup>B</sup>	38.16±1.72 <sup>A</sup>	52.55±1.50 <sup>CD</sup>	49.65±2.07 <sup>C</sup>	42.70±2.04 <sup>B</sup>
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	2	39.01	1.93±0.11 <sup>B</sup>	1.35±0.15 <sup>A</sup>	1.94±0.21 <sup>B</sup>	1.62±0.12 <sup>A</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido <i>o</i> -cumárico	3	43.19	0.81±0.03 <sup>C</sup>	0.39±0.02 <sup>A</sup>	0.72±0.05 <sup>B</sup>	3.23±0.04 <sup>D</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	4	44.72	0.71±0.03 <sup>A</sup>	1.30±0.02 <sup>B</sup>	1.93±0.05 <sup>D</sup>	1.75±0.05 <sup>C</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	5	54.69	21.57±0.49 <sup>D</sup>	22.65±0.84 <sup>E</sup>	8.49±0.32 <sup>B</sup>	11.42±0.62 <sup>C</sup>	0.71±0.05 <sup>A</sup>	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	6	57.14	3.18±0.06 <sup>C</sup>	2.84±0.28 <sup>B</sup>	0.99±0.06 <sup>A</sup>	1.20±0.05 <sup>A</sup>	ND	ND	ND
Derivado del ácido benzoico	7	60.51	1.60±0.01 <sup>A</sup>	1.67±0.02 <sup>A</sup>	1.28±0.02 <sup>A</sup>	4.16±0.47 <sup>B</sup>	ND	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	8	62.20	8.06±0.18 <sup>B</sup>	8.43±0.13 <sup>C</sup>	9.34±0.21 <sup>D</sup>	9.95±0.19 <sup>E</sup>	ND	0.59±0.02 <sup>A</sup>	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	9	64.11	8.71±0.08 <sup>C</sup>	2.48±0.07 <sup>A</sup>	7.86±0.21 <sup>B</sup>	8.03±0.11 <sup>B</sup>	ND	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	10	81.97	7.98±0.11 <sup>C</sup>	9.70±0.12 <sup>D</sup>	4.33±0.11 <sup>B</sup>	3.29±0.09 <sup>A</sup>	ND	ND	ND
Derivado del flavanol (flavan-3-ol)	11	87.40	27.65±1.52 <sup>C</sup>	7.90±0.09 <sup>B</sup>	53.00±1.68 <sup>D</sup>	55.48±1.44 <sup>E</sup>	1.46±0.18 <sup>A</sup>	2.92±0.01 <sup>A</sup>	3.89±0.19 <sup>A</sup>
<b>Total</b>			<b>137.88±3.74<sup>Da</sup></b>	<b>123.49±3.19<sup>Cb</sup></b>	<b>133.65±3.87<sup>Db</sup></b>	<b>138.30±4.90<sup>Db</sup></b>	<b>54.72±1.73<sup>Ba</sup></b>	<b>53.17±2.10<sup>ABb</sup></b>	<b>46.59±2.23<sup>Ac</sup></b>

\*Promedio de tres repeticiones ± SD (n=3).

Promedios dentro de una fila con diferentes letras superíndice mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) los compuestos fenólicos HPLC-PDA de un ecotipo de maca durante todo el proceso pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha. Promedios dentro de una columna con diferentes letras superíndice minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) el total de compuestos fenólicos HPLC-PDA entre los tres ecotipos de maca en un determinado tiempo pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

A continuación se evalúa la evolución de los compuestos fenólicos más representativos para los diferentes ecotipos de maca durante las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

Para los hipocótilos de maca amarilla, el pico 1 (TR = 28.74 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), disminuyó gradualmente desde 90 días antes de la cosecha hasta el momento de la cosecha, de  $55.29 \pm 0.90$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS a  $34.17 \pm 2.15$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS. Durante el secado post-cosecha, se observó un incremento importante de este compuesto a los 30 días ( $56.10 \pm 0.35$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS) y desde este momento hacia adelante ocurren pérdidas significativas hasta  $9.62 \pm 0.24$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS a los 90 días. El pico 3 (TR = 43.19 min), derivado del ácido *o*-cumárico, desde 90 días antes de la cosecha hasta el momento de la cosecha tuvieron un comportamiento variable, de  $3.03 \pm 0.02$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS aumenta a  $4.19 \pm 0.03$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, luego disminuyó a  $1.84 \pm 0.06$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS y seguidamente aumenta a  $2.04 \pm 0.01$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS. A 30 días del secado post-cosecha disminuyó significativamente a  $0.45 \pm 0.02$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, no es detectado a los 60 y 90 días de dicho periodo. El pico 5 (TR = 54.69 min), derivado del ácido benzoico, 90 días antes de la cosecha tuvo una concentración de  $24.36 \pm 0.44$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, disminuyendo a  $12.03 \pm 0.83$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS en el momento de la cosecha. A 30 días del secado post-cosecha, este compuesto disminuyó significativamente hasta  $2.04 \pm 0.02$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS y no es detectado a los 60 y 90 días de secado post-cosecha. El pico 11 (TR = 87.40 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), 90 días antes de la cosecha su contenido fue de  $18.17 \pm 1.13$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS incrementándose a  $27.83 \pm 1.19$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS en el momento de la cosecha. A los 90 días del secado post-cosecha este disminuyó significativamente hasta  $1.73 \pm 0.12$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS.

Los picos, 2 (TR = 39.01 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), 4 (TR = 44.72 min), derivado del ácido benzoico, 6 (TR = 57.14 min), derivado del ácido benzoico y 10 (TR = 81.97 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol) a 30 días de secado post-cosecha no fueron detectados, sumándose a estos los picos, 3 (TR = 43.19 min), derivado del ácido *o*-cumárico, 5 (TR = 64.59 min), derivado del ácido benzoico, 7 (TR = 60.51 min), derivado del ácido benzoico, 8 (TR = 62.20 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol) y 9 (TR = 64.11 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), que tampoco fueron detectados a partir de los 60 días para adelante, la cuantificación final en esta etapa corresponde solamente a los picos 1 y 11.

En los hipocótilos de maca roja, para el pico 1 (TR = 28.74 min), derivado del flavanol

(flavan-3-ol), las mayores concentraciones se observaron 30 días antes de la cosecha ( $66.71 \pm 1.83 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ ) y a los 30 días de secado post-cosecha ( $74.19 \pm 0.63 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ ), a los 60 y 90 días de secado post-cosecha, este compuesto disminuyó significativamente a  $25.36 \pm 1.91$  y  $19.89 \pm 1.91 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ . El pico 3 (TR = 43.19 min), derivado del ácido *o*-cumárico, desde los 90 días antes de la cosecha hasta el momento de la cosecha presentaron un comportamiento variable, similar al ocurrido en el ecotipo amarillo, de  $2.68 \pm 0.06 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  aumenta a  $3.13 \pm 0.02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ , luego disminuyó a  $2.18 \pm 0.04 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  y seguidamente aumenta a  $3.27 \pm 0.04 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ . A los 30 días de secado post-cosecha disminuyó significativamente a  $1.89 \pm 0.01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ , no es detectado a los 60 y 90 días de dicho periodo. El pico 5 (TR = 54.69 min), derivado del ácido benzoico, su mayor contenido a los 90 días antes de la cosecha fue  $18.65 \pm 0.14 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ , disminuyendo significativamente a  $12.74 \pm 0.12 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  al momento de la cosecha, posteriormente a los 90 días del secado post-cosecha disminuyó significativamente a  $1.38 \pm 0.02 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ . El pico 11 (TR = 87.40 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), a los 90 días antes de la cosecha su contenido fue  $33.74 \pm 1.12 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ , incrementándose significativamente a  $51.10 \pm 2.33 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$  en el momento de la cosecha, a los 30, 60 y 90 días de secado post-cosecha este compuesto disminuyó drásticamente a  $30.18 \pm 0.57$ ,  $3.94 \pm 0.19$  y  $1.11 \pm 0.01 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ , respectivamente.

Los picos, 4 (TR = 44.72 min), derivado del ácido benzoico, 6 (TR = 57.24 min), derivado del ácido benzoico y 10 (TR = 81.97 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol) a 30 días de secado post-cosecha no fueron detectados, sumándose a estos los picos 2 (TR = 39.01 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), 3 (TR = 43.19 min), derivado del ácido *o*-cumárico, 7 (TR = 60.51 min), derivado del ácido benzoico, 8 (TR = 62.20 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol) y 9 (TR = 64.11 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), tampoco fueron detectados a partir de los 60 días para adelante, la cuantificación final en esta etapa corresponde solamente a los picos 1, 5 y 11.

En la maca roja fresca, previa hidrólisis, se detectaron tres picos que corresponden a antocianinas. A 520 nm y TR= 19.89 min, se identificó cianidina y dos no fueron identificados (datos no publicados).

Para los hipocótilos de maca negra, el pico 1 (TR = 28.74 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), a los 90 días de la cosecha, el contenido fue de  $55.69 \pm 1.12 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ , incremen -

tándose significativamente a  $64.79 \pm 1.46$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS (45 días antes de la cosecha), seguido de una disminución a  $43.78 \pm 0.95$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS (30 días antes de la cosecha) y  $38.16 \pm 1.72$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS (cosecha). A los 30 días de secado post-cosecha, notablemente se generó un incremento significativo a  $52.55 \pm 1.50$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, luego del cual gradualmente fue disminuyendo hasta llegar a  $42.70 \pm 2.04$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS a los 90 días de secado post-cosecha. El pico 3 (TR = 43.19 min), derivado del ácido *o*-cumárico, desde 90 días antes de la cosecha hasta el momento de la cosecha se confirmó su comportamiento variable, de  $0.81 \pm 0.03$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS disminuyó a  $0.39 \pm 0.02$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, luego aumenta a  $0.72 \pm 0.05$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS y  $3.23 \pm 0.04$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS. A los 30, 60 y 90 días de secado post-cosecha no es detectado. El pico 5 (TR = 54.69 min), derivado del ácido benzoico, se observó un incremento significativo de  $21.57 \pm 0.49$  (90 días antes de la cosecha) a  $22.65 \pm 0.84$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS (45 días antes de la cosecha), disminuyendo hasta el momento de la cosecha a  $11.42 \pm 0.62$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS. Durante el secado post-cosecha, se observó una drástica disminución a  $0.71 \pm 0.05$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS (30 días de secado) y no siendo detectado a 60 y 90 días de secado post-cosecha. El pico 11 (TR = 87.40 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), a los 90 días antes de la cosecha el contenido de este compuesto fue  $27.65 \pm 1.52$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, a los 45 días antes de la cosecha disminuyó a  $7.90 \pm 0.09$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, incrementándose significativamente hasta el momento de la cosecha a  $55.48 \pm 1.44$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS. A los 30, 60 y 90 días de secado post-cosecha disminuyó a  $1.46 \pm 0.18$ ,  $2.92 \pm 0.01$  y  $3.89 \pm 0.19$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS, respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre estos contenidos.

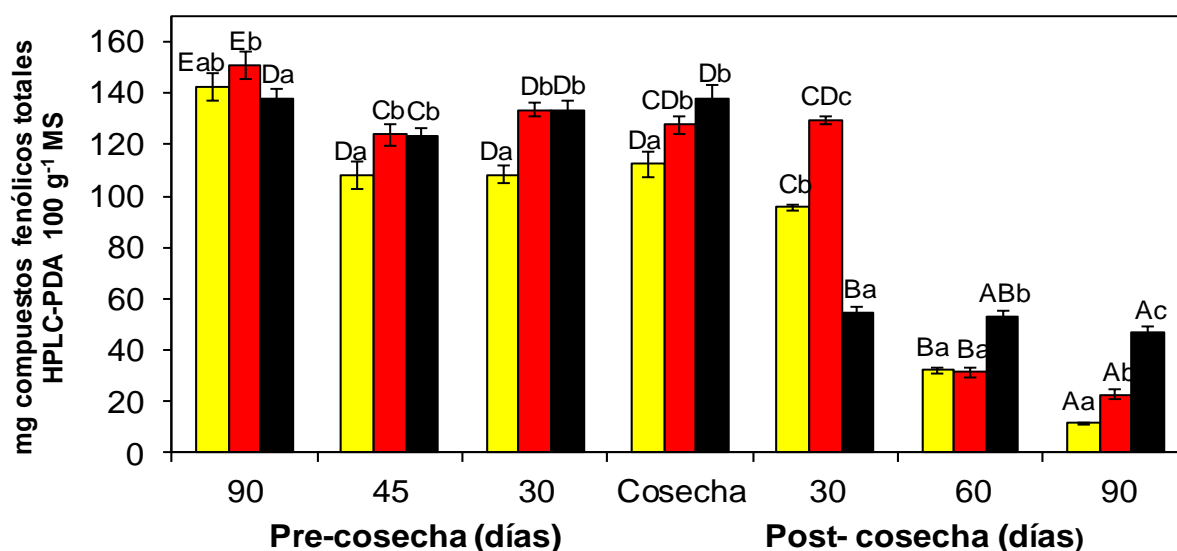
Los picos, 2 (TR = 39.01 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), 3 (TR = 43.19 min), derivado del ácido *o*-cumárico, 4 (TR = 44.72 min), derivado del ácido benzoico, 6 (TR = 57.24 min), derivado del ácido benzoico, 7 (TR = 60.51 min), derivado del ácido benzoico, 8 (TR = 62.20 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol), 9 (TR = 64.11 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol) y 10 (TR = 81.97 min), derivado del flavanol (flavan-3-ol) a partir de los 30 días de secado post-cosecha no fueron detectados, sumándose a estos el pico 5 (TR = 64.59 min), derivado del ácido benzoico que tampoco fue detectado a partir de los 60 días para adelante, la cuantificación final en esta etapa corresponde solamente a los picos 1 y 11.

En los resultados obtenidos en este trabajo se observó tendencias de incremento y disminución de los diferentes compuestos fenólicos durante la pre-cosecha, esto podría estar relacionado con la complejidad de las rutas metabólicas de biosíntesis y degradación de los

compuestos fenólicos, es probable que la biosíntesis propiamente dicha ocurra antes de los 90 días de la cosecha, etapa que no fue evaluada en este trabajo.

Por lo tanto, se concluye que el secado post-cosecha, realizado en condiciones tradicionales, daña varios compuestos fenólicos individuales lo que justifica plantear nuevas propuestas de manejo post-cosecha e industrial de los hipocótilos frescos para solucionar dicho problema.

Los resultados de la determinación de compuestos fenólicos totales mediante HPLC-PDA se presentan en la Figura 12.



**Figura 12.** Evolución del contenido de compuestos fenólicos totales determinados por HPLC-PDA en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

\*Resultados son promedios  $\pm$  SD (n=3). Diferentes letras mayúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para un ecotipo de maca durante todo el proceso de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha. Diferentes letras minúsculas representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tres ecotipos en un determinado tiempo pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

En los hipocótilos de maca amarilla, no se observó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los 45, 30 días pre-cosecha y cosecha, se obtuvo el mayor contenido a los 90 días antes de la cosecha ( $142.82 \pm 5.26$  mg  $100$  g $^{-1}$  MS). En el secado post-cosecha ocurrió un progresivo descenso en el contenido de compuestos fenólicos hasta llegar a  $11.34 \pm 0.36$  mg  $100$  g $^{-1}$  MS, que significa una pérdida del 89.90%. Una tendencia similar fue observada para la maca roja, donde la mayor concentración fue obtenida a los 90 días antes de la cosecha ( $150.89 \pm 5.26$  mg  $100$  g $^{-1}$  MS); Así mismo, en el secado post-cosecha ocurrió un progresivo descenso en el contenido de compuestos fenólicos hasta  $22.38 \pm 1.94$  mg  $100$  g $^{-1}$  MS, que representa una

pérdida del 82.49%. El mismo patrón de comportamiento se observó en la maca negra, obteniéndose en este caso mayor contenido en el momento de la cosecha ( $138.30 \pm 4.90$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS) y en el secado post-cosecha, se produjo un progresivo descenso en el contenido de compuestos fenólicos totales hasta  $46.59 \pm 2.23$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS, que significa una pérdida del 66.31%.

Con respecto al contenido de compuestos fenólicos totales HPLC-PDA entre los tres ecotipos, en cada una de las etapas en estudio. En la etapa pre-cosecha, el contenido de compuestos fenólicos totales, a los 90 días antes de la cosecha no se evidenció diferencia significativa a  $p > 0.05$  entre los hipocótilos de maca amarilla y roja, maca amarilla y negra, pero sí entre los hipocótilos de maca roja y negra, el mayor valor se observó en la maca roja,  $150.89 \pm 5.26$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS, a los 45 y 30 días antes de la cosecha, el contenido de compuestos fenólicos totales en los hipocótilos de maca roja y negra fue similar, ambos superiores al contenido de los hipocótilos de maca amarilla. En el momento de la cosecha, se observó diferencias significativas a  $p < 0.05$  entre los hipocótilos de maca amarilla y roja, amarilla y negra, pero no entre los hipocótilos de maca roja y negra, el mayor valor se observó en la maca negra,  $138.30 \pm 4.90$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS. Durante el secado post-cosecha, los tres ecotipos de maca sufren una disminución de su contenido de compuestos fenólicos totales; sin embargo a los 30 días, el ecotipo rojo todavía mantiene un contenido similar al que presentó en la etapa pre-cosecha y cosecha ( $129.62 \pm 1.82$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS). A los 90 días del secado post-cosecha se evidenció diferencia significativa a  $p < 0.05$ , entre los tres ecotipos, el mayor contenido se observó en la maca negra,  $46.59 \pm 2.23$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS.

Con estos resultados, la serie de eventos que ocurren durante el secado post-cosecha de manera tradicional afectan significativamente al contenido de compuestos fenólicos individuales identificados como derivados del flavanol (flavan-3-ol), ácido benzoico y ácido *o*-cumárico, los mismos que tienen efecto sobre el contenido total, haciéndose crítico a partir de los 30 días para adelante.

Son muy escasos los estudios que evalúen el comportamiento de los compuestos fenólicos individuales en brassicáceas, particularmente en la etapa de pre-cosecha. Odeh *et al.* (2014) estudiaron los compuestos fenólicos determinados por HPLC durante la maduración de frutos de siete cultivares de plantas datileras, encontraron ácido gálico, ácido *p*-hidroxi benzoico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siringico y ácido ferúlico. El *p*-hidroxi benzoico en el



cultivar *Madjhool* varió desde no detectado a 0.38, 0.56 y 0.69 mg 100 g<sup>-1</sup> MS (cuatro fechas de cosecha), confirmando que la pre-cosecha es una etapa de biosíntesis para este compuesto, similar comportamiento se observó en los otros seis cultivares; sin embargo, en el caso del ácido gálico, para las cuatro fechas de cosecha, este varió de no detectado a 0.081 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, seguido de no detectado y no detectado y el ácido cafeico varió de no detectado a no detectado, seguido de 0.021 y 0.017 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, estos resultados demuestran que no siempre ciertos compuestos fenólicos siguen la tendencia de incremento como debería suponerse en una etapa de pre-cosecha. Similar variación ocurrió en el contenido de siete compuestos fenólicos (vitexina, isovitexina, orientina, apigenina, luteolina, pinostrobinina y ácido cajaninstilbeno) durante el desarrollo de hojas, tallos y raíces de frijol de palo (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) evaluados en forma simultánea, los autores del trabajo plantean que su variación responde a una correlación entre el equilibrio metabólico de las plantas y las perturbaciones ambientales externas (Liu *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2016) estudiaron el contenido de cuatro fracciones fenólicas (libre, esterificado, glicosilado e insoluble enlazado) en tres estados de madurez de azufaifa (*Ziziphus jujuba* Miller), blanca, media roja y roja, encontrando que la fracción libre fue significativamente mayor en la madurez blanca, 1698.29 µg g<sup>-1</sup> MS, respecto a la madurez media roja 794.50 µg g<sup>-1</sup> MS y madurez roja 1165.66 µg g<sup>-1</sup> MS, individualmente cada compuesto fenólico varió de distinta manera en los tres estados de madurez, se obtuvo los siguientes resultados, el ácido clorogénico reportó 47.55 µg<sup>-1</sup> MS (blanca), 8.01 µg<sup>-1</sup> MS (media roja) y 366.53 (roja) µg<sup>-1</sup> MS y el ácido *p*-hidroxi benzoico libre varió de 71.35 a 12.54 y 0.14 µg<sup>-1</sup> MS, respectivamente.

Estos resultados podrían explicar que durante la etapa de pre-cosecha de los hipocótilos de maca, individualmente cada compuesto fenólico responde fisiológicamente de manera distinta a las condiciones climáticas extremas que se dan en la Meseta de Bombón, debido sobre todo a la extrema variación de la temperatura (-10 a 15 °C), esta respuesta fisiológica podríamos denominarla como “incertidumbre metabólica”. La disminución de los compuestos fenólicos observada en la etapa de secado post-cosecha, podrían ser a consecuencia de la ruptura de la estructura celular y al daño por frío ocasionado a temperaturas por debajo de los 4 °C, tal como lo propone Liu *et al.* (2010).

Los resultados en el secado post-cosecha demuestran que deben plantearse nuevas alternativas de manejo post-cosecha y la posibilidad de usar los hipocótilos frescos como materia prima en la industria para preservar y aprovechar mejor los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante.

### 3.4 Conclusiones

Se estima que los hipocótilos de maca fresca son una fuente importante de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>, durante la cosecha el ecotipo rojo con  $225.05 \pm 0.65$  mg EAG  $100 \text{ g}^{-1}$  MS y  $25.84 \pm 0.19$   $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  MS, supera a los ecotipos amarillo y negro. En los tres ecotipos fueron identificados 11 compuestos fenólicos semejantes pero en concentraciones distintas, seis derivados del flavanol (flavan-3-ol) (82.84 a 84.92%), cuatro derivados del ácido benzoico (13.27 a 14.69%) y un derivado del ácido *o*-cumárico (1.82 a 2.56%). Durante la pre-cosecha, los compuestos fenólicos presentaron tendencias de incremento y disminución, relacionado a la complejidad de su biosíntesis y degradación. El secado post-cosecha en condiciones tradicionales generó una pérdida significativa principalmente de los derivados del ácido benzoico y *o*-cumárico hasta límites no detectables, tolerando mejor estas condiciones los derivados del flavanol (flavan-3-ol), esta pérdida en la maca amarilla representa el 89.90%, en la maca roja 82.49% y en la maca negra 66.31%. De los resultados se desprende la posibilidad de un secado post-cosecha en condiciones ambientales entre 15 a 30 días, seguido de un escaldado para inactivar enzimas y secado por aire caliente. Realizar métodos de fraccionamiento fenólico en los extractos de maca con la finalidad de facilitar su identificación y evaluar mejor su capacidad antioxidante.

### 3.5 Referencias Bibliográficas

- Al-Weshahy, A; El-Nokety, M; Bakhete, M; Rao, V. 2013. Effect of storage on antioxidant activity of freeze-dried potato peels. *Food Research International* 50:507-512.
- Amodio, ML; Derossi, A; Colelli, G. 2014. Modeling phenolic content during storage of cut fruit and vegetables: A consecutive reaction mechanism. *Journal of Food Engineering* 140:1-8.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1998. *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Arnao, M; Cano, A; Acosta, M. 2003. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73:239-244.
- Awika, JM; Rooney, LW; Wu, X; Prior, RL; Cisneros-Zevallos, L. 2003. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:6657-6662.
- Ayala-Zavala, JF; Wang, SY; Wang, ChY; Gonzales-Aguilar, GA. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT-Food Science and Technology* 37:687-695.

- Balasundram, N; Sundram, K; Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99:191-203.
- Biglari, F; Alkarkhi, AFM; Easa, AM. 2009. Cluster analysis of antioxidant compounds in dates (*Phoenix dactylifera*): Effect of long-term cold storage. *Food Chemistry* 112:998-1001.
- Blomhoff, R. 2005. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* 16:47-54.
- Blomhoff, R; Carlsen, MH; Andersen, LF; Jacobs, DR. 2006. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition* 96 (Suppl. 2):S52-S60.
- Brat, P; George, S; Bellamy, A; Du Chaffaut, L; Scalbert, A; Mennen, L; Arnault, N; Amiot, MJ. 2006. Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. *The Journal of Nutrition* 136:2368-2373.
- Campos, D; Noratto, G; Chirinos, R; Arbizu, C; Roca, W; Cisneros-Zevallos, L. 2006. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: Native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavón), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ullucu (*Ullucus tuberosum*). *Journal of the Science of Food and Agricultural* 86:1481-1488.
- Cartea, ME; Francisco, M; Soengas, P; Velasco, P. 2011. Review Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules* 16:251-280.
- Chang, ChCh; Yang, MH; Wen, HM; Chern, JCh. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10:178-182.
- Chirinos, R; Betalleluz-Pallardel, I; Huamán, A; Arbizu, C; Pedreschi, R; Campos, D. 2009. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry* 113:1243-1251.
- Chirinos, R; Campos, D; Arbizu, C; Rogez, H; Rees, J-F; Larondelle, Y; Noratto, G; Cisneros-Zevallos, L. 2007a. Effect of genotype, maturity stage and post-harvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity, of Andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87:437-446.
- Chirinos, R; Campos, D; Costa, N; Arbizu, C; Pedreschi, R; Larondelle, Y. 2008. Phenolic profiles of Andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers:

- Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* 106:1285-1298.
- Chirinos, R; Rogez, H; Campos, D; Pedreschi, R; Larondelle, Y. 2007b. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers. *Separation and Purification Technology* 55:217-225.
- Chun, OK; Kim, DO; Smith, N; Schroder, D; Han, JT; Lee, CY. 2005. Daily Consumption of Phenolics and Total Antioxidant Capacity from Fruit and Vegetables in the American Diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85:1715-1724.
- de Pascale, S; Maggio, A; Pernice, R; Fogliano, V; Barbieri, G. 2007. Sulphur fertilization may improve the nutritional value of *Brassica rapa* L. subsp. *Sylvestris*. *European Journal of Agronomy* 26:418-424.
- Delcour, JA; Janssens de Varebeke, D. 1985. A new colorimetric assay for flavonoids in pilsner beers. *Journal of the Institute of Brewing* 91:37-40.
- Diplock, AT; Aggett, PJ; Ashwell, M; Bornet, F; Fern, EB; Roberfroid, MB. 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *British Journal of Nutrition* 81(suppl. 1):S1-S27.
- Du, G; Li, M; Ma, F; Liang, D. 2009. Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in *Actinidia* fruits. *Food Chemistry* 113:557-562.
- Fernandez-Orozco, R; Frias, J; Zielinski, H; Piskula, MK; Kozłowska, H; Vidal-Valverde, C. 2008. Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. *emerald*, *Glycine max* cv. *Jutro* and *Glycine max* cv. *merit*. *Food Chemistry* 111:622-630.
- Giusti, MM; Wrolstad, RE. 2001. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry*, Unit F 1.2 (pp. 1–13). New York: John Wiley & Sons.
- Hagen, SF; Borge, GIA; Solhaug, KA; Bengtsson, GB. 2009. Effect of cold storage and harvest date on bioactive compounds in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Postharvest Biology and Technology* 51(1):36-42.
- Harris, GG; Brannan, RG. 2009. A preliminary evaluation of antioxidant compounds, reducing potential and radical scavenging of pawpaw (*Asimina triloba*) fruit pulp from different stages of ripeness. *LWT - Food Science and Technology* 42:275-279.
- Lee, KJ; Dabrowski, K; Sandoval, M; Miller, MJS. 2005. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture* 244:293-301.

- Lee, MS; Kim, T-H; Lee, HW. 2017. "The Use of Maca (*Lepidium meyenii*) for Health Care: An Overview of Systematic Reviews", 167-172, en MS Lee, T-H Kim, HW Lee. Sustained Energy for Enhanced Human Functions and Activity (first edition). Edited by: Debasis Bagchi. Academic Press. United Kingdom.
- Lima, GPP; Vianello, F; Corrêa, CR; da Silva Campos, RA; Borguini, MG. 2014. Polyphenols in Fruits and Vegetables and Its Effect on Human Health. Food and Nutrition Sciences 5:1065-1082.
- Liu, W ; Zu, YG ; Fu, YJ ; Kong, Y ; Ma, W ; Yang, M ; Li, J ; Wu, N. 2010. Variation in contents of phenolic compounds during growth and post-harvest storage of pigeon pea seedlings. Food Chemistry 121:732-739.
- Mostafavi, HA; Mirmajlessi, SM; Mirjalili, SM; Fathollahi, H; Askari, H. 2012. Gamma radiation effects on physico-chemical parameters of apple fruit during commercial post-harvest preservation. Radiation Physics and Chemistry 81:666-671.
- Naczka, M; Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41:1523-1542.
- Nath, A; Bagchi, B; Misra, LK; Deka, BC. 2011. Changes in post-harvest phytochemical qualities of broccoli florets during ambient and refrigerated storage. Food Chemistry 127:1510-1514.
- Odeh I; Al-Rimawi, F; Abbadi, J; Obayat; L; Qabbajeh, M; Hroub, A. 2014. Effect of Harvesting Date and Variety of Date Palm on Antioxidant Capacity, Phenolic and Flavonoid Content of Date Palm (*Phoenix Dactylifera*). Journal of Food and Nutrition Research 2(8):499-505.
- Ordóñez-Santos, LE; Vázquez-Odériz, L; Arbones-Macínheira, E; Romero-Rodríguez, A. 2009. The influence of storage time on micronutrients in bottled tomato pulp. Food Chemistry 112:146-149.
- Patras, A; Tiwari, BK; Brunton, NP. 2011. Influence of blanching and low temperature preservation strategies on antioxidant activity and phytochemical content of carrots, green beans and broccoli. LWT-Food Science and Technology 4:299-306.
- Sandoval, M; Okuhama, NN; Angeles, FM; Melchor, VV; Condezo, LA; Lao, J; Miller, MJS. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry 79:207-213.
- Serradilla, MJ; Lozano, M; Bernalte, MJ; Ayuso, MC; López-Corrales, M; González-Gómez, D. 2011. Physicochemical and bioactive properties evolution during ripening of

- 'Ambrunés' sweet cherry cultivar. *LWT - Food Science and Technology* 44:199-205.
- Simões, AND; Allende, A; Tudela, JA; Puschmann, R; Gil, MI. 2011. Optimum controlled atmospheres minimize respiration rate and quality losses while increase phenolic compounds of baby carrots. *LWT - Food Science and Technology* 44:277-283.
- Singleton, VL; Rossi, JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16:144-158.
- Tavarini, S; Degl'innocenti, E; Remorini, D; Massai, R; Guidi, L. 2008. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry* 107:282-288.
- Tiwari, U; Cummins, E. 2013. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. *Food Research International* 50:497-506.
- Tlili, I; Hdider, Ch; Lenucci, MS; Ilahy, R; Jebari, H; Dalessandro, G. 2011. Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 24:923-928.
- Wang, B; Huang, Q; Venkitasamy, C; Chai, H; Gao, H; Cheng, N; Cao, W; Lv, X; Pan Z. 2016. Changes in phenolic compounds and their antioxidant capacities in jujube (*Ziziphus jujuba* Miller) during three edible maturity stages. *LWT - Food Science and Technology* 66:56-62.
- Zheng, W; Wang, SY. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51:502-509.
- Zhou, SH; Fang, ZX; Lü, Y; Chen, JCH; Liu, DH; Ye, XQ. 2009. Phenolics and antioxidant properties of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pomace. *Food Chemistry* 112:394-399.

#### IV. CAPÍTULO IV

### **Evolución del contenido de $\beta$ -sitosterol en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha**

#### **RESUMEN**

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el contenido de  $\beta$ -sitosterol por HPLC-PDA durante las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra. Se observó un aumento en el contenido de  $\beta$ -sitosterol a diferentes tiempos entre la etapa pre-cosecha hasta la cosecha. Los hipocótilos de maca amarilla alcanzaron su mayor valor a los 60 días antes de la cosecha ( $108.34 \pm 2.44$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> MS), los hipocótilos de maca roja a los 30 días antes de la cosecha ( $101.81 \pm 2.29$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> MS) y los hipocótilos de maca negra en la cosecha ( $91.63 \pm 1.17$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> MS). En la cosecha, el contenido de  $\beta$ -sitosterol fue similar en los tres ecotipos. Cabe señalar que el secado post-cosecha, en condiciones tradicionales, causó una pérdida significativa (maca amarilla 46.22%, maca roja 52.47% y maca negra 63.72%) en el contenido de  $\beta$ -sitosterol. Los resultados sugieren que se deben utilizar nuevas técnicas de secado para evitar pérdidas de  $\beta$ -sitosterol.

**Palabras clave:** Cultivos andinos, hipocótilos, *Lepidium meyenii*, alimento funcional

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the  $\beta$ -sitosterol content by HPLC-DAD during the pre-harvest, harvest and post-harvest drying stages in the hypocotyls of yellow, red and black maca. An increase in  $\beta$ -sitosterol content at different times from pre-harvest to harvest stages was observed. Yellow maca hypocotyls reached their highest value at 60 days before harvest ( $108.34 \pm 2.44$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS), red maca hypocotyls at 30 days before harvest ( $101.81 \pm 2.29$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS) and black maca hypocotyls at harvest ( $91.63 \pm 1.17$  mg 100 g<sup>-1</sup> MS). At harvest, the  $\beta$ -sitosterol content was similar in the three ecotypes. It should be noted that post-harvest drying, under traditional conditions, caused a significant loss (46.22% yellow maca 52.47 % red maca and 63.72% black maca) in  $\beta$ -sitosterol content. The results suggest that new drying techniques should be used to avoid loss of  $\beta$ -sitosterol.

**Keywords:** Andean crops, hypocotyls, *Lepidium meyenii*, functional food

### 4.1 Introducción

Diversas pruebas experimentales han evidenciado que la maca tiene propiedades nutricionales, energizantes y potenciador de la fertilidad, controla la hiperplasia prostática benigna, mejora la memoria y el aprendizaje, sus alcaloides, glucosinolatos y esteroides pueden contribuir a su actividad anticancerígena, los fitoesteroides y otros metabolitos secundarios ayudan a prevenir la osteoporosis postmenopáusicas (Wang *et al.*, 2007). Ensayos clínicos demostraron la eficacia de la maca en las disfunciones sexuales, en el incremento del recuento de espermatozoides y su motilidad, estos resultados promueven a la maca como un adaptógeno y nutraceutico en la prevención de varias enfermedades (Gonzales, 2012). Se ha demostrado diferencias en el efecto de la maca amarilla, roja y negra, la maca negra presentó mejores resultados sobre la espermatogénesis, la memoria y la fatiga, mientras que la maca roja es la que mejor revierte la hiperplasia prostática benigna y la osteoporosis inducida (Gonzales *et al.*, 2014).

Los fitoesteroides son triterpenos, componentes estructurales de las membranas vegetales, se asemejan al colesterol en función y estructura, se han descrito 44 esteroides presentes en las plantas, siendo los principales, el  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etilcolesterol), campesterol (24 $\alpha$ -metilcolesterol) y estigmasterol ( $\Delta^{22}$ , 24 $\alpha$ -etilcolesterol); los fitoestanoles son un subgrupo saturado de fitoesteroides, se producen en altos niveles en algunas especies de cereales (Moreau *et al.*, 2002; Kritchevsky y Chen, 2005).



Los vegetales contienen un promedio de 1 a 3 mg de esteroides por gramo de peso seco, se sintetizan por medio del metabolismo de isoprenoides, generando varios productos finales como el sitosterol, campesterol, estigmasterol e isofucoesterol en proporciones definidas genéticamente, la mayoría de los genes biosintéticos implicados en la ruta metabólica del post-escualeno, han sido aislados y caracterizados, por interferencia metabólica, complementación y expresión funcional, purificación de proteínas y secuenciamiento (Schaller, 2004).

Los fitoesteroides regulan la fluidez y permeabilidad al agua, son esenciales para el crecimiento y desarrollo como en la formación embrionaria, elongación y división celular, polaridad celular epidérmica, actúan en la regulación de la actividad de las proteínas dentro de la membrana y son precursores para la biosíntesis de la hormona brasinoesteroide (Boutté y Grebe, 2009).

El  $\beta$ -sitosterol es un metabolito secundario de las plantas y se presenta como  $\beta$ -sitosterol libre y conjugado, formando ésteres de: esteril-acil graso (SE), esteril- $\beta$ -D-glucósidos (SG) y esteril-6-O-acil graso- $\beta$ -D-glucósidos (ASG), su consumo contribuye a la disminución del contenido de colesterol total y colesterol de lipoproteínas séricas de baja densidad (LDL) reduciendo el riesgo de aterosclerosis coronaria (Moreau *et al.*, 2002).

Diversos estudios han demostrado que el consumo de 2 g de esteroides vegetales al día reducen el colesterol sérico en un 10%, esta reducción se logra a expensas de un aumento de los niveles de esteroides vegetales en el suero, los fitoesteroides además pueden tener otros efectos promotores de la salud, como actividad contra el cáncer de mama, cáncer al colon, cáncer de próstata y algunos actividad antioxidante (Moreau *et al.*, 2002; Weingärtner *et al.*, 2014).

Los productos de oxidación de los fitoesteroides (POP),  $\alpha$  y  $\beta$ -epoxisitosterol,  $\alpha$  y  $\beta$ -epoxisitostanol y sitostanetriol, campestanetriol, 7-cetositosterol, 7 $\alpha$  y 7 $\beta$ -hidroxisitosterol, que se forman durante el almacenamiento y procesamiento de alimentos, son absorbidos y encontrados en el suero sanguíneo humano, pueden generarse también *in vivo* a través de una oxidación no enzimática similar a la del colesterol (Maerker *et al.*, 1988; O'Callaghan *et al.*, 2014). Pueden generar problemas de salud, como su posible potencial aterogénico debido a que perjudican la funcionalidad de la aorta, incrementan el nivel de TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) que afectan la integridad del epitelio intestinal, altos niveles de apoptosis se han

encontrado en células expuestas a óxidos de  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol y dihidro brassicasterol y generan una disminución de glutatión, molécula relacionada a la capacidad antioxidante (Otaegui-Arrazola *et al.*, 2010; O'Callaghan *et al.*, 2014).

Un proceso que permite explicar la pérdida de esteroides durante un proceso de secado post-cosecha, podría ser la oxidación, proceso relacionado con el oxígeno reactivo, radicales libres, procesos físicos como el calor y la radiación, produciéndose hidroxil- (OH-), ceto- (C=O), epoxi y derivados triol, la oxidación de la cadena lateral se cree que es debido principalmente a reacciones enzimáticas que involucran citocromo P450 monooxigenasas, deshidrogenasas, epoxidasas, hidroxilasas y oxidasas (Hovenkamp *et al.*, 2008).

Como antecedentes en la pre y post-cosecha, no se han reportado estudios de fitoesteroides en la maca (*Lepidium meyenii* Walp), pero sí en otros vegetales considerados como fuentes de este metabolito, como referencia, en tres variedades de pecanas, a las 20 semanas después de la floración se sintetizaron los niveles más altos de fitoesteroides, dentro de ellas  $\beta$ -sitosterol, ocurriendo simultáneamente una alta división y diferenciación celular, después de las 20 semanas hasta la completa madurez (27 semanas) el contenido de fitoesteroides disminuyó, se presume que fueron convertidos a otras formas de esteroides, estanoles o para la síntesis de la hormona brasinoesteroides (Bouali *et al.*, 2014). Son significativos los trabajos de Chow y Jen (1978), Whitaker (1988) y Whitaker (1989) que demuestran el efecto del grado de madurez en el contenido de fitoesteroides y  $\beta$ -sitosterol como el predominante.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha en el contenido de  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca.

## **4.2 Materiales y Métodos**

### **4.2.1 Material vegetal**

Se trabajó con los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra, procedentes de un cultivo comercial de la Comunidad campesina de San Pedro de Cajas, ubicado a 4200 msnm (Junín – Perú). La siembra se realizó en Noviembre del 2007 y se cosechó en Julio del 2008.

Se tomaron al azar muestras de 10 plantas (~2 kg) a los siguientes tiempos: (a) 60, 45, 30 y 15

días antes de la cosecha, (b) durante la cosecha, y (c) a los 15, 30, 45, 60 y 90 días de secado post-cosecha. Durante la cosecha, los hipocótilos son apilados al medio ambiente durante 2 días, luego colocados en costales de rafia de polipropileno de ~50 kg donde permanecieron por 2 a 3 días. Después de este período, los sacos de maca fueron trasladados al lugar de secado donde se esparcieron hasta una altura aproximada de 10 cm. Durante las noches, los hipocótilos se cubrieron con toldos de plástico para protegerlos de las condiciones extremas de temperatura (-10 °C). Las temperaturas durante el secado estuvieron comprendidas entre -10 a 15 °C y 70 a 95% de HR. Tomadas las muestras, estas fueron acondicionadas en un cooler y transportadas al laboratorio, donde se lavaron, secaron y envasaron en bolsas de polietileno negro y almacenado a -20 °C hasta el momento de su análisis.

#### **4.2.2 Estándares y reactivos químicos**

El  $\beta$ -sitosterol fue adquirido de Sigma-Aldrich, etanol, ácido ascórbico, hidróxido de potasio, hexano, butil hidroxitolueno (BHT), sulfato de sodio anhidro y metanol grado HPLC fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany).

#### **4.2.3 Determinación de humedad**

Antes de almacenar las muestras en congelación se tomó una porción de estas para determinar la humedad, para lo cual se empleó el método descrito por la AOAC (1998).

#### **4.2.4 Análisis por HPLC-PDA de $\beta$ -sitosterol**

Se empleó el método reportado por López *et al.* (2006), con algunas modificaciones. Luego de congelar los hipocótilos de maca con nitrógeno líquido, se procedió a su molienda. Se pesó 5 g, se homogenizó con 25 ml de etanol al 96% y 5 ml de ácido ascórbico 0.1 M; luego se centrifugó a 4500 g por 20 min, se recolectó el sobrenadante y la torta residual fue sometido a una segunda extracción similar a la primera, ambos sobrenadantes se mezclaron. Se añadió 20 ml de KOH 2M al extracto obtenido y se procedió a la saponificación en baño maría a 60 °C por 60 min, se enfrió y se colocó en una pera de decantación, donde se adicionó 10 ml de solución saturada de NaCl y 10 ml de n-hexano con 5 ppm de BHT. La mezcla se homogenizó durante un minuto y se procedió a la separación de las dos fases. Se recuperó la fase orgánica mientras que la fase acuosa se mezcló nuevamente con 10 ml de n-hexano con 5 ppm de BHT y se repitió el procedimiento de separación y recuperación de la fase orgánica. Se mezclaron ambas fases orgánicas y se pasó por una columna de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro con el fin

de eliminar la humedad residual, se inyectó nitrógeno y concentró en un rotavapor a 50 °C hasta sequedad. Las muestras fueron disueltas con dos mililitros de metanol y se filtraron a través de filtros Millipore de 0.22 µm tipo GV (Millipore, Bedford, MA) previo al análisis HPLC.

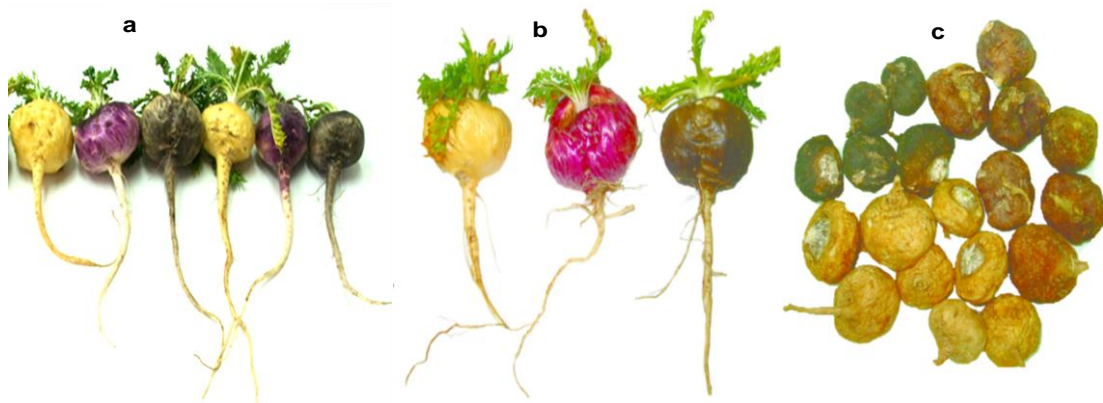
El análisis de β-sitosterol fue realizado en el módulo de separación Waters 2695 (Waters, Milford, MA), equipado con auto-inyector, un detector de arreglo de diodos 2996 y el software Empower. La separación cromatográfica se realizó en la columna Atlantis C<sub>18</sub> (5 µm, 20 x 4.6 mm) y una pre-columna de 4.6 x 2.0 mm (Waters) a la temperatura de 27 °C. El volumen de inyección fue de 10 µl, la elución fue isocrática con metanol a un flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup> durante 30 min. La identificación fue realizada por comparación del tiempo de retención y espectro de absorción del estándar. La cuantificación se realizó a través de una curva estándar de β-sitosterol, el cual fue disuelto en metanol y se trabajó en un rango de concentración de 0.1 a 2 mg ml<sup>-1</sup>. La detección se realizó a 208 nm.

#### **4.2.5 Análisis estadístico**

Los análisis de humedad y de β-sitosterol se realizaron por triplicado. Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza de un factor. Se utilizó la prueba de Duncan para evaluar la diferencia de medias entre los diferentes tratamientos. Diferencias a un  $p < 0.05$  fueron considerados significativas. El software SPSS 14.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL) fue utilizado para llevar a cabo todos los análisis estadísticos.

### **4.3 Resultados y Discusión**

En la Figura 13 se muestra los hipocótilos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) en las tres etapas de estudio.



**Figura 13.** Hipocótilos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) en las tres etapas de estudio: (a) 60 días pre-cosecha, (b) cosecha y (c) 90 días de secado post-cosecha.

#### **4.3.1 Contenido de humedad en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha**

En la Tabla 9 se presentan los resultados de humedad en los tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha. Al comparar el contenido de humedad entre los tres hipocótilos de maca, se observó que desde los 60 días antes de la cosecha hasta el momento de la cosecha, se determinó mayor contenido de humedad en la maca amarilla, seguido de la maca roja y negra; sin embargo, a los 45 días antes de la cosecha, el contenido de humedad de los ecotipos amarillo y rojo fue similar pero significativamente mayores a la humedad de la maca negra.

En cada hipocótilo de maca amarilla, roja y negra, se observó una disminución significativa de la humedad ( $p < 0.05$ ) en el periodo comprendido entre 45 días antes de la cosecha a la cosecha; sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en el contenido de humedad de la maca amarilla en el periodo pre-cosecha comprendido entre 60 a 30 días, mientras que en los ecotipos rojo y negro, se determinó un incremento significativo de la humedad entre 60 y 45 días antes de la cosecha.

**Tabla 9.** Contenido de humedad en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha en g 100 g<sup>-1</sup>.

	Pre-cosecha (días)				Cosecha
	60	45	30	15	
Amarilla	71.75±0.37 <sup>Cc</sup>	71.80±0.57 <sup>Cb</sup>	71.29±0.11 <sup>BCc</sup>	71.04±0.36 <sup>Bc</sup>	69.88±0.13 <sup>Ac</sup>
Roja	71.07±0.17 <sup>Db</sup>	71.78±0.45 <sup>Eb</sup>	69.52±0.08 <sup>Cb</sup>	68.97±0.65 <sup>Bb</sup>	68.39±0.49 <sup>Ab</sup>
Negra	68.67±0.13 <sup>Ca</sup>	69.45±1.18 <sup>Da</sup>	67.72±0.35 <sup>Ba</sup>	65.80±0.22 <sup>Aa</sup>	66.31±0.22 <sup>Aa</sup>

Resultados promedio ± SD (n=3).

Promedios dentro de una fila con diferentes letras superíndice mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para un ecotipo de maca durante la pre-cosecha. Promedios dentro de una columna con diferentes letras superíndice minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre los tres ecotipos de maca en un determinado tiempo pre-cosecha.

En la Tabla 10 se presentan los resultados de humedad durante el secado post-cosecha en los tres ecotipos de maca. Entre ecotipos, todo indica que el color de los hipocótilos no tiene ningún efecto sobre el contenido de humedad. En cada ecotipo se observa una disminución importante en el contenido de humedad, siendo la caída drástica hacia el final del proceso. La humedad final para la maca amarilla, roja y negra fue de  $12.93 \pm 0.12$ ,  $13.39 \pm 0.04$ ,  $13.99 \pm 0.06$  g 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabla 10.** Contenido de humedad en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha en g 100 g<sup>-1</sup>.

	Cosecha	Post-cosecha (días)			
		15	30	60	90
Amarilla	69.88±0.13 <sup>Ec</sup>	59.14±0.37 <sup>Db</sup>	52.23±0.09 <sup>Ca</sup>	39.50±0.08 <sup>Bc</sup>	12.93±0.12 <sup>Aa</sup>
Roja	68.39±0.40 <sup>Eb</sup>	59.22±0.17 <sup>Db</sup>	54.92±0.20 <sup>Cc</sup>	36.94±0.21 <sup>Ba</sup>	13.39±0.04 <sup>Ab</sup>
Negra	66.31±0.22 <sup>Ea</sup>	55.38±0.16 <sup>Da</sup>	53.59±0.22 <sup>Cb</sup>	37.25±0.06 <sup>Bb</sup>	13.99±0.06 <sup>Ac</sup>

Resultados promedio ± SD (n=3).

Promedios dentro de una fila con diferentes letras superíndice mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para un ecotipo de maca durante el secado post-cosecha. Promedios dentro de una columna con diferentes letras superíndice minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre los tres ecotipos de maca en un determinado tiempo post-cosecha.

Durante la pre-cosecha, los hipocótilos de la maca amarilla, roja y negra redujeron su humedad en 2.68, 4.72 y 3.44%, mientras que durante el secado post-cosecha, dicha reducción fue de 81.50, 80.42 y 78.90% respectivamente. Se observó que la humedad en los hipocótilos de la maca amarilla, roja y negra en el momento de la cosecha ( $69.88 \pm 0.13$ ,  $68.39 \pm 0.40$  y  $66.31 \pm 0.22\%$ ), evidencian un mayor contenido de materia seca respecto a 15 genotipos de papa nativa (*Solanum* sp.),  $\sim 71.5 \pm 3.4\%$  de humedad, 11 de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón),  $89 \pm 2.2\%$  de humedad, 14 de oca (*Oxalis tuberosa* Molina),  $83 \pm 1.9\%$  de humedad y 15 de olluco (*Ullucus tuberosum*),  $86.7 \pm 1.7\%$  de humedad (Campos *et al.*, 2006).

En un estudio con dos cultivares de papa, en la etapa pre-cosecha (55, 62, 69,76, 83 días después de la siembra) y cosecha (90 días), Kumar y Ezekiel (2006), determinaron en cada uno de estos tiempos su contenido de materia seca, en el cultivar Atlantic se incrementó de 20.00 a 23.04% y en el cultivar Kufry Lauvkar de 18.23 a 19.63%, una posible explicación de este aumento de la materia seca, tal como ocurre en los ecotipos de maca, estaría relacionado con el metabolismo de la sacarosa, azúcares reductores, polisacáridos estructurales y el proceso respiratorio durante su crecimiento a temperaturas frías.

Una mezcla de hipocótilos de maca de color negro, púrpura, amarillo y rojo, fueron secados tradicionalmente a campo abierto (combinación de daños mecánicos, ciclos hielo-deshielo, alta irradiación, baja humedad relativa y temperaturas extremas) en la ciudad de Junín (4,128 msnm), el contenido de humedad se redujo de aproximadamente 63 a 13% al cabo de 63 días (Esparza *et al.*, 2015), resultados similares a los obtenidos en éste estudio, que en promedio disminuyó de 68.19 a 13.44% después de 90 días.

#### **4.3.2 Perfil cromatográfico del $\beta$ -sitosterol**

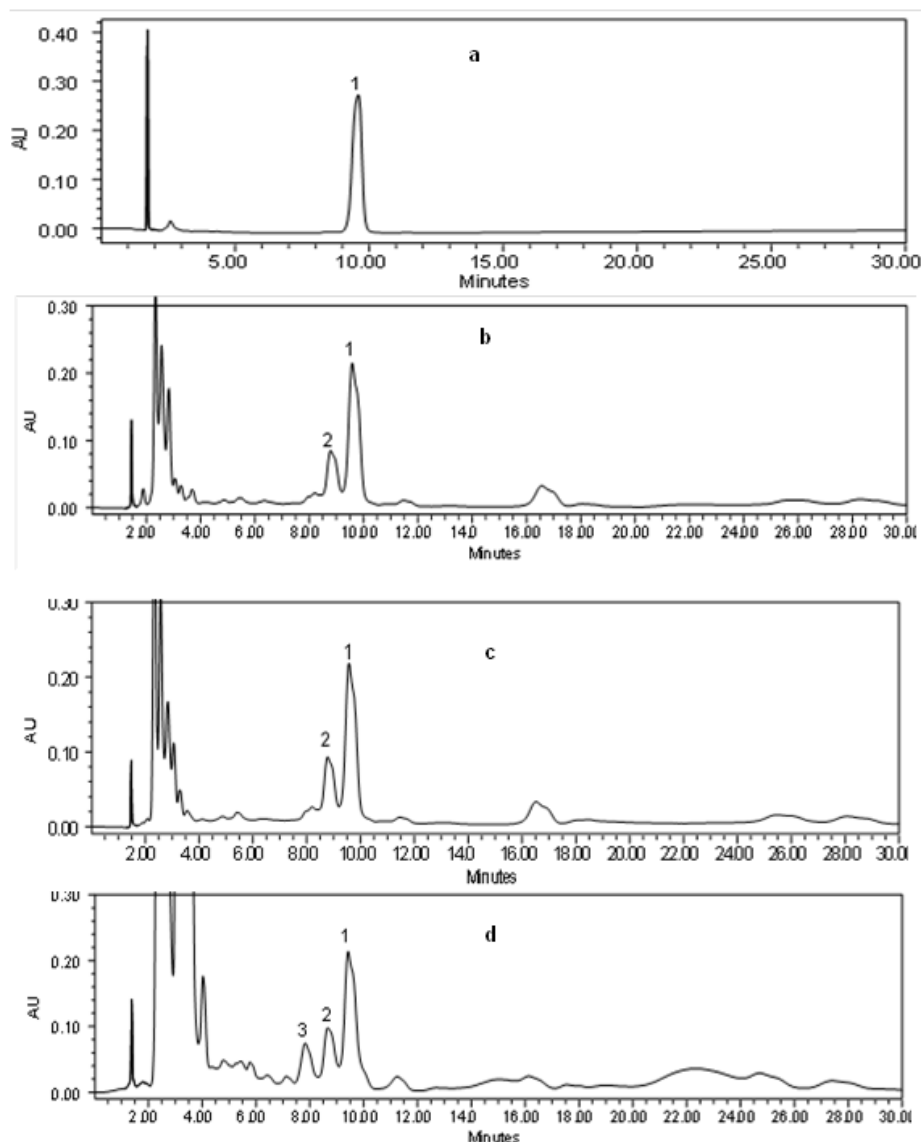
En estudios realizados en esteroides de maca, Zheng *et al.* (2000), encontraron como constituyentes menores en la fase lipídica (extracto en polvo) de 0.03 a 0.04% de esteroides (Campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol). En la fracción de esteroides de maca, se determinó  $\beta$ -sitosterol (45.5%) como componente principal, seguido de campesterol (27.3%), ergosterol (13.6), brasicasterol (9.1%) y  $\Delta 7,22$ -ergostadienol (4,5%) (Dini *et al.*, 1994).

La Figura 14, muestra los perfiles cromatográficos de  $\beta$ -sitosterol (estándar) y  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de maca amarilla en las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha,

similar patrón reportaron los ecotipos rojo y negro.

En los perfiles cromatográficos, el pico 1 corresponde a  $\beta$ -sitosterol, los picos (2) y (3) no fueron identificados. Se han reportado en la fracción lipídica de la maca los siguientes esteroides,  $\beta$ -sitosterol, campesterol, ergosterol, brasicasterol,  $\Delta^{7,22}$ -ergostadienol y estigmasterol (Dini *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007), con esta información, los picos (2) y (3), podrían corresponder a estigmasterol, debido a que el  $\beta$ -sitosterol es el sustrato para su biosíntesis, la relación entre ambas es inversa (Benveniste, 2004), campesterol o brasicasterol como componentes mayores después de  $\beta$ -sitosterol o tocoferoles como el  $\delta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocoferol, que también pueden ser detectados por el método propuesto por López *et al.* (2006).





**Figura 14.** Perfil HPLC-PDA de  $\beta$ -sitosterol para el hipocótilo de maca amarilla: (a) estándar (b) 60 días antes de la cosecha (c) cosecha y (d) 60 días de secado post-cosecha.

### 4.3.3 Contenido de $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha

En la Tabla 11 se presentan los resultados de la evolución del contenido de  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra durante la pre-cosecha. Con relación a la comparación del contenido de  $\beta$ -sitosterol entre ecotipos, se observó que a 60 días antes de la cosecha hay diferencias significativas a  $p < 0.05$  entre los tres ecotipos, el mayor promedio correspondió a la maca amarilla,  $108.34 \pm 2.44 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ . 15 días antes de la cosecha, no se observó diferencias significativas a  $p > 0.05$  entre la maca amarilla y roja, pero sí de estas con respecto a la maca negra, el mayor promedio correspondió a la maca amarilla,

104.29 ± 2.35 mg 100 g<sup>-1</sup> MS. Al momento de la cosecha no se encontró diferencias significativas entre los tres ecotipos, correspondiendo el mayor promedio a la maca negra, 91.63 ± 1.17 mg 100 g<sup>-1</sup> MS.

Considerando el contenido de β-sitosterol para cada ecotipo con respecto al tiempo pre-cosecha, en la maca amarilla se observó diferencias significativas, entre los 60 (108.34 ± 2.44 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, el mayor promedio), 45, 30 y 15 días pre-cosecha respecto a la cosecha, en la maca roja se encontró diferencias significativas, entre los 45, 30 (103.69±2.33 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, el mayor promedio) y 15 días pre-cosecha respecto a la cosecha, en la maca negra se evidenció diferencias significativas, entre los 60, 30 y 15, pero no entre los 45 días respecto a la cosecha (91.63±1.17 mg 100 g<sup>-1</sup> MS, el mayor promedio). Es probable que la biosíntesis propiamente dicha haya ocurrido mucho antes de los 60 días pre-cosecha, periodo que no fue evaluado en este estudio.

**Tabla 11.** Contenido de β-sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante la pre-cosecha en mg 100 g<sup>-1</sup> MS.

	Pre-cosecha (días)				Cosecha
	60	45	30	15	
Amarilla	108.34±2.44 <sup>Dc</sup>	101.19±1.72 <sup>Cb</sup>	93.52±2.10 <sup>Bb</sup>	104.29±2.35 <sup>Cb</sup>	88.31±1.99 <sup>Aa</sup>
Roja	91.39±2.06 <sup>Ab</sup>	101.81±2.29 <sup>Bb</sup>	103.69±2.33 <sup>Bc</sup>	99.75±5.31 <sup>Bb</sup>	87.09±1.96 <sup>Aa</sup>
Negra	84.11±1.89 <sup>Ba</sup>	90.87±2.04 <sup>Ca</sup>	69.45±1.56 <sup>Aa</sup>	67.47±1.52 <sup>Aa</sup>	91.63±1.17 <sup>Ca</sup>

Resultados promedio ± SD (n=3).

Promedios dentro de una fila con diferentes letras superíndice mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para un ecotipo de maca durante la pre-cosecha. Promedios dentro de una columna con diferentes letras superíndice minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre los tres ecotipos de maca en un determinado tiempo pre-cosecha.

Se ha demostrado que durante la etapa pre-cosecha, ocurre alta división celular con biosíntesis de β-sitosterol (Bouali *et al.*, 2014) y los factores ambientales ejercen efectos considerables sobre el contenido total de esteroides, se sabe que un estrés hídrico y temperatura alta provocan un incremento (Roche *et al.*, 2006). Los resultados indican que el color de los hipocótilos no tiene ningún efecto sobre el contenido de β-sitosterol. Durante la pre-cosecha, en los hipocótilos de maca amarilla, el mayor contenido de β-sitosterol se obtuvo a 60 días antes de la cosecha (108.34±2.44 mg 100 g<sup>-1</sup> MS), en los hipocótilos de maca roja 30 días antes de la

cosecha ( $101.81 \pm 2.29$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> MS) y los hipocótilos de maca negra en el momento de la cosecha ( $91.63 \pm 1.17$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> MS). Con la finalidad de contrastar con otros resultados y siendo muy escasa la información en brasicáceas, se recurrió a estudios realizados en distintas especies alimenticias. Durante la evolución del proceso fisiológico de arvejas, en la etapa embrionaria, la concentración de esteroides totales fue de  $419$   $\mu$ g g<sup>-1</sup> MF, disminuyendo a  $73$   $\mu$ g g<sup>-1</sup> MF en su etapa más madura, mientras que el  $\beta$ -sitosterol el principal esteroide, tuvo un contenido de  $237$   $\mu$ g g<sup>-1</sup> MF en la etapa embrionaria y su nivel se redujo a  $47$   $\mu$ g g<sup>-1</sup> MF en la etapa más madura; por lo tanto, las mayores concentraciones de esteroides se produjeron durante la embriogénesis (Schrick *et al.*, 2011). Las aceitunas con índices de madurez de 0.3, 1.3, 3.8 y 3.9 presentaron el siguiente contenido de esteroides totales, 723, 821, 1117 y 1188 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, de estos contenidos totales, porcentualmente  $\Delta^5$ -avenasterol aumentó de 7.2 a 12.9, 18.6 y 18.2% a expensas de  $\beta$ -sitosterol que decreció de 87.3 a 81.9, 75.9 y 76.6%, se sabe que  $\Delta^5$ -avenasterol es un precursor de la biosíntesis de  $\beta$ -sitosterol y la actividad enzimática en las diferentes etapas de desarrollo del fruto podrían generar distinta formación de ambos esteroides (Fernández-Cuesta *et al.*, 2013). El contenido total de esteroides en cuatro especies de brotes de bambú (*Phyllostachys pubescens*), osciló de 112.4 a 279.6 mg  $100$  g<sup>-1</sup> de MS y  $\beta$ -sitosterol de 89.9 a 233.0 mg  $100$  g<sup>-1</sup> de MS, el estudio evaluó el efecto de la época de cosecha sobre el contenido de  $\beta$ -sitosterol cosechadas en invierno ( $181.0$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> de MS), primavera ( $233.0$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> de MS) y verano ( $158.3$  mg  $100$  g<sup>-1</sup> de MS), demostrando que la temporada de cosecha afecta al contenido en esteroides (Lu *et al.*, 2009). Como puede observarse, el contenido de  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de la maca pueden variar en cada período de la pre-cosecha, incluso durante la cosecha, debido a su sensibilidad frente a las condiciones ambientales y de estrés, además a su proceso de conversión en ésteres de esteril-acil graso (SE), esteril- $\beta$ -D-glucósidos (SG) y esteril-6-O-acil graso- $\beta$ -D-glucósidos (ASG), estigmasterol y en el regulador de crecimiento, brasinoesteroides (Piironen *et al.*, 2000; Benveniste, 2004).

#### **4.3.4 Contenido de $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha**

La Tabla 12, presenta los resultados del contenido de  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra durante el secado post-cosecha. Se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de  $\beta$ -sitosterol para los tres ecotipos a medida que evoluciona el proceso de secado, en los hipocótilos de maca amarilla, disminuyó de  $88.31 \pm$

1.99 a  $47.49 \pm 0.91$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS, similar tendencia de comportamiento se observó en la maca roja, donde el contenido de  $\beta$ -sitosterol descendió de  $87.09 \pm 1.96$  a  $41.39 \pm 0.93$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS y en la maca negra disminuyó de  $91.63 \pm 1.17$  a  $33.24 \pm 0.75$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS. En términos porcentuales hubo una reducción significativa de  $\beta$ -sitosterol de 46.22, 52.47 y 63.72% para la maca amarilla, roja y negra, respectivamente.

**Tabla 12.** Contenido de  $\beta$ -sitosterol en los hipocótilos de tres ecotipos de maca durante el secado post-cosecha en mg  $100 \text{ g}^{-1}$  MS.

	Cosecha	Post-cosecha (días)			
		15	30	60	90
Amarilla	$88.31 \pm 1.99^{\text{Da}}$	$67.80 \pm 1.53^{\text{Cb}}$	$47.13 \pm 1.06^{\text{Aa}}$	$54.59 \pm 1.23^{\text{Bc}}$	$47.49 \pm 0.91^{\text{Ac}}$
Roja	$87.09 \pm 1.96^{\text{Ca}}$	$79.56 \pm 1.79^{\text{Bc}}$	$75.05 \pm 0.72^{\text{Bc}}$	$38.69 \pm 0.87^{\text{Aa}}$	$41.39 \pm 0.93^{\text{Ab}}$
Negra	$91.63 \pm 1.17^{\text{Da}}$	$43.30 \pm 0.97^{\text{Ba}}$	$50.65 \pm 1.14^{\text{Cb}}$	$49.64 \pm 1.12^{\text{Cb}}$	$33.24 \pm 0.75^{\text{Aa}}$

Resultados promedio  $\pm$  SD (n=3).

Promedios dentro de una fila con diferentes letras superíndice mayúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) para un ecotipo de maca durante el secado post-cosecha. Promedios dentro de una columna con diferentes letras superíndice minúsculas son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) entre los tres ecotipos de maca en un determinado tiempo de secado post-cosecha.

La pérdida de  $\beta$ -sitosterol observada durante el secado post-cosecha podría deberse principalmente a un fenómeno de autooxidación y oxidación enzimática (Hovenkamp *et al.*, 2008), también es posible la conversión de este esteroles a estigmasterol (Bouali *et al.*, 2014).

Es muy escasa la información sobre el efecto del secado en los esteroides, más aún en condiciones naturales. En el secado de semillas de colza de los cultivares Californium, Elektra y Livius por el método de “secado a temperaturas cercanas al medio ambiente  $\sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ” en una capa de espesor inmóvil de 2 m, la humedad se redujo de 16.2 a 7% en  $\sim 136$  h y mediante aire caliente a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  en  $\sim 36$ -42 min, en el primer tipo de secado, el contenido de  $\beta$ -sitosterol en los tres cultivares disminuyó de  $2156 \pm 105$  a  $1893 \pm 116$  (12.20%), de  $1997 \pm 104$  a  $1889 \pm 88$  (5.41%) y de  $2194 \pm 134$  a  $1896 \pm 124$  (13.58%)  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS, respectivamente, mientras que en el segundo tipo de secado,  $\beta$ -sitosterol disminuyó, de  $2156 \pm 105$  a  $1638 \pm 105$  (24.03%), de  $1997 \pm 104$  a  $1383 \pm 114$  (30.75%) y de  $2194 \pm 134$  a  $1947 \pm 124$  (11.26%)  $\mu\text{g g}^{-1}$  MS, respectivamente, después de 6 meses de almacenamiento a una temperatura de  $10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , las

semillas de colza secadas cerca del medio ambiente redujeron su contenido de  $\beta$ -sitosterol en 2 a 7% más y las secadas por aire caliente en 5 a 9% más, se considera que el secado disminuye su resistencia mecánica, haciéndola más susceptible a daños bioquímicos y a la formación de derivados oxidados de esteroides (Gawrysiak-Witulska y Rudzińska, 2012).

Recurriendo a estudios realizados en productos comerciales y sólo con el fin de explicar el fenómeno bioquímico de una reducción de fitoesteroides, en la margarina almacenada a 4 °C y 20 °C, al cabo de 18 semanas, el contenido de  $\beta$ -sitosterol en  $\text{mg g}^{-1}$ , disminuyó de  $3.62 \pm 0.26$  a  $2.95 \pm 0.22$  y de  $3.62 \pm 0.26$  a  $2.23 \pm 0.20$  respectivamente; asimismo en esta margarina después de 6 semanas de almacenamiento a 4 °C y 20 °C, los óxidos en  $\mu\text{g g}^{-1}$ , se incrementaron de 255 a 354 y de 255 a 734 respectivamente, la degradación oxidativa de los esteroides, sigue un mecanismo similar a la oxidación de los ácidos grasos, los radicales libres inician o estimulan dicha oxidación (Rudzińska *et al*, 2014).

De los resultados del secado post-cosecha en condiciones tradicionales, se desprende que deben plantearse nuevas alternativas de manejo post-cosecha y la posibilidad de utilizar los hipocótilos frescos como materia prima en la industria para preservar y aprovechar mejor el  $\beta$ -sitosterol.

#### **4.4 Conclusiones**

Los resultados evidencian que en el transcurso de la pre-cosecha a la cosecha, los hipocótilos de maca incrementaron su contenido de  $\beta$ -sitosterol a distintos tiempos, la maca amarilla y roja alcanzaron su mayor valor a los 60 y 30 días de la pre-cosecha, respectivamente y la maca negra al momento de la cosecha. Durante la cosecha no se encontraron diferencias significativas en el contenido de  $\beta$ -sitosterol entre los tres ecotipos de maca. Durante el secado post-cosecha, en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra el contenido de  $\beta$ -sitosterol disminuyó en 46.22, 52.47 y 63.72%, respectivamente; por lo tanto, las condiciones técnicas del secado tradicional deben replantearse para preservar el contenido de  $\beta$ -sitosterol.

#### **4.5 Referencias Bibliográficas**

- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 1998. *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Benveniste, P. 2004. Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual Review of Plant Biology* 55:429-457.

- Bouali, I; Trabelsi, H; Herchi, W; Martine, L; Albouchi, A; Bouzaien, G; Sifi, S; Boukhchina, S; Berdeaux, O. 2014. Analysis of pecan nut (*Carya illinoensis*) unsaponifiable fraction. Effect of ripening stage on phytosterols and phytostanols composition. *Food Chemistry* 164:309-316.
- Boutté, Y; Grebe, M. 2009. Cellular processes relying on sterol function in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:705-713.
- Campos, D; Noratto, G; Chirinos, R; Arbizu, C; Roca, W; Cisneros-Zevallos L. 2006. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of andean tuber crops: Native potato (*Solanum sp.*), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavón), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ullucu (*Ullucus tuberosum*). *Journal of the Science of Food and Agricultural* 86:1481-1488.
- Chow ETS; Jen JJ. 1978. Phytosterol biosynthesis in ripening tomatoes. *Journal of food Science* 43: 1424-1426.
- Dini, A; Migliuolo, G; Rastrelli, L; Saturnino, P; Shettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry* 49:347-349.
- Esparza, E; Hadzich, A; Kofer, W; Mithöfer, A; Cosio, EG. 2015. Bioactive maca (*Lepidium meyenii*) alkamides are a result of traditional Andean postharvest drying practices. *Phytochemistry* 116:138-148.
- Fernández-Cuesta, A; León, L; Velasco, L; de la Rosa, R. 2013. Changes in squalene and sterols associated with olive maturation. *Food Research International* 54:1885-1889.
- Gawrysiak-Witulska, M; Rudzińska, M. 2012. Degradation of phytosterols during near-ambient drying of Rapeseeds in a thick immobile layer. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89:1681-1689.
- Gonzales, GF. 2012. Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a plant from the Peruvian Highlands. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:1-10.
- Gonzales, GF; Villaorduña, L; Gasco, M; Rubio, J; Gonzales, C. 2014. Maca (*lepidium meyenii* walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 31:100-110.
- Hovenkamp, E; Demonty, I; Plat, J; Lütjohann, D; Mensink, RP; Trautwein, EA. 2008. Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research* 47:37-49.
- Kritchevsky, D; Chen, SC. 2005. Phytosterols—health benefits and potential concerns: a review. *Nutrition Research* 25:413-428.

- Kumar, D; Ezekiel, R. 2006. Developmental changes in sugars and dry matter content of potato tuber under sub-tropical climates. *Scientia Horticulturae* 110:129-134.
- López, CM; Prats, MS; Berenguer, V. 2006. A rapid chromatographic method for simultaneous determination of  $\beta$ -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:141-149.
- Lu, B; Ren, Y; Zhang, Y; Gong, J. 2009. Effects of genetic variability, parts and seasons on the sterol content and composition in bamboo shoots. *Food Chemistry* 112:1016-1021.
- Maerker, G; Nungesser, EH; Bunick, FJ. 1988. Reaction of cholesterol 5,6-epoxides with simulated gastric juice. *Lipids* 23:761-765.
- Moreau, RA; Whitaker, BD; Hicks, KB. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. Review. *Progress in Lipid Research* 41:457-500.
- O’Callaghan, Y; McCarthy, FO; O’Brien, NM. 2014. Recent advances in Phytosterol Oxidation Products. Review. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446:786-791.
- Otaegui-Arazola, A; Menéndez-Carreño, M; Ansorena, D; Astiasarán, I. 2010. Oxysterols: A world to explore. Review. *Food and Chemical Toxicology* 48:3289-3303.
- Piironen, V; Lindsay, DG; Miettinen, TA; Toivo, J; Lampi, A-M. 2000. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80:939-966.
- Roche, J; Bouniols, A; Mouloungui, Z; Barranco, T; Cerny, M. 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108:287-297.
- Rudzińska, M; Przybylski, R; Wąsowicz, E. 2014. Degradation of phytosterols during storage of enriched margarines. *Food Chemistry* 142:294-298.
- Schaller, H. 2004. New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. Review. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:465-476.
- Schrack, K; Cordova, C; Li, G; Murray, L; Fujioka, S. 2011. A dynamic role for sterols in embryogenesis of *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 72:465-475.
- Wang, Y; Wang, Y; McNeil, B; Harvey, LM. 2007. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Research International* 40:783-792.
- Weingärtner, O; Baber, R; Teupser, D. 2014. Plant sterols in food: No consensus in guidelines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446:811-813.

- Whitaker BD. 1988. Changes in the sterol lipid content and composition of tomato fruit during ripening. *Photochemistry* 27 (11): 3411-3416.
- Whitaker BD. 1989. Sterol lipid content and composition in bell pepper fruit at three stages of ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114(4):648-651.
- Zheng, BL; He, K; Kim, CH; Rogers, L; Shao, Y; Hunag, ZY; Lu, Y; Yan, SJ; Qien, LCh; Zheng, QY. 2000. Effect of lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 55(4):598-602.



## V. CAPÍTULO V

### Conclusiones y Recomendaciones Generales

#### 5.1 Conclusiones generales

La maca es una fuente importante de glucosinolatos aromáticos, principalmente de glucotropaeolin. En los ecotipos amarillo, rojo y negro, se identificaron seis glucosinolatos: 5-metilsulfinilpentil, 4-hidroxibencil, bencil, 3-metoxibencil, 4-hidroxi-3-indolilmetil y 4-metoxi-3-indolilmetil glucosinolato. El perfil y el contenido de glucosinolatos en los tres ecotipos analizados fueron similares. Durante la pre-cosecha estos se incrementaron gradual y significativamente. Desde la cosecha a 15 días del secado post-cosecha en condiciones ambientales, se observó un incremento importante de glucosinolatos totales y aromáticos, después de los 45 días al final del proceso, las pérdidas de 20% a 50% de glucosinolatos totales fueron correlacionadas con la disminución de la actividad de mirosinasa.

Se estima que los hipocótilos de maca fresca son una fuente importante de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>, durante la cosecha el ecotipo rojo supera a los ecotipos amarillo y negro. En los tres ecotipos fueron identificados (HPLC-PDA) 11 compuestos fenólicos semejantes pero en concentraciones distintas, seis derivados del flavanol (flavan-3-ol), cuatro derivados del ácido benzoico y un derivado del ácido *o*-cumárico. Durante la pre-cosecha, los compuestos fenólicos presentaron tendencias de incremento y disminución, relacionado a fenómenos complejos de su biosíntesis y degradación. El secado post-cosecha en condiciones tradicionales en la maca amarilla, roja y negra generó una pérdida significativa del 89.90%, 82.49% y 66.31%, respectivamente.

En el transcurso de la pre-cosecha a la cosecha, los hipocótilos de maca incrementaron su contenido de  $\beta$ -sitosterol a distintos tiempos, la maca amarilla y roja durante la pre-cosecha y la maca negra al momento de la cosecha. Durante la cosecha no se encontró diferencias significativas en el contenido de  $\beta$ -sitosterol entre los tres ecotipos de maca. Durante el secado post-cosecha, en los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra el contenido de  $\beta$ -sitosterol disminuyó en 46.22, 52.47 y 63.72% respectivamente.

## **5.2 Recomendaciones generales**

El secado tradicional de la maca debe replantearse debido a las pérdidas significativas de glucosinolatos, compuestos fenólicos y  $\beta$ -sitosterol y proponer nuevas técnicas de tratamiento tecnológico para obtener productos con un mayor valor agregado de componentes bioactivos. Se sugiere un secado post-cosecha en condiciones ambientales durante 15 días, seguido de un escaldado para inactivar enzimas y un secado por lecho fluidizado. Realizar trabajos de investigación de otros bioactivos como antocianinas, carotenoides, esteroides, tocoferoles, alcaloides en los ecotipos de maca y evaluar su actividad biológica *in vivo*.

## ANEXOS

Todos los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza de un factor. Se presenta los resultados de la prueba de Duncan aplicados a los tres ecotipos al momento de la cosecha y como referencia la prueba de Duncan durante las tapas de pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha para la maca amarilla. Los resultados de la maca roja y negra siguen el mismo procedimiento.

### ANEXO 1. Prueba de Duncan del contenido de glucosinolatos totales, glucotropaeolin durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

#### 1.1. Prueba de Duncan del contenido de glucosinolatos totales durante la pre-cosecha

Días de pre-cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
90	3	11.28			
45	3		20.67		
30	3		22.10		
15	3			30.73	
Cosecha	3				36.16
Sig.		1.00	0.36	1.00	1.00

#### 1.2. Prueba de Duncan del contenido de glucotropaeolin durante la pre-cosecha

Días de pre-cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
90	3	8.54		
45	3		17.51	
30	3		17.86	
15	3			25.05
Cosecha	3			29.05
Sig.		1.00	1.00	0.09

1.3. Prueba de Duncan del contenido de glucosinolatos totales al momento de la cosecha

Cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Negro	3	31.43
Rojo	3	34.85
Amarillo	3	36.16
Sig.		0.08

1.4. Prueba de Duncan del contenido de glucotropaeolin al momento de la cosecha

Cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Negro	3	25.2
Rojo	3	28.4
Amarillo	3	29.1
Sig.		0.08

1.5. Prueba de Duncan del contenido de glucosinolatos totales durante el secado post-cosecha

Días de secado post-cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
90	3	22.55			
75	3	23.66			
60	3	27.63			
45	3	29.89	29.89		
Cosecha	3		36.16	36.16	
30	3			44.61	44.61
15	3				45.66
Sig.		0.10	0.18	0.05	1.00

1.6. Prueba de Duncan del contenido de glucotropaeolin durante el secado post-cosecha

Días de secado post-cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
75	3	18.07		
90	3	18.37		
60	3	22.18		
45	3	24.65	24.65	
Cosecha	3		29.05	
15	3			35.90
30	3			37.93
Sig.		0.05	0.24	0.87

**ANEXO 2.** Prueba de Duncan de la actividad de la enzima mirosinasa durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

2.1. Prueba de Duncan de la actividad de la enzima mirosinasa durante la pre-cosecha

Días de pre-cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
90	3	622.36	
15	3	647.44	
45	3	659.56	
Cosecha	3		837.94
Sig.		0.07	1

2.2. Prueba de Duncan de la actividad de la enzima mirosinasa en el momento de la cosecha

Cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Negra	3	692.59	
Amarilla	3		837.94
Roja	3		854.20
Sig.		1	0.18

2.3. Prueba de Duncan de la actividad de la enzima mirosinasa durante el secado post-cosecha

Días de secado post-cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
90	3	199.94			
60	3		390.25		
30	3			686.27	
Cosecha	3				837.94
Sig.		1	1	1	1

**ANEXO 3.** Prueba de Duncan del contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup>, correlación de Pearson contenido de compuestos fenólicos totales HPLC-PDA durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha.

3.1. Prueba de Duncan del contenido de compuestos fenólicos totales al momento de la cosecha

Cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Negro	3	171.69		
Amarillo	3		193.85	
Rojo	3			225.05
Sig.		1.00	1.00	1.00

3.2. Prueba de Duncan de la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> al momento de la cosecha

Cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Negro	3	23.48		
Amarillo	3		25.25	
Rojo	3			25.84
Sig.		1.00	1.00	1.00

3.3. Prueba de Duncan del contenido de compuestos fenólicos totales durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

Etapas	N	Subconjunto para alfa = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pre-cosecha											
90	3	151.76									
45	3	152.19									
30	3		157.49								
15	3			167.17							
Cosecha	3				193.85						
Secado post-cosecha											
15	3					212.10					
30	3						215.04				
45	3							224.02			
60	3								237.64		
75	3									301.33	
90	3										349.34
Sig.		0.76	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

3.4. Prueba de Duncan de la capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

Etapas	N	Subconjunto para alfa = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pre-cosecha											
90	3	16.58									
45	3		19.71								
30	3		19.84								
15	3			23.81							
cosecha	3				25.25						
Secado post-cosecha											
15	3					27.26					
30	3						29.44				
45	3							32.37			
60	3								34.76		
75	3									36.91	
90	3										42.84
Sig.		1.00	0.39	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

3.5. Prueba de Duncan del contenido de compuestos fenólicos totales HPLC-PDA durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

Etapas	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
90 días post-cosecha	3	11.34				
60 días post-cosecha	3		32.14			
30 días post-cosecha	3			95.56		
45 días pre-cosecha	3				108.06	
30 días pre-cosecha	3				108.25	
Cosecha	3				112.32	
90 días pre-cosecha	3					142.82
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.08	1.00

3.6. Prueba de Duncan del coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en maca amarilla

Factores	Correlación	ANTIOXIDANTES	FENOLES
ANTIOXIDANTES	Correlación de Pearson	1	0.959**
	Sig. (bilateral)		0.000
	N	33	33
FENOLES	Correlación de Pearson	0.959**	1
	Sig. (bilateral)	0.000	
	N	33	33

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).



3.7. Prueba de Duncan del coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en maca roja

Factores	Correlación	ANTIOXIDANTES	FENOLES
ANTIOXIDANTES	Correlación de Pearson	1	.975**
	Sig. (bilateral)		0.000
	N	33	33
FENOLES	Correlación de Pearson	0.975**	1
	Sig. (bilateral)	0.000	
	N	33	33

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

3.8. Prueba de Duncan del coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante ABTS<sup>•+</sup> en maca negra

Factores	Correlación	ANTIOXIDANTES	FENOLES
ANTIOXIDANTES	Correlación de Pearson	1	0.949**
	Sig. (bilateral)		0.000
	N	33	33
FENOLES	Correlación de Pearson	0.949**	1
	Sig. (bilateral)	0.000	
	N	33	33

\*\* . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

**ANEXO 4.** Prueba de Duncan del contenido de  $\beta$ -sitosterol durante la pre-cosecha, cosecha y secado post-cosecha

4.1. Prueba de Duncan del contenido de  $\beta$ -sitosterol al momento de la cosecha

Cosecha	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Rojo	3	87.09
Amarillo	3	88.31
Negro	3	91.63
Sig.		0.08

4.2. Prueba de Duncan del contenido de  $\beta$ -sitosterol durante la pre-cosecha y post-cosecha

Etapa	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
30 días post-cosecha	3	47.13						
90 días post-cosecha	3	47.49						
60 días post-cosecha	3		54.59					
15 días post-cosecha	3			67.80				
Cosecha	3				88.31			
30 días pre-cosecha	3					93.52		
45 días pre-cosecha	3						101.19	
15 días pre-cosecha	3						104.29	
60 días pre-cosecha	3							108.34
Sig.		0.85	1.00	1.00	1.00	1.00	0.12	1.00